

CECÍLIA MULLER BANDEIRA

**FONTES DE ESPERMINA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *IN VIVO***

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2011

CECÍLIA MULLER BANDEIRA

**FONTES DE ESPERMINA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Gouveia Pelúzio

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA – DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CECÍLIA MULLER BANDEIRA

FONTES DE ESPERMINA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VIVO*

TESE APROVADA EM 21 DE DEZEMBRO DE 2011

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. ADRIANA FARAH DE MIRANDA PEREIRA

Profa. Dra. DORILA PILÓ VELOSO

Prof. Dr. ZANDER BARRETO MIRANDA

Prof. Dr. TASSO MORAES E SANTOS

Profa. Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA
Orientadora

Dedico este trabalho à minha família,
pelo amor, incentivo e apoio.

E ao Júlio,
por tudo o que ele representa na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Dra. Maria Beatriz Abreu Glória, pela orientação deste trabalho.

À professora Dra. Maria do Carmo Gouvêa Pelúzio, pela co-orientação deste trabalho.

Ao Júlio César Cambraia Veado que esteve ao meu lado em todos os momentos desta etapa, inclusive aqueles mais difíceis e me motivou a seguir em frente. Pelos ensinamentos dentro e fora de sala de aula, que me inspiraram a escolher o caminho certo e enxergar as dificuldades como forma de aprendizado e crescimento.

Ao professor Fernando Soares Lameiras pela realização da cuidadosa análise estatística e disponibilidade em ajudar nas tantas interpretações de resultados.

À Maria Adelaide Fernandes, Wallace C. Ferreira, Anne D. N. Soares, Eliane Moretto e Leandro pela indispensável ajuda durante a manipulação dos animais, sempre com muito boa vontade.

Aos professores da Escola de Veterinária da UFMG Fabíola O. Paes Leme, Gilcinéa C. Santana, Paulo Ricardo O. Paes, pelas análises laboratoriais.

Aos professores Adão A. Sabino, Afonso L. Oliveira, Dalton O. Fontes, David L. Nelson e Tasso M. Santos pelas importantes sugestões ao projeto do trabalho.

Aos demais professores do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelos ensinamentos e bons momentos de convívio.

Ao Danilo Bastos pelo auxílio na realização das análises estatísticas iniciais.

Aos amigos do LBqA, Adriana C. Mendonça, Aldecir, Aline M. Nachtigall, Ana Carolina C. L. Martins, Bruno M. Dala Paula, Bruno Botelho, Caroline de Paiva, Flávia Mendes, Guilherme C. L. dos Reis, Isabela M. Diniz, Janice M. Gouvea, Juliana C. S. Rigueira, Kátia F. Fraga, Larissa L. Bomtempo, Letícia R. Guidi, Patrícia A. V. de Barros, Patrícia A. S. Tette, Pedro P. Valério, Priscila S. Sabaini, Regina C. Adão, Regina Carvalho, Rummenigge Oliveira, Sílvia M. Vieira, Tarliane M. da Silva, Valdirene Neves e Warley P. Evangelista pelas sugestões e colaboração durante a realização deste trabalho e pelo convívio e amizade, que tornaram este período muito mais agradável.

Aos colegas do Departamento de Alimentos, Aline C. Pinheiro, Carina Gondim, Lara Pacífico, Juliana Capanema, Laila Resende, Leandro A. F. Sousa, Márcio J. M. Rabelo, Marina Zicker, Natália C. Teixeira, Raquel M. A. Rostagno, Tássia Costa, pela amizade e solidariedade.

Aos colegas do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, em especial à Cynthia Aparecida de Castro, pela indispensável ajuda com as análises e importantes informações técnicas.

Às professoras Scheilla V.C.Souza, Renata A. L. Almeida Santos e Raquel Linhares e aos funcionários do Laboratório de Bromatologia Marcos Lage e Ronália Leite pela amizade, ensinamentos e bons momentos de convívio.

Ao Marco Antônio Sundfeld da Gama e Fernando César Ferraz Lopes do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite – CNPGL, Juiz de Fora, pela realização e interpretação de análises laboratoriais.

Aos colegas do Departamento de Química do ICEX, Marilda Conceição da Silva e Rodrigo Verly pela disponibilidade e atenção durante as etapas iniciais do experimento.

À Maria Selma Carvalho, da Associação de Produtores de Sementes de Minas Gerais pelo fornecimento de amostras de milho germinado.

Ao José Batista Viturino pela disponibilidade e auxílio na manutenção dos animais.

Às funcionárias do Programa de Pós-Graduação Jaqueline, Edna Aparecida, Mariângela Fonte-Boa, Marilene B. Souza, Úrsula R. Martins pela atenção e auxílio.

Aos professores membros da banca, Adriana Farah de Miranda Pereira, Dorila Piló-Veloso, Tasso Moraes e Santos e Zander Barreto Miranda pelas sugestões importantes na finalização da tese.

E a todos que, de diferentes maneiras, acreditaram, incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	15
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
REVISÃO DA LITERATURA.....	21
1 AMINAS BIOATIVAS.....	21
1.1 Definição, classificação e estrutura.....	21
1.2 Propriedades físicas.....	23
1.3 Funções.....	24
1.3.1 Poliaminas antioxidantes.....	27
1.3.1.1 Efeito antioxidante no organismo.....	29
1.3.1.2 Efeito antioxidante em alimentos.....	31
1.4 Síntese.....	33
1.5 Metabolismo e distribuição das poliaminas no organismo animal.....	37
1.6 Aspectos toxicológicos.....	42
1.7 Extração, separação e quantificação de aminas bioativas.....	42
1.7.1 Métodos de extração.....	43
1.7.2 Métodos de separação e quantificação.....	44
1.7.2.1 Derivação.....	45
2 OXIDAÇÃO.....	47
2.1 Compostos produzidos durante a oxidação.....	47
2.2 Importância do íon ferro na formação das espécies reativas do oxigênio.....	49
2.3 Oxidação lipídica.....	50
2.3.1 Autooxidação.....	50
2.3.2 Fotoxidação.....	52
2.4 Oxidação protéica.....	53
2.5 Oxidação em carnes e produtos cárneos.....	55
2.6 Sistema antioxidante endógeno.....	57
2.7 Métodos de análise da oxidação.....	59
CAPÍTULO I: Determinação do perfil e teores de aminas bioativas em subprodutos, casca de maracujá, testículo bovino e fígadosuíno.....	61
1 OBJETIVOS.....	61
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1 Amostras.....	61
2.2 Reagentes, solventes e padrões.....	61
2.3 Métodos de análise.....	62
2.3.1 Extração de aminas bioativas.....	62
2.3.2 Determinação de aminas bioativas por CLAE.....	62
2.4 Análise estatística.....	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4 CONCLUSÕES.....	66

CAPÍTULO II: Aminas bioativas em milho fresco, em conserva, seco, germinado e embrião.....		67
1	OBJETIVOS.....	67
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1	Amostras.....	67
2.2	Reagentes, solventes e padrões.....	67
2.3	Métodos de análise.....	68
2.3.1	Teor de umidade.....	68
2.3.2	Aminas bioativas.....	68
2.4	Análise estatística.....	68
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
3.1	Teor de umidade dos diferentes produtos de milho.....	68
3.2	Perfil de aminas bioativas livres em milho fresco, em conserva e seco.....	69
3.3	Concentrações de aminas bioativas livres em diferentes produtos demilho.....	71
3.4	Influência da germinação no perfil e teores de aminas.....	72
3.5	Perfil e teores de aminas em diferentes partes do milho.....	73
4	CONCLUSÕES.....	74

CAPÍTULO III: Separação de aminas bioativas por cromatografia em camada delgada e em coluna.....		75
1	OBJETIVOS.....	75
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1	Amostras.....	75
2.2	Reagentes, solventes e padrões.....	75
2.3	Métodos.....	75
2.3.1	Obtenção e concentração do extrato.....	75
2.3.2	Destilação do extrato.....	76
2.3.3	Separação preparativa de aminas por cromatografia em coluna.....	76
2.3.3.1	Preparo da coluna.....	76
2.3.3.2	Separação das aminas bioativas por CC.....	77
2.4	Métodos de análise.....	77
2.4.1	Determinação qualitativa das aminas por CCD.....	77
2.4.1.1	Preparo das placas.....	77
2.4.1.2	Separação das aminas bioativas por CCD.....	78
2.4.2	Determinação quantitativa e qualitativa das aminas por CLAE.....	78
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
3.1	Concentração dos extratos.....	78
3.2	Purificação do extrato por destilação em coluna de fracionamento... ..	79
3.3	Otimização da CCD para separação de aminas.....	80
3.4	Otimização da CC para a separação das aminas.....	82
4	CONCLUSÕES.....	84

CAPÍTULO IV: Avaliação de parâmetros bioquímicos sanguíneos, aminas bioativas e estabilidade oxidativa em carne de rato após administração de espermina – Experimento piloto.....		85
1	OBJETIVOS.....	85
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1	Animais e dietas.....	85
2.2	Tratamentos.....	86

2.3	Eutanásia e coleta de material para análises.....	87
2.4	Métodos de análise.....	87
2.4.1	Determinação do consumo de alimento, variação de peso e rendimento em carne.....	87
2.4.2	Análise do sangue quanto aos parâmetros bioquímicos.....	88
2.4.3	Determinação do pH.....	88
2.4.4	Determinação de aminas bioativas.....	88
2.4.5	Determinação de dienos conjugados.....	88
2.4.6	Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	89
2.4.7	Determinação do perfil de ácidos graxos.....	89
2.5	Análise estatística.....	90
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
3.1	Consumo de ração, variação de peso e rendimento em carne.....	90
3.2	Influência da administração de espermina nos parâmetros bioquímicos do sangue.....	91
3.3	Influência da administração de espermina no pH.....	92
3.4	Aminas em carne.....	93
3.5	Influência da administração de espermina na estabilidade oxidativa.....	94
3.5.1	Concentração de dienos conjugados.....	94
3.5.2	Concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	95
3.5.2.1	TBARS na carne.....	95
3.5.2.2	TBARS no fígado.....	97
3.6	Ácidos graxos em carne de rato.....	98
3.7	Avaliação da correlação entre as análises realizadas.....	99
4	CONCLUSÕES.....	100

CAPÍTULO V: Avaliação de parâmetros de qualidade na carne após administração de espermina utilizando ratos Wistar como modelo experimental.....

	101	
1	OBJETIVOS.....	101
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	101
2.1	Animais e dietas.....	101
2.2	Tratamentos.....	102
2.3	Eutanásia, coleta de sangue, retirada de vísceras, pele e músculos.....	102
2.4	Reagentes, soluções e padrões.....	103
2.5	Métodos de análise.....	103
2.5.1	Determinação do consumo de alimento, variação de peso e rendimento em carne.....	103
2.5.2	Determinação de aminas bioativas.....	103
2.5.3	Determinação da cor.....	103
2.5.4	Determinação do pH.....	104
2.5.5	Preparo de homogeneizado de fígado.....	104
2.5.6	Avaliação da oxidação lipídica.....	104
2.5.6.1	Determinação de dienos conjugados.....	104
2.5.6.2	Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	105
2.5.7	Avaliação da oxidação protéica.....	105
2.5.8	Determinação de proteína total.....	106
2.6	Análise estatística.....	106
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
3.1	Consumo de ração, variação de peso e rendimento em	107

	carne.....	
3.2	Aminas bioativas na carne.....	108
3.3	Influência da administração de espermina no pH da carne.....	109
3.4	Influência da administração de espermina na cor da carne.....	110
3.5	Formação de produtos de oxidação lipídica durante armazenamento.....	112
3.6	Oxidação protéica no fígado.....	115
4	CONCLUSÕES.....	116

CAPÍTULO VI: Espermina pode atuar como antioxidante protegendo contra estresse rato Wistar submetido a gavagem..... 118

1	OBJETIVOS.....	118
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	118
2.1	Animais e dietas.....	118
2.2	Tratamentos.....	118
2.3	Eutanásia, coleta de sangue, retirada de vísceras, pele e músculos.....	118
2.4	Reagentes, soluções e padrões.....	119
2.5	Métodos de análise.....	119
2.5.1	Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	119
2.5.2	Determinação de proteína carbonilada.....	120
2.5.3	Determinação da atividade da enzima catalase.....	120
2.5.4	Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase.....	121
2.5.5	Determinação de proteína total.....	121
2.5.6	Dosagem de nitrato sérico.....	121
2.5.7	Análise bioquímica do sangue.....	122
2.6	Análise estatística.....	122
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
3.1	Oxidação lipídica no fígado.....	123
3.2	Oxidação protéica no fígado.....	124
3.3	Atividade das enzimas antioxidantes no fígado e sangue.....	125
3.4	Nitrato de sódio no soro sanguíneo.....	129
3.5	Enzimas marcadoras de estresse fisiológico.....	130
4	CONCLUSÕES.....	131

	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
	ANEXO A – Artigo publicado no periódico Food Chemistry.....	150
	ANEXO B – Aprovação do CETEA.....	151

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

1	Ponto de ebulição de algumas aminas bioativas.....	23
2	Efeito relativo dos antioxidantes no tempo de indução (h) da oxidação em compostos contendo ácidos graxos polinsaturados (AGPI).....	31
3	Distribuição de espermidina marcada com ¹⁴ C administrada por dia, em diferentes órgãos de ratos submetidos a dietas diversas.....	41

CAPÍTULO II

II.1	Teores médios de aminas bioativas livres em milho fresco, em conserva e seco (<i>Zea mays</i> L.)	69
II.2	Concentrações médias de aminas bioativas livres em milho seco e germinado (<i>Zea mays</i> L.)	72
II.3	Concentrações médias de aminas bioativas livres no embrião do grão de milho e no grão sem embrião (<i>Zea mays</i> L.)	74

CAPÍTULO III

III.1	Fases móveis testadas na cromatografia em camada delgada para separação de extrato de fígado, contendo aminas bioativas e os resultados obtidos.....	81
-------	--	----

CAPÍTULO IV

IV.1	Composição centesimal da ração comercial para ratos Labina (Purina)...	85
IV.2	Condições experimentais do experimento piloto 1, utilizando 8 animais, sendo 2 animais por grupo, diferentes doses de espermina (0 a 50 mg) e períodos de tratamento (4 a 10 dias).....	86
IV.3	Condições experimentais do experimento piloto 2, utilizando 8 animais, sendo 2 animais por grupo, diferentes doses de espermina (0 a 50 mg) e um período de tratamento (4 dias).....	86
IV.4	Variação de peso e consumo de ração dos ratos dos experimentos piloto (EP) 1 e 2, após administração de espermina em diferentes doses e tempos de tratamento.....	90
IV.5	Efeito da administração oral de espermina sobre os parâmetros bioquímicos de ratos no experimento piloto 2, que receberam diferentes doses de espermina (8, 30 e 50 mg/kg).....	92
IV.6	Valores do pH da carne de rato dos experimentos piloto (EP) 1 e 2, nos tempos T0 e T45, respectivamente 0 e 45 dias após a eutanásia que receberam diferentes doses de espermina (8, 30 e 50 mg/kg).....	92
IV.7	Teores de aminas bioativas (mg/100 g) em carne de ratos tratados com espermina por via oral, dos experimentos piloto (EP) 1 e 2.....	93
IV.8	Dienos conjugados em carne de rato, dos experimentos piloto (EP) 1 e 2, nos tempos T0 e T45, respectivamente 0 e 45 dias após a eutanásia dos animais que receberam espermina.....	94
IV.9	Concentração de malonaldeído em carne de rato, dos experimentos piloto (EP) 1 e 2, nos tempos T0 e T45.....	96
IV.10	Concentração de malonaldeído ($\mu\text{mol.L}^{-1}/\text{g}$) em fígado de rato, após tratamento com espermina, nos animais dos experimentos piloto (EP) 1 e 2, nos tempos T0 e T45, respectivamente 0 e 45 dias após a eutanásia.....	98

IV.11	Perfil de ácidos graxos na carne de ratos do experimento piloto 2, tratados com espermina em diferentes doses (8, 30 e 50 mg/kg), durante 4 dias.....	99
IV.12	Correlações entre as análises de dienos conjugados (DC) e malonaldeído (TBARS) na carne de ratos recebendo espermina por via oral, do experimento piloto 1.....	99

CAPÍTULO V

V.1	Composição centesimal da ração comercial para ratos Labina (Purina)...	102
V.2	Variação de peso e consumo diário de ração dos ratos após administração de espermina em diferentes doses e tempos de tratamento.....	107
V.3	Concentração de espermina na carne de ratos, após tratamento com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina por gavagem.	108
V.4	Valores de pH da carne de ratos, após tratamento com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina.....	109
V.5	Parâmetros de cor avaliados em carne de ratos, após tratamento com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina.....	110
V.6	Concentração de dienos conjugados na carne de ratos, nos dias 0, 3 e 6 após armazenamento sob refrigeração de animais tratados com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina.....	112
V.7	Concentração de malonaldeído na carne de ratos, nos dias 0, 3 e 6 após armazenamento sob refrigeração. Animais tratados com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina.....	113
V.8	Concentração de malonaldeído no fígado de ratos tratados com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina.....	115
V.9	Concentração de proteína carbonilada no fígado de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina.....	116

CAPÍTULO VI

VI.1	Reagentes utilizados no plaqueamento para análise de superóxido dismutase por ELISA.....	121
VI.2	Reagentes (µL) utilizados no plaqueamento para análise de óxido nítrico por ELISA.....	122
VI.3	Concentração de malonaldeído no fígado de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina.....	124
VI.4	Concentração de proteína carbonilada no fígado de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina.....	124
VI.5	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado e sangue de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina.....	125
VI.6	Atividade de catalase no fígado e sangue de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina.....	126
VI.7	Concentração de nitrato de sódio no sangue de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina.....	130
VI.8	Concentrações de parâmetros bioquímicos sanguíneos de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina.....	131

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

1	Estrutura química de algumas aminas.....	21
2	Interação dinâmica da espermina com ânions (DNA) e cátions (ferro). A) espermina se liga ao DNA por interações iônicas. B) situação intermediária, onde o íon ferro se aproxima do complexo. C) Complexo formado entre espermina e ferro, com alteração simultânea na conformação da espermina. Este complexo formado impede a ligação do ferro ao DNA, prevenindo a oxidação. Dados obtidos por cristalografia.....	28
3	Formação de aminas por descarboxilação de aminoácidos.....	34
4	Vias metabólicas para formação de aminas bioativas.....	34
5	Vias metabólicas para formação de espermina e espermidina.....	36
6	Manutenção de concentrações intracelulares de poliaminas em células epiteliais intestinais humanas. As concentrações intracelulares de poliaminas são mantidas pela síntese e pela captação de poliaminas endógenas do lúmen intestinal. Ocorre estímulo pela síntese de poliaminas (estímulo das atividades da ODC e S-adenosilmethionine descarboxilase - SAMDC), e captação através da membrana apical ou basolateral. Entretanto, a maioria das poliaminas lumenais parece ser absorvida passivamente através da rota paracelular e através da membrana basolateral, ou ainda, são metabolizadas antes de alcançar o sistema circulatório.....	38
7	Equações para a oxidação de aminas por aminoxidases na presença (1) e ausência de catalase (2).....	39
8	Metabolismo de putrescina, espermidina e espermina.....	40
9	Formação das espécies reativas do oxigênio.....	48
10	Produtos de formação das reações de Fenton e Haber-Weiss.....	50
11	Processo de formação de grupos carbonila, por oxidação de aminoácidos.....	54
12	Interações entre as enzimas antioxidantes endógenas.....	57
13	Reação do ácido tiobarbitúrico-TBA (1) e malonaldeído-MDA (2) resultando no complexo TBA-MDA.....	60

CAPÍTULO I

I.1	Perfil e teores de aminas bioativas e percentual de contribuição do teor de cada amina ao total de aminas bioativas no fígado suíno (A) e no testículo bovino (B)	65
-----	---	----

CAPÍTULO II

II.1	Porcentagem de contribuição de cada amina ao total de aminas em milho fresco, em conserva e seco (<i>Zea mays</i> L.). (EPD – espermidina, EPM – espermina, PUT – putrescina, CAD – cadaverina, HIM – histamina, AGM – agmatina, FEM – feniletilamina).....	70
II.2	Concentrações de poliaminas e de aminas bioativas total em milho fresco, em conserva e seco (<i>Zea mays</i> L.).....	71

CAPÍTULO III

- III.1 Placas de cromatografia em camada delgada preparadas com sulfato de cálcio para a separação de aminas: (A) presença de imperfeições sobre a superfície, e (B) placa com superfície uniforme..... 80
- III.2 Placas de CCD preparadas com sulfato e cálcio, para a separação de aminas. Testes com fase móvel na cromatografia em camada delgada: (A1 e A2) Amostras pouco eluídas, (A3) amostras retidas, (A4) formação de cauda, e (B) Separação das aminas, utilizando fase móvel propanol:água a 75% (3:1, v/v). Fase móvel: A1=etanol e metanol, 1:1; A2=etanol e propanol, 1:1; A3=acetona; A4=propanol e água 1:1..... 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM	- Agmatina
ALT	- Alanina aminotransferase
AST	- Aspartato aminotransferase
CAD	- Cadaverina
CC	- Cromatografia em coluna
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CIE	- <i>Centre International de L'Eclairage</i>
CEM	- Coeficiente de extinção molar
CETEA	- Comitê de Ética em Experimentação Animal
CG	- Cromatografia gasosa
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CNPGL	- Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite
CV	- Coeficiente de variação
DAO	- Diaminoxidase
DC	- Dienos conjugados
DHA	- Ácido docosapentaenóico
DL50	- Dose letal capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população
DNA	- Ácido desoxiribonucléico
DP	- Desvio-padrão
DNPB	- Dinitrofenilidrazina
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EP	- Experimento piloto
EPA	- Ácido eicosapentaenóico
EPD	- Espermidina
EPM	- Espermina
FAFAR	- Faculdade de Farmácia
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FEM	- Feniletilamina
ICEX	- Instituto de Ciências Exatas
IN	- Instrução Normativa
LBqA	- Laboratório de Bioquímica de Alimentos
LDH	- Lactato desidrogenase
LDL	- Lipoproteína de alta densidade
MAO	- Monoaminoxidase
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MÁX	- Máximo
MDA	- Malonaldeído
MÍN	- Mínimo
ODC	- Ornitina descarboxilase
OPA	- <i>orto</i> -Ftalaldeído
PAO	- Poliaminoxidase
PUT	- Putrescina
PV	- Peso vivo
RNA	- Ácido ribonucléico
RNA ^t	- Ácido ribonucléico transportador
SAM	- S-adenosil metionina
SAMDC	- S-adenosil metionina descarboxilase
SDS	- Dodecil sulfato de sódio

SOD	- Superóxido dismutase
SRT	- Serotonina
TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TBARS	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	- Ácido tricloroacético
TIM	- Tiramina
TRM	- Triptamina
UV	- Ultra-violeta
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
UFV	- Universidade Federal de Viçosa

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antioxidante *in vivo* da poliamina espermina. Foi pesquisada a presença desta amina em alimentos e subprodutos (fígado, testículo, casca de maracujá e milho) como fonte para extração e posterior uso em dieta animal. Diferentes tipos de milho foram analisados também para verificação do potencial deste alimento como fonte de espermina para a dieta humana. Utilizando-se cromatografia em coluna a espermina foi extraída a partir de extrato de fígado. Foi realizado experimento piloto com um número reduzido de ratos para adequação dos tratamentos e logo após, sessenta animais foram aleatoriamente distribuídos em seis tratamentos, nos quais foram fornecidas duas doses de espermina (27 e 54 mg/kg) durante dois períodos de tempo (seis e doze dias) e os respectivos grupos controle. Os resultados foram analisados com relação aos efeitos sobre as características de qualidade e a oxidação na carne, simulando análises realizadas em carne provenientes de animais de produção destinados à alimentação humana e a ação sobre o sistema de antioxidação endógeno de ratos. A espermina promoveu a oxidação da carne, verificada pelo aumento na formação de malonaldeído e dienos conjugados. Não houve diferença entre os grupos que receberam espermina e os controles, em relação ao coeficiente de eficácia alimentar e pH da carne. As concentrações de espermina foram maiores na carne de animais tratados durante seis dias, em relação aos demais grupos, entretanto, não houve influência das doses utilizadas. Animais tratados durante doze dias apresentaram carne mais escura e amarela, observada com relação aos parâmetros de cor L* e b*. O efeito da administração de espermina sobre o sistema antioxidante enzimático endógeno apresentou resultados satisfatórios, devido ao aumento das atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase nos grupos tratados, em relação aos grupos controle, sugerindo sua ativação nas condições avaliadas, o que contribui para a defesa do organismo contra lesões provocadas pela oxidação proveniente de espécies reativas de oxigênio. Os tratamentos aplicados indicaram maior oxidação protéica nos grupos que receberam espermina em relação aos grupos controle. Nenhum efeito dos tratamentos foi observado sobre as concentrações de indicadores enzimáticos de estresse oxidativo e óxido nítrico. Assim, em algumas situações foi verificado o efeito antioxidante da espermina *in vivo*.

Palavras-chave: aminas bioativas, espermina, antioxidante, rato, superóxido dismutase, catalase.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the antioxidant effect of polyamine spermine *in vivo*. Was investigated the presence of this amine in foods and by-products (liver, testis, passion fruit peel and corn) as a source for extraction and subsequent use in animal diets. Different types of maize were analyzed to verify the potential of spermine as a source for human diet too. Using column chromatography, spermine was extracted from liver extract. Pilot experiment was conducted with a small number of mice to adequacy of treatments and after sixty animals were randomly assigned to six treatments, which were given in two doses of spermine (27 and 54 mg / kg) during two periods of time (six and twelve days) and the respective control groups. The results were analyzed with respect to effects on quality and oxidation in meat, simulating the analysis performed in meat from farm animals intended for human consumption and action on the endogenous antioxidation system of rats. The spermine promoted oxidation of meat, verified by increased formation of malonaldehyde and conjugated dienes. There was no difference between the groups that received spermine and controls in relation to food efficiency ratio and pH of the meat. Spermine concentrations were higher in meat from animals treated for six days, compared to other groups, however, there was no influence of the doses used. Animals treated for twelve days had darker and yellow meat, with respect to the observed color parameters L* and b*. The effect of spermine administration on the endogenous enzymatic antioxidant system showed satisfactory results, due to increased activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase in treated groups compared to control groups, suggesting their activation under the conditions evaluated, which contributes to the defense the body against damage from oxidation caused by reactive oxygen species. The treatments showed increased protein oxidation in the groups receiving spermine compared to control groups. No treatment effect was observed on the enzyme concentrations of indicators of oxidative stress and nitric oxide. Thus, in some situations there was the antioxidant effect of spermine *in vivo*.

Keywords: bioactive amines, spermine, antioxidant, mouse, superoxide dismutase, catalase.

INTRODUÇÃO

Estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar alternativas para retardar o processo de oxidação causado pelas espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, que provoca danos irreversíveis às células. No organismo vivo, a oxidação causa o envelhecimento celular precoce e aumenta a incidência de algumas doenças. Sob o aspecto alimentar, a oxidação promove a deterioração dos alimentos como carnes e produtos cárneos, reduzindo sua qualidade nutricional e seu período de armazenamento (FENNEMA, 1996; FARACI & DIDON, 2004; VENTANAS et al., 2006).

No organismo vivo há diversos mecanismos intrínsecos de defesa contra reações de oxidação que incluem sistemas enzimáticos (catalase e superóxido dismutase). A enzima antioxidante superóxido-dismutase (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, enquanto a catalase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio (COHEN et al., 1996; FARACI & DIDON, 2004). Além do sistema enzimático, compostos de baixo peso molecular solúveis em água como as poliaminas também atuam no sistema antioxidante endógeno (KANNER et al., 1987; LØVAAS & CARLIN, 1991; SASAKI et al., 1996) e apresentam como principal característica a atuação tanto na fração lipídica quanto aquosa do organismo (DECKER & CRUM, 1991; LØVAAS, 1997).

Os antioxidantes presentes nos alimentos não podem reverter o processo de oxidação iniciado, mas podem inibi-lo ou retardá-lo (LØVAAS, 1991). Assim, é importante a rápida incorporação, de forma que a adição à dieta dos animais é uma estratégia interessante (GEORGANTELIS et al., 2007). A oxidação tem início logo após o abate dos animais devido à interrupção do sistema antioxidante natural (BUCKLEY et al., 1995; HOUBEN et al., 1998). Além disto, ocorre uma série de alterações bioquímicas no tecido muscular, que determinarão importantes características de qualidade na carne. Portanto, o termo carne refere-se ao produto final resultante deste processo de conversão, que ocorre em poucas horas (LAWRIE, 1974).

Durante o processamento de produtos cárneos, vários compostos oxidantes são produzidos, incluindo radicais livres (MERCIER et al., 1998; KJÆRSGÅRD et al., 2006; VENTANAS et al., 2006). A oxidação de lipídeos e proteínas presentes nas carnes causa, além da redução no valor nutricional, a deterioração no produto, frequentemente resultando em perda de qualidade devido a alterações de cor, textura e reduzido tempo de armazenamento, além de conferirem odor e sabor desagradáveis (MERCIER et al., 1998; KJÆRSGÅRD et al., 2006; VENTANAS et al., 2006).

A oxidação é um fenômeno espontâneo e inevitável com implicação direta no valor comercial tanto da própria carne como de todos os produtos que a partir dela serão formulados. Este processo pode ser determinado por análises laboratoriais, que determinam tanto produtos primários (dienos conjugados e hidroperóxidos) quanto secundários (aldeídos, ácidos e álcoois), provenientes da oxidação lipídica formados durante o armazenamento (FENNEMA, 1996; GEORGANTELIS et al., 2007).

A formação de dienos conjugados pode ser acompanhada por aumento na absorção à 234 nm e é indicativo de auto-oxidação (GUNSTONE & NORRIS, 1983; WHITE, 1995). O malonaldeído, um dialdeído, reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível. A sua condensação, com o ácido tiobarbitúrico, forma produtos que podem ser determinados por absorção no visível (532 nm) (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

Modificações oxidativas de estruturas protéicas têm um papel significativo na etiologia/progressão de doenças como Alzheimer e diabetes, sendo que o conteúdo de proteína carbonilada tem sido utilizado em diagnósticos (SHACTER, 2000; DALLE-DONNE et al., 2003). Esta pode ser determinada pela análise de carbonilas com formação de hidrazonas, que podem ser medidas espectrofotometricamente.

Devido à importância dos estudos de compostos antioxidantes para inibir a oxidação, este trabalho teve como objetivo geral a avaliação do efeito antioxidante da espermina *in vivo*, utilizando ratos como modelo experimental.

Os objetivos específicos foram (i) determinar o perfil e teores de amins bioativas em alimentos e subprodutos alimentares (casca de maracujá, testículo bovino e fígado suíno) como fonte de espermina para posterior extração e fornecimento a ratos; (ii) determinar o perfil e teores de amins bioativas em milho fresco, em conserva, seco, germinado e embrião extraído do cotilédone, como fonte de espermina para extração e fornecimento a ratos e para dieta humana; (iii) desenvolver processo de extração e purificação de espermina a partir de extratos de fígado suíno para posterior fornecimento a animais; (iv) avaliar preliminarmente a adequação de tratamentos com espermina (doses e tempos) e técnicas analíticas para verificação dos resultados em reduzido número de animais (experimento piloto) para posterior uso em número maior de animais; (v) avaliar o efeito oxidante e parâmetros de qualidade na carne proveniente de animais que receberam espermina por gavagem; e (vi) avaliar o efeito da espermina na indução do sistema antioxidante endógeno de ratos.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Aminas bioativas

1.1 Definição, classificação e estrutura

Aminas bioativas ou biologicamente ativas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixa massa molecular (Figura 1). São também definidas como compostos nitrogenados, derivados da amônia (NH_3) em que um, dois ou três átomos de hidrogênio da molécula foram substituídos por grupos alquila ou arila (grupos orgânicos que apresentam valência livre em átomo de carbono saturado e em anel benzênico, respectivamente). As aminas são formadas por processos bioquímicos e participam de funções metabólicas e fisiológicas importantes nos organismos vivos, desempenhando diversas atividades biológicas, inclusive com comprovada ação antioxidante. São encontradas em alimentos de origem animal, vegetal bem como em alimentos fermentados (SOLOMONS, 1983; HALÁSZ et al., 1994; CINQUINA et al., 2004; GLÓRIA, 2005; MAYER et al., 2010).

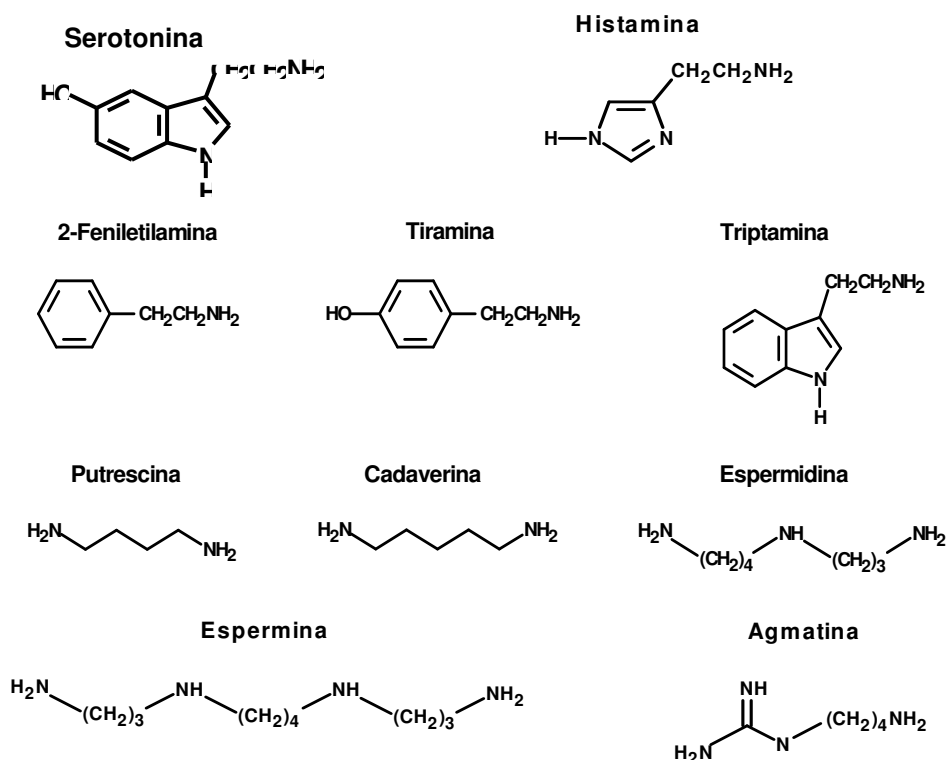


Figura 1 - Estrutura química de algumas aminas.

Fonte: GLÓRIA (2005).

Com relação à estrutura química as amins podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina) e aromáticas (tiramina, feniletilamina, histamina e triptamina). Em relação à função que exercem, podem ser classificadas em catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e como imidazolaminas (histamina) (SMITH, 1981; BARDÓCZ, 1995; SILLA-SANTOS, 1996).

A denominação das amins bioativas, em sua maioria, é função dos aminoácidos precursores, como por exemplo, a histamina, tiramina e triptamina originam-se da histidina, tirosina e triptofano, respectivamente. Os nomes cadaverina e putrescina, originam-se do fato destas amins terem sido encontradas em produtos em decomposição ou putrefação. Já a espermina e a espermidina se referem ao fluido seminal, de onde foram isoladas pela primeira vez. Afirma ainda a autora que as amins bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química, da via biossintética e da função que exercem. Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, se classificam em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina e agmatina) (GLÓRIA, 2005).

Com relação ao número de N substituintes podem ser classificadas em primárias ($R-NH_2$), secundárias (R_1R_2NH) ou terciárias ($R_1R_2R_3N$), quando ocorre a substituição de um, dois, ou três hidrogênios da molécula de amônia por grupos orgânicos (alquila ou arila), respectivamente. Quando se usa os prefixos di e tri, indica-se que a amina é secundária ou terciária, respectivamente, e com grupos substituintes iguais. As amins podem ser ainda classificadas como simples quando os grupos alquila ou arila são iguais, ou mistos se estes forem diferentes. Quando os grupos são diferentes, estes são denominados sucessivamente, do menor para o maior, terminando o nome do composto com o sufixo "amina". Algumas vezes indica-se o prefixo amino, indicando a posição e o nome do grupo hidrocarbônico (SOLOMONS, 1983).

Assim, a estrutura molecular de algumas amins recebe a seguinte nomenclatura: 1,4-diaminobutano (putrescina), *N*-(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano (espermidina) e *N,N'*-bis(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano (espermina), 2-(4-imidazolil)etilamina (histamina), 1,5-diaminopentano (cadaverina) e 4-aminobutil-guanidina (agmatina) (MERCK, 1983).

Quanto à via biossintética, as amins se classificam em naturais, quando são formadas durante a biosíntese "*in situ*", ou seja, a partir de uma molécula mais simples,

à medida que são requeridas (espermina e espermidina) ou podem estar armazenadas nos mastócitos e basófilos (histamina). Por outro lado, as aminas biogênicas são formadas por reações de descarboxilação conduzidas por descarboxilases bacterianas, sendo esta a principal via de formação de aminas nos alimentos (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) (SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2005; MAYER et al., 2010).

1.2 Propriedades físicas

As aminas são bases relativamente fracas e moderadamente polares, quando comparadas aos íons hidróxido. A polaridade decresce no sentido primária, secundária, terciária e, conseqüentemente, os pontos de ebulição decrescem no mesmo sentido (Tabela 1). Ocorre a formação de ligações de hidrogênio, entretanto, estas são fracas e, por isso, as aminas apresentam baixo ponto de ebulição, pois, além de precisar de pouca energia para evaporar, estão pouco ligadas umas às outras. Entretanto, as aminas primárias e secundárias têm pontos de ebulição maiores que o das aminas terciárias, pois as primeiras formam ligações de hidrogênio entre si e com a água, enquanto as aminas terciárias formam ligações de hidrogênio apenas com a água (SOLOMONS, 1983).

Tabela 1 - Ponto de ebulição de algumas aminas bioativas

Amina	Ponto de ebulição (°C)
Putrescina	158 a 160
Cadaverina	178 a 180
Histamina	209 a 210
Espermidina	128 a 130
Espermina	141 a 142

Fonte: Merck (1983).

A maioria das aminas é solúvel em água. Aquelas de peso molecular menor são perfeitamente solúveis em água. Tanto aminas solúveis quanto insolúveis em água reagem com soluções ácidas formando sais de amina, enquanto aminas primárias aromáticas formam sais de diazônio. Como acontece com o NH_4OH , os hidróxidos das aminas são instáveis e só existem em solução aquosa. Já os sais das aminas são sólidos brancos cristalinos e solúveis em água, como os sais de amônio (MERCK, 1983; SOLOMONS, 1983).

As poliaminas são policátions flexíveis e exibem 2, 3 ou 4 cargas positivas em condições fisiológicas. Podem girar em torno das ligações C-C ou C-N conferindo flexibilidade conformacional (BARDÓCZ et al., 1993; LØVAAS, 1997). Ao contrário de íons metálicos, os quais têm cargas localizadas, as poliaminas possuem cargas positivas distribuídas ao longo de suas cadeias carbônicas que podem interagir formando pontes com estruturas de cargas negativas (BARDÓCZ, 1995).

1.3 Funções

Algumas aminas podem desempenhar funções psicoativas e vasoativas. As psicoativas, como histamina, serotonina, dopamina, adrenalina e noradrenalina, atuam no sistema nervoso central. As aminas vasoativas atuam direta ou indiretamente no sistema vascular, podendo ser vasoconstritoras ou vasodilatadoras. Tiramina, feniletilamina, isoamilamina, dopamina, adrenalina, noradrenalina e triptamina causam um aumento na pressão sanguínea por restringir o sistema vascular e aumentar a velocidade e a força da contração cardíaca. A histamina reduz a pressão sanguínea por causar vasodilatação. A serotonina inibe a secreção gástrica, estimula o músculo liso, é vasoconstritora ou vasopressora (LIMA & GLÓRIA, 1999).

As poliaminas apresentam funções diferenciadas nas células, onde estão presentes em elevadas concentrações e têm seus teores aumentados em tecidos em crescimento rápido (SILLA-SANTOS, 1996; SILVA & GLÓRIA, 2002). Estão envolvidas nas etapas iniciais de síntese e de regulação do DNA, RNA e proteínas, sendo essenciais ao crescimento e proliferação celular (SILVA & GLÓRIA, 2002). Além disso, estão envolvidas na estabilização do RNA transportador e na redução da taxa de degradação do RNA (SMITH, 1981; BARDÓCZ, 1995; SILLA-SANTOS, 1996). São ainda importantes na regulação das funções dos fosfolípidios, estabilizando as funções dos cromossomos e alterando a permeabilidade das membranas (DROLET et al., 1986; SMITH et al., 1996).

A ação sobre a alteração da permeabilidade da membrana fosfolipídica ocorre devido a mimetização da ação do íon cálcio. A espermina, por ser um cátion, mimetiza a ação do cálcio, que é um outro cátion. A bomba de cálcio, por transporte ativo, está envolvida na regulação e estabilização dos fosfolípidios (ânions) da membrana celular, ocorrendo então, interações eletrostáticas. Quando tem muito cálcio dentro da célula a membrana torna-se mais rígida, diminuindo sua permeabilidade. Assim, quando a

espermina compete pelos sítios de ligação do cálcio, passa a ter a capacidade de controlar a permeabilidade da membrana (LØVAAS, 1997).

Da mesma forma, por serem policátions, a espermidina e a espermina têm afinidade por outros compostos aniônicos, aos quais se ligam fortemente, através de interações eletrostáticas. Desta forma, passam a regular também a estabilidade dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e às partículas que os contêm, aumentando a estabilidade da dupla hélice frente à desnaturação térmica e às condições ácidas e alcalinas (SILLA-SANTOS, 1996; LÖSER, 2000; SEILER & RAUL, 2005). Além disso, a ligação com proteínas e fosfolipídios de membrana, que também são macromoléculas carregadas negativamente, faz com que exerçam importantes funções de regulação nas enzimas associadas, promovendo, assim, sinalização intracelular (TADOLINI, 1988; MOINARD et al., 2005; HÄKKINEN et al., 2007).

De acordo com BARDÓCZ (1995), a função mais importante das poliaminas, a qual não pode ser realizado por qualquer outro cátion, é a de exercer papel de mensageiras secundárias, mediando a ação de todos os hormônios conhecidos e dos fatores de crescimento. Os teores de poliaminas na célula afetam diretamente a ocorrência da expressão de genes em resposta à estimulação do crescimento e à inibição de agentes de crescimento. As poliaminas afetam a expressão em nível de transcrição e esse efeito é mais provável devido à interação da poliamina com o DNA e/ou fatores de transcrição das proteínas (LINDEMOSE et al., 2005).

Segundo MOINARD et al. (2005), as poliaminas agem na proliferação celular interagindo com uma proteína nuclear, a qual tem papel essencial na regulação de vários genes envolvidos no crescimento e morte celular. Além disso, desempenham funções celulares exclusivas, como iniciação e controle da tradução, podendo ainda estimular a associação de subunidades de ribossomos, estabilizar a estrutura do RNAt e reduzir a taxa de degradação do RNA (BARDÓCZ, 1995).

As poliaminas aumentam a resistência do RNA à ação da ribonuclease por se ligarem aos grupamentos fosfatos adjacentes do polinucleotídeo, protegendo as ligações internucleotídeas. Por outro lado, em elevadas concentrações, a espermina e a espermidina funcionam como inibidores da síntese de RNA, provavelmente devido à precipitação dos ribossomos (BARDÓCZ, 1995; MEDINA et al., 2003).

A estabilização, bem como a interação com o RNAt e os ribossomos são aspectos importantes da ação das poliaminas na síntese protéica *in vitro*. Embora, uma quantidade crítica de Mg^{++} seja necessária para a manutenção da integridade estrutural e funcional dos ribossomos, grande parte da necessidade de cátions di ou polivalentes

é preenchida pelas poliaminas *in vivo*. Outra semelhança entre as poliaminas e o Mg^{++} é a facilidade com que ambos compartilham função comum, como ocorre na associação dos ribossomos com as membranas do retículo endoplasmático (BARDÓCZ, 1995).

Uma vez que a renovação celular no epitélio intestinal é maior que em outras partes do corpo, as poliaminas são de vital importância para a estrutura e função de todo o trato digestivo. As poliaminas são essenciais para a manutenção da alta atividade metabólica no funcionamento saudável do intestino, por estarem envolvidas no reparo de danos intestinais causados por componentes deletérios dos alimentos e microrganismos (BARDÓCZ et al., 1993; DELOYER et al., 2001).

As poliaminas provenientes dos alimentos, além do papel potencial no crescimento e desenvolvimento do sistema digestivo de mamíferos recém-nascidos, têm se mostrado necessárias para a manutenção do trato digestivo dos adultos (DELOYER et al., 2001).

Em vegetais, as poliaminas participam na floração, no desenvolvimento do fruto, na resposta ao estresse e inibem a produção de etileno e a senescência. Participam também da síntese de metabólitos secundários de interesse biológico, como a nicotina e alcalóides (LIMA & GLÓRIA, 1999; GOYAL & ASTHIR, 2010).

KHAN et al. (1992) avaliaram a função de algumas poliaminas (espermina e espermidina) na proteção *in vitro* dos ácidos nucleicos contra danos causados pelo oxigênio singlete. Os autores sugeriram que a função primária das poliaminas seria a de proteger a síntese de DNA e RNA nas células, função esta essencial para o desenvolvimento e manutenção do organismo.

É também relatada a atividade antiinflamatória da espermina (LØVAAS, 1995; SODA et al., 2009). LØVAAS & CARLIN (1999) informaram que a ação antiinflamatória esteja associada a atividade supressora sobre a permeabilidade vascular local, diminuindo o edema, além de suprimir mediadores inflamatórios e a proliferação de linfócitos e granulócitos. SODA et al. (2009), acreditam que diversas doenças podem ser evitadas pelo consumo de alimentos ricos em compostos antiinflamatórios. Os autores estudaram três concentrações de espermina (2,89; 3,24 e 7,57 mg/100 g de dieta) adicionada à dieta de ratos com idade de 24 semanas, durante 26 semanas e observaram menor incidência de glomeruloesclerose nos animais tratados com a maior dose.

Assim sendo, as poliaminas são consideradas componentes indispensáveis à todas as células vivas e essenciais à renovação, crescimento e metabolismo de todos os organismos (SILLA-SANTOS, 1996).

1.3.1 Poliaminas antioxidantes

Além das funções de renovação e crescimento celular, muitos pesquisadores estudaram as poliaminas em sistemas biológicos e comprovaram sua capacidade antioxidante, atuando de diferentes formas. Apesar do mecanismo de antioxidação não ser totalmente conhecido, sabe-se que as poliaminas protegem as células da ação das espécies reativas do oxigênio (RIDER et al., 2007). Assim, as poliaminas atuam retardando o processo de auto-oxidação (TABOR et al., 1961; TADOLINI et al., 1984; LØVAAS, 1991; MARZABADI & LØVAAS, 1996), inibem os danos causados pelos radicais livres (KHAN et al., 1992) e atuam como neuroprotetoras (HÁ et al., 1998a; ASSIMAKOPOULOS et al., 2010).

Segundo LØVAAS (1997), a sugestão de que poliaminas atuam como antioxidantes biológicos surgiu de abordagens experimentais de diferentes linhas de pesquisa, como processamento de alimentos, físico-química, pesquisa médica e biologia celular.

A espermina apresenta propriedades farmacodinâmicas muito importantes em relação a outras substâncias com propriedades antioxidantes devido ao fato de que pode interagir tanto com sistemas aquosos quanto orgânicos. Desta forma, sua ação torna-se muito mais eficiente por poder penetrar com facilidade em uma ampla variedade de meios (MARZABADI & LØVAAS, 1996).

LØVAAS (1991) acredita que substâncias ácidas podem ser consideradas pró-oxidantes e catalisadoras da oxidação lipídica e, por serem bases orgânicas, as amins atuam como antioxidantes naturais, assim, propôs que o efeito antioxidante das poliaminas é devido à neutralização de ácidos, os quais são pró-oxidantes por estimular a decomposição de radicais peróxidos ou por promover um aumento na solubilidade de metais traços, estimulando a reação de Fenton.

De acordo com LØVAAS & CARLIN (1991), a espermina tem pelo menos dois mecanismos que controlam a ação oxidante. O primeiro seria inibindo a geração e o transporte de radicais superóxido e o segundo seria a formação de um produto não reativo quelado com ferro, prevenindo, assim, a geração de radicais hidroxila destrutivos.

Outro sistema de antioxidação sugerido para a ação das poliaminas é a proteção de vesículas de fosfolípidios contra produtos da reação de Fenton produzidos por peróxido de hidrogênio e superóxido (TADOLINI et al., 1984; LØVAAS & CARLIN, 1991) e proteção do DNA contra diversos agentes incluindo compostos alquilantes (MACKINTOSH & PEGG, 2000).

DROLET et al. (1986) observaram que espermina, espermidina, putrescina e cadaverina são eficientes sequestradoras de radicais livres gerados em vários sistemas químicos e enzimáticos *in vitro*. Da mesma forma, OUANNES & WILSON (1968) relataram que as aminas secundárias e terciárias são conhecidas por atuarem como captadores físicos do oxigênio singlete. Neste processo, há pouca reação química entre as aminas e os radicais livres, garantindo pouca destruição das aminas durante este processo e, portanto, mantendo-as presentes no alimento e não gerando a formação de compostos tóxicos derivados (KHAN et al., 1992).

De forma geral, LØVAAS & CARLIN (1991) e LØVAAS (1991; 1995; 1997) acreditam que a ação antioxidante das poliaminas ocorra devido a sua capacidade de se ligar a íons metálicos como o Fe^{2+} , responsável pela catalisação das reações de oxidação. A ligação das poliaminas aos íons metálicos ocorre nos grupamentos amino protonados da molécula. Sendo assim, espermina tem maior capacidade de ligação em relação à outras poliaminas. A capacidade de estabilização de membranas e DNA, entretanto, ocorre devido a interação eletrostática entre as aminas e estas estruturas aniônicas (Figura 2).

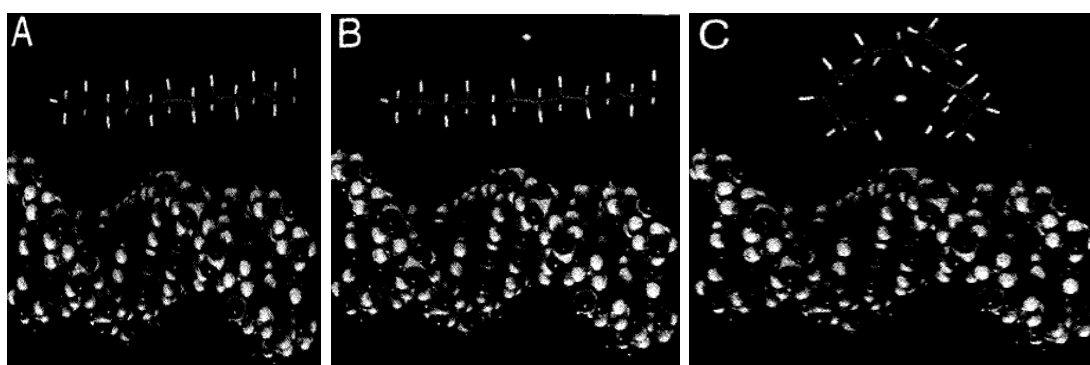


Figura 2 - Interação dinâmica da espermina com ânions (DNA) e cátions (ferro). A) espermina se liga ao DNA por interações iônicas. B) situação intermediária, onde o íon ferro se aproxima do complexo. C) Complexo formado entre espermina e ferro, com alteração simultânea na conformação da espermina. Este complexo formado impede a ligação do ferro ao DNA, prevenindo a oxidação. Dados obtidos por cristalografia.

Fonte: LØVAAS (1997).

1.3.1.1 Efeito antioxidante no organismo

PAVLOVIC et al. (1992) estudaram a ação das poliaminas espermina e espermidina e da diamina putrescina em suspensões lipossômicas de fosfolípidos e homogenatos de fígado adicionados de Fe^{2+} . Utilizando quimioluminescência e teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, comprovaram que essas aminas têm capacidade de sequestrar radicais de oxigênio e/ou radicais lipídicos (principalmente o radical peroxila).

Avaliando a atividade de superóxido dismutase, glutatona reduzida e o grau de oxidação lipídica pelo teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, MATKOVICS et al. (1993) comprovaram os efeitos antioxidantes das poliaminas e putrescina, em concentrações variando de 10^{-7} a 10^{-2} M. As propriedades antioxidantes foram analisadas em eritrócitos e em tecidos cerebral e cardíaco submetidos a estresse com Fe^{2+} e H_2O_2 .

A atuação da espermina na proteção da epiderme contra danos oxidativos provocados pela radiação ultravioleta (UV) foi estudada por LØVAAS (1995). A hipótese foi substantiada pelo fato da ornitina descarboxilase, que controla a taxa de biossíntese da espermina ser induzida pela radiação ultravioleta do tipo B (UVB), pela presença desta amina em altos níveis na epiderme e seu efeito antioxidante. É sabido que a exposição crônica à radiação ultravioleta causa aumento na deposição de ferro na pele, então, o referido autor sugere que a espermina, com sua habilidade de quelar metais, proteja a pele contra a radiação.

MARZABADI & LØVAAS (1996) compararam o efeito antioxidante da espermina e da vitamina E na prevenção do estresse oxidativo de células do miocárdio e verificaram que níveis fisiológicos de espermina reduziram o acúmulo de ferro e de lipofuscina em 20%, desta forma, segundo os autores, o efeito antioxidante das aminas pode ser comparado ao já reconhecido efeito antioxidante da vitamina E.

De acordo com DAS & MISRA (2004), as aminas cadaverina, putrescina, espermidina e espermina são capazes de sequestrar radicais superóxido *in vitro* quando presentes em altas concentrações, mas não em concentrações fisiológicas (0,5; 1 e 2 mmol/L). No entanto, mesmo em baixas concentrações (1,5 mM) são potentes sequestradoras do radical hidroxila produzidos pela reação de Fenton. Além disso, espermina e espermidina agem efetivamente como supressoras do oxigênio singlete.

TANG & NEWTON (2005) pesquisaram o efeito das poliaminas na proteção de culturas de calo e plântulas do pinheiro Virginia (*Pinus virginiana* Mill.) contra danos

oxidativos induzidos pelo estresse salino. Os autores verificaram mudanças no crescimento celular e aumento na atividade das enzimas antioxidantes, ascorbato peroxidase, glutathione redutase e superóxido dismutase, pelas poliaminas nos tecidos durante a adaptação ao sal.

GABORIAU et al. (2005) compararam as propriedades antioxidantes das poliaminas naturais com as de seus análogos estruturais, os quais possuem o grupamento dimetilsilano [-Si(CH₃)₂]. Foram avaliados os efeitos contra ânions superóxidos e radicais peroxila. Os autores concluíram que a ação da hexamina foi similar a da espermina, conferindo, assim, ação antioxidante.

Em concentrações similares à fisiológica, a espermina pode prevenir o inchaço e colapso nas células, os quais induzem a transição de permeabilidade mitocondrial, em hepatócitos de ratos. Este efeito ocorre devido à sua ação de sequestrar radicais livres, na ausência de Ca²⁺, inibindo a produção de peróxido de hidrogênio e mantendo grupos glutathione e sulfidril em níveis normais reduzidos. Desta forma, a concentração crítica de tióis mantém-se reduzida, a qual é responsável (quando em altas concentrações) pela abertura dos poros. Este mecanismo previne, portanto, a oxidação das mitocôndrias. A espermina também protege a mitocôndria dos hepatócitos, sob acentuada oxidação de grupos tiol e glutathione, da oxidação lipídica e protéica, provavelmente pela eliminação do radical hidroxila (SAVA et al., 2006).

Avaliando injúrias oxidativas causadas por peróxido de hidrogênio, RIDER et al. (2007) verificaram a proteção mediada pelas poliaminas espermidina e espermina, utilizando fibroblastos de embriões de ratos mutantes, deficientes em espermina sintase. Os autores confirmaram a importância do papel das poliaminas celulares na proteção às células expostas às espécies reativas de oxigênio. Entretanto, os resultados revelaram que concentrações fisiológicas de espermidina e espermina protegem as células, mas, ao contrário do que se imaginava, baixas concentrações podem ser mais potentes, sendo que a espermina mostrou-se mais potente que a espermidina. Este resultado é semelhante aos estudos que comprovaram a maior habilidade da espermina em sequestrar radicais peroxila (FUJISAWA & KADOMA, 2005) e aqueles que demonstraram que a espermidina é mais ativa que a espermina apenas quando em concentrações mais elevadas (LØVAAS, 1991; NEWTON et al., 1997; HÁ et al., 1998b).

O catabolismo de poliaminas elevou o estresse oxidativo em camundongos transgênicos, que apresentavam reduzida atividade na expressão da enzima catabolizadora de poliaminas (*N*¹-acetiltransferase). Este resultado foi observado

devido ao aumento na concentração de putrescina e à redução na concentração de espermina e espermidina, além de redução na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, contrária ao resultado esperado (CERRADA-GIMENEZ et al., 2011).

1.3.1.2 Efeito antioxidante em alimentos

LØVAAS (1991) comparou o efeito dos antioxidantes α -tocoferol, BHT, TBHQ, galato de octila, palmitato de ascorbila e etoxiquinina com o efeito antioxidante das poliaminas (espermina, espermidina e putrescina) na estabilização de óleo de peixe e concentrados ricos em ácidos graxos polinsaturados, tanto à temperatura ambiente quanto após aquecimento (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito relativo dos antioxidantes no tempo de indução (h) da oxidação em compostos contendo ácidos graxos polinsaturados (AGPI)

Antioxidante	Óleo cru a 100 °C (20% AGPI)	Óleo de peixe* a 70 °C (30% AGPI)
α -tocoferol	3,4 (0,8)	-
BHT	3,6 (1,1)	-
Palmitato de ascorbila	18,3 (2,1)	-
Etoxiquinina	27,6 (2,0)	-
Espermina	100** (8,1)	100 (7,6)
Espermidina	74,5 (6,1)	61(4,8)
Putrescina	-	23 (3)
Tempo de indução: controle	2,1 (0,4)	6,0 (0,8)
Tempo de indução: espermina	85,2 (6,9)	52,6 (4,0)

*Ésteres metílicos dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosapentaenóico (DHA), na concentração de 30% de óleo de peixe. ** Efeito antioxidante expresso em tempo de indução relativo para espermina. Concentração de todos os antioxidantes: 2 mM. Análises realizadas no Rancimat®.
Fonte: Adaptado de LØVAAS (1991).

A eficiência do efeito antioxidante foi avaliada através da utilização tanto do equipamento Rancimat®, quanto pela detecção de peróxidos, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, por espectrofotometria e por cromatografia gasosa, para detecção de ácidos graxos polinsaturados. O autor verificou que o efeito das poliaminas foi maior comparado aos outros antioxidantes e dentre estas, a espermina foi a que apresentou os melhores resultados, inclusive em relação ao tempo de indução. LØVAAS (1991) ainda observou que o efeito antioxidante está relacionado ao número de grupamentos amina e, desta forma, a espermina seria mais eficiente que a espermidina e esta mais que a putrescina. Além disso, a espermina foi capaz de inibir a polimerização do óleo e apresentou maior efeito estabilizante em relação ao α -tocoferol e pigmentos carotenóides. Da mesma forma, SILLA-SANTOS (1996) relatou que as poliaminas

espermina e espermidina inibiram a oxidação de ácidos graxos polinsaturados e também correlacionou este efeito ao número de grupamentos amino.

Em trabalho utilizando óleo polinsaturado, a atividade antioxidante da espermina, assim como o seu efeito sinérgico com o α -tocoferol foram determinados (OGAWA et al., 1996). Os autores concluíram que a espermina isoladamente não produziu efeito antioxidante, mas apresentou efeito sinérgico com o α -tocoferol, por doar hidrogênio ao radical tocoferoxila; ao doar este hidrogênio, a amina sequestra um radical peroxila do lipídio e forma um complexo lipídico que estabiliza a reação.

Propriedades antioxidantes da espermina foram determinadas por SASAKI et al. (1996) utilizando tecido espermático de salmão. Os autores extraíram a parte hidrossolúvel deste tecido e avaliaram suas diversas frações contendo, além da espermina, também putrescina, hipoxantina, xantina e glutatona, através da atividade dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico. Os resultados apresentados mostraram que isoladamente ou a combinação de algumas destas substâncias não apresentaram o mesmo efeito que a combinação de todas as substâncias juntas. Assim, os autores concluíram que outro componente não identificado possa ter causado o maior efeito antioxidante, entretanto, não puderam confirmar a natureza deste composto.

Em aveia (*Avena sativa*), BORREL et al. (1997) observaram diminuição na produção de malonaldeído pela reação dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico e inibição da atividade da lipoxigenase, após imersão das folhas sem epiderme em solução tampão contendo espermina e espermidina. Tais resultados sustentam a alegação de que a inibição da peroxidação lipídica pelas poliaminas é um dos mecanismos responsáveis pelos seus efeitos anti-senescência.

OLSEN et al. (1999) adicionaram ácidos graxos polinsaturados, α -tocoferol (70 ou 300 mg/Kg) e espermina (0 ou 250 mg/Kg) à dieta de peixes (*Salvelinus alpinus* L.), para verificar a composição de ácidos graxos na carne destes peixes. A resposta aos tratamentos foi avaliada pela composição de ácidos graxos da carne, além de avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) na carne e fígado, parâmetros bioquímicos séricos e enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Foi também determinado o teor de espermina na carne e fígado. Os autores verificaram que nenhum dos tratamentos apresentou influência sobre as análises realizadas. Os autores concluíram que a espermina, por ser naturalmente produzida pelo organismo, pode ser utilizada como antioxidante em alimentos com vantagens em termos de eficiência e segurança, por ser uma substância natural.

MENDONÇA (2009) também pesquisou a estabilidade oxidativa da espermina em óleo de soja, utilizando o equipamento Rancimat[®], concluindo que esta amina apresentou capacidade antioxidante com aumento linear no intervalo de concentrações estudadas (0,002 a 0,012 g/100 g) e temperaturas avaliadas (100 e 120 °C).

Assim como óleos vegetais, as dietas para peixes possuem altas concentrações de ácidos graxos polinsaturados, pois são compostas basicamente por ingredientes marinhos e, portanto, altamente susceptíveis à oxidação (HAMRE et al., 2010). Por isso, é comum a adição de antioxidantes visando preservá-las durante a estocagem. A estabilidade oxidativa da espermina foi avaliada quando adicionada à dieta de peixes, por HAMRE et al. (2010), mas os resultados indicaram que ela não apresentou efeito antioxidante na concentração utilizada (500 mg/kg), entretanto, esta foi maior do que as relatadas por outros autores (LØVAAS, 1991 e OLSEN et al., 1999, respectivamente 200 e 250 mg/kg), que preconizaram baixas doses para obtenção de efeito antioxidante.

TAKLE & MOERKOERE (2008) patentearam o uso de espermina como antioxidante em alimentos cárneos como pescados, aves e bovinos. Os pesquisadores utilizaram soluções de espermina em concentrações variando de 1 a 2000 nmol/L, nas quais as amostras foram imersas. Foi verificado que além da efetividade como antioxidante, a espermina previne perdas de líquido durante o descongelamento, mantendo a textura e também evita alterações na coloração. Os autores ressaltaram que a quantidade de espermina adicionada deve ser suficiente para preservar o alimento, sem que seja percebido sabor ou odor desagradável.

Adicionada à carne de peixe picada (*Trachurus trachurus*) a espermina apresentou pouca atividade antioxidante sobre lipídeos e proteínas, em estudo realizado por EYMARD et al. (2010). Os autores atribuíram este resultado ao fato da espermina ter sido utilizada em solução e sugeriram que a aplicação de espermina diretamente sobre o produto poderia apresentar resultados mais satisfatórios.

De acordo com estudos relatados anteriormente, as poliaminas possuem importante potencial antioxidante, sendo a espermina a mais promissora delas.

1.4 Síntese

A biosíntese de aminas (Figura 3) ocorre durante o processo metabólico normal em todos os organismos vivos, através da hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos, sendo esta última, a

principal via de formação das aminas biogênicas (SHALABY, 1996; KOMPRDA et al., 2001). Assim, no alimento, as aminas biogênicas são formadas como resultado da atividade enzimática de microrganismos descarboxilase positivos sobre aminoácidos, em condições favoráveis à atividade destas enzimas (HALÁSZ et al., 1994; BARDÓCZ, 1995).



Figura 3 - Formação de aminas por descarboxilação de aminoácido.

Fonte: GLÓRIA (2005).

A síntese de histamina, tiramina, triptamina e cadaverina ocorre via descarboxilação dos respectivos aminoácidos precursores, histidina, tirosina, triptofano e lisina, respectivamente, por atividade enzimática (Figura 4) (HALÁSZ et al., 1994; KOMPRDA et al., 2001).

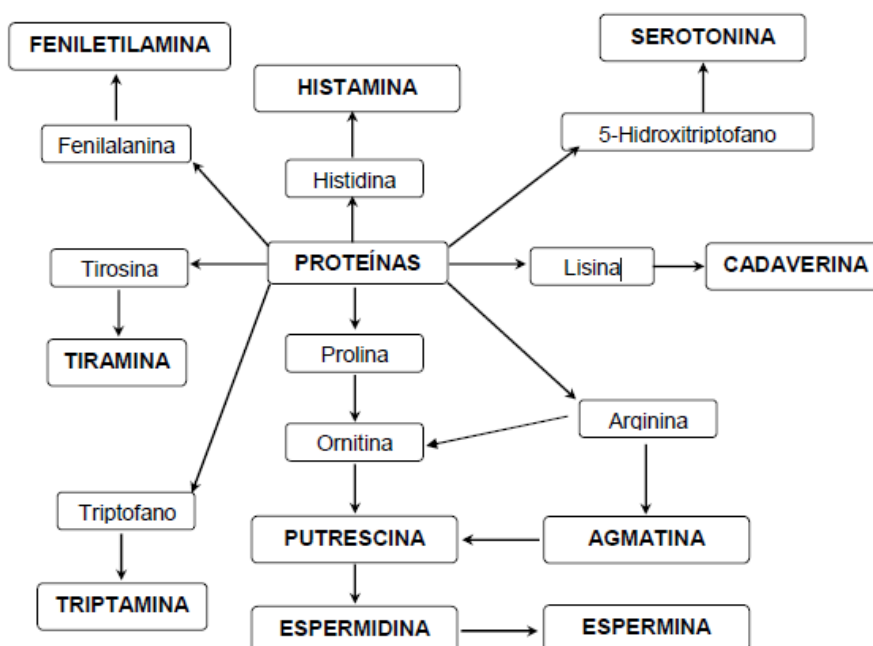


Figura 4 - Vias metabólicas para formação de aminas bioativas.

Fonte: NAGATSU (1991); HALÁSZ et al. (1994).

Na biosíntese de catecolaminas a tirosina é transformada pela tirosina hidroxilase no hidroxiaminoácido correspondente, 3,4-dihidroxitirósina ou dopa, que é preferencialmente descarboxilado por aminoácido aromático descarboxilase,

formando a dopamina. A dopamina pode ser transformada em norepinefrina por dopamina- β -hidroxilase e em epinefrina por feniletilamina-*N*-metiltransferase (NAGATSU, 1991).

Na síntese da serotonina, o triptofano é inicialmente transformado pela triptofano hidroxilase no hidroxiaminoácido correspondente 5-hidroxitriptofano, que é descarboxilado em 5-hidroxitriptofano ou serotonina (NAGATSU, 1991).

A proteólise autolítica ou bacteriana leva à ocorrência de aminoácidos livres e estes podem sofrer descarboxilação por enzimas provenientes de microrganismos, com conseqüente formação de aminas bioativas. Entretanto, a produção de aminas biogênicas pode ser influenciada pelo pH, temperatura e presença de oxigênio (SILLA-SANTOS, 1996).

De acordo com HALÁSZ et al. (1994), a redução do potencial redox estimula a produção de histamina. Segundo o mesmo autor, a histamina, entretanto, está presente nos mastócitos e, portanto, pode ser encontrada em pequenas quantidades nos músculos, em condições fisiológicas normais. De acordo com SILLA-SANTOS (1996) quando o meio está ácido, pH na faixa de 4,0 a 5,5, a concentração de íons H⁺ é prejudicial às bactérias, porém ótimo para a formação de aminas. Desta forma, as bactérias desencadeiam um mecanismo de proteção baseado na descarboxilação, a fim de promover a síntese de aminas para neutralizar o pH (KALÁČ & GLÓRIA, 2009).

Acreditava-se que as poliaminas eram produzidas somente *in situ*, uma vez que todas as células são capazes de sintetizá-las (SMITH, 1985). Porém, HALÁSZ et al. (1994) observaram que, em alguns casos, a capacidade das células e órgãos de sintetizarem poliaminas é insuficiente para satisfazer os requerimentos totais. Estudos mais recentes sugeriram que as poliaminas provenientes de fontes extracelulares são também de fundamental importância para os processos metabólicos (BARDÓCZ et al., 1993; MEDINA et al., 2003; KALAC & KRAUSOVÁ, 2005). Assim, as três fontes formadoras de poliaminas estabelecidas são: biossíntese *in situ* a partir de aminoácidos, ingestão direta por meio da dieta, além da síntese e liberação por bactérias residentes no trato gastrointestinal (BARDÓCZ, 1995).

Os precursores para a síntese de poliaminas são os aminoácidos ornitina e arginina, sendo a putrescina um intermediário obrigatório. A formação da putrescina em animais e fungos ocorre via descarboxilação da ornitina pela enzima ornitina descarboxilase. Células bacterianas possuem uma enzima alternativa, a qual descarboxila a arginina e forma a agmatina. Em vegetais, pode ocorrer a síntese da putrescina tanto via agmatina quanto via ornitina. Entretanto, uma via adicional

sugerida para a síntese da putrescina seria a da citrulina (BARDÓCZ, 1995; LIMA & GLÓRIA, 1999; KOMPRDA et al., 2001).

Para a formação de espermina e espermidina (Figura 5), um grupo aminopropil derivado da metionina via *S*-adenosilmetionina (SAM), é adicionado à putrescina, para formar espermidina e a esta última para formar a espermina. Uma série de reações envolvendo transferases, descarboxilases e sintetases acontecem paralelamente, dentre elas, espermina e espermidina sintetases e SAM descarboxilase (GLÓRIA, 2005; KALAČ & KRAUSOVÁ, 2005; KALAČ & GLÓRIA, 2009).

De acordo com HIBASAMI et al. (1980), na síntese de poliaminas em células eucariotas há o envolvimento de quatro enzimas (ornitina descarboxilase, *S*-adenosilmetionina descarboxilase e duas aminopropiltransferases) sendo a atividade relativa destas enzimas determinante da proporção de cada uma destas aminas nas células. Além disso, estes autores isolaram de fígado de rato duas enzimas que demonstraram efeitos inibidores no processo de síntese de poliaminas: a dicitclohexilamina e a ciclohexilamina, sendo que a primeira estaria mais envolvida na inibição da espermidina.

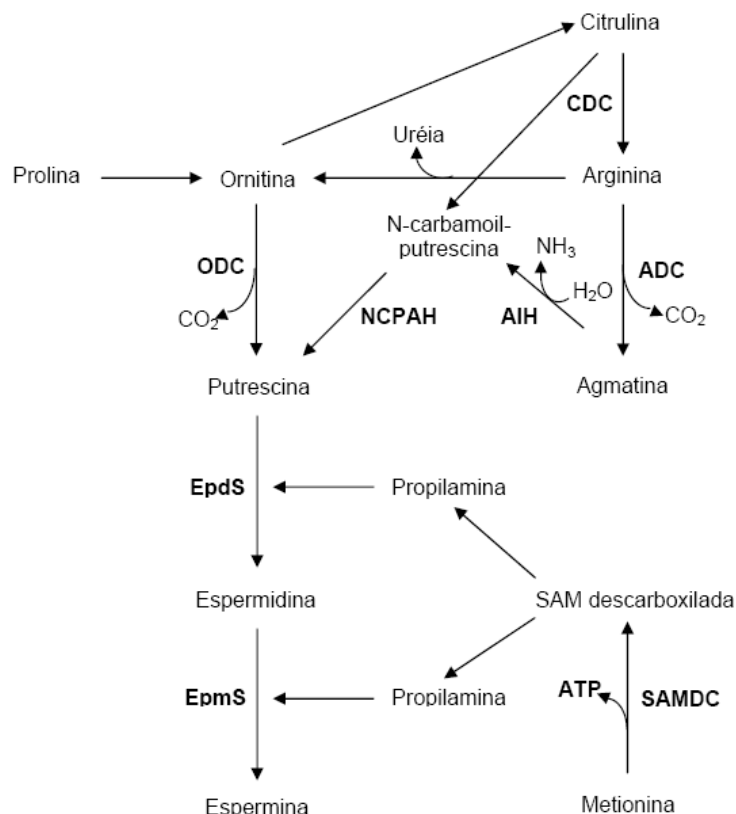


Figura 5 - Vias metabólicas para formação de espermina e espermidina.

Fonte: GLÓRIA (2005).

1.5 Metabolismo e distribuição das poliaminas no organismo animal

As poliaminas estabelecem ligações de hidrogênio e, por esta razão, são solúveis em água; além disso, podem também se ligar a estruturas de membranas celulares como os fosfolipídios. Em meio lipofílico, entretanto, as poliaminas apresentam-se como compostos neutros e são facilmente solúveis tanto em meios aquosos quanto orgânicos, o que significa que elas podem ser completamente distribuídas por todo o organismo por mecanismos de difusão (LØVAAS, 1991; MOINARD et al., 2005). De acordo com SMITH (1981), em pH fisiológico as amins estão completamente protonadas e policatiônicas.

Substâncias ácidas, ao contrário de substâncias básicas, são rapidamente absorvidas pelo estômago, porque a mucosa gástrica é seletivamente permeável à compostos não dissociados. Conseqüentemente, substâncias básicas como as amins estariam ionizadas no pH ácido do estômago e não seriam metabolizadas. Entretanto, no pH alcalino do duodeno e jejuno ocorre conversão das amins para a forma não ionizada, facilmente absorvida (GLÓRIA, 2005).

As poliaminas que chegam ao lúmen intestinal provêm, principalmente, da dieta. No intestino, elas são rápida e completamente absorvidas, por difusão simples, no duodeno e na primeira porção do jejuno. O processo de difusão simples depende da saturação de poliaminas no meio, da temperatura e não depende da presença de sódio para se ligar à membrana; depois, há carreadores específicos para atravessar a bicamada lipídica. Alguns autores acreditam que depende do pH e é melhor quando este é fisiológico, porque as amins estão carregadas (BARDÓCZ et al., 1995; MILOVIC, 2001).

Dentro dos enterócitos ocorre a metabolização das poliaminas por enzimas específicas, antes de alcançar a corrente sanguínea. Parte delas saem do lúmen intestinal por transporte passivo, sendo que parte delas pode ser também utilizada pelos enterócitos, para suas funções metabólicas (BARDÓCZ et al., 1995; MILOVIC, 2001) (Figura 6).

BARDÓCZ (1993) verificou a porcentagem de poliaminas ingeridas que alcançaram a corrente sanguínea para serem utilizadas pelas células, 1 hora após a ingestão. Houve recuperação de 72 a 74% de espermina marcada com C₁₄, de forma intacta, 79% de espermidina e 11 a 15% de putrescina. Os autores concluíram que a espermidina e a espermina são as fontes ideais de poliaminas por estarem prontamente acessíveis às células.

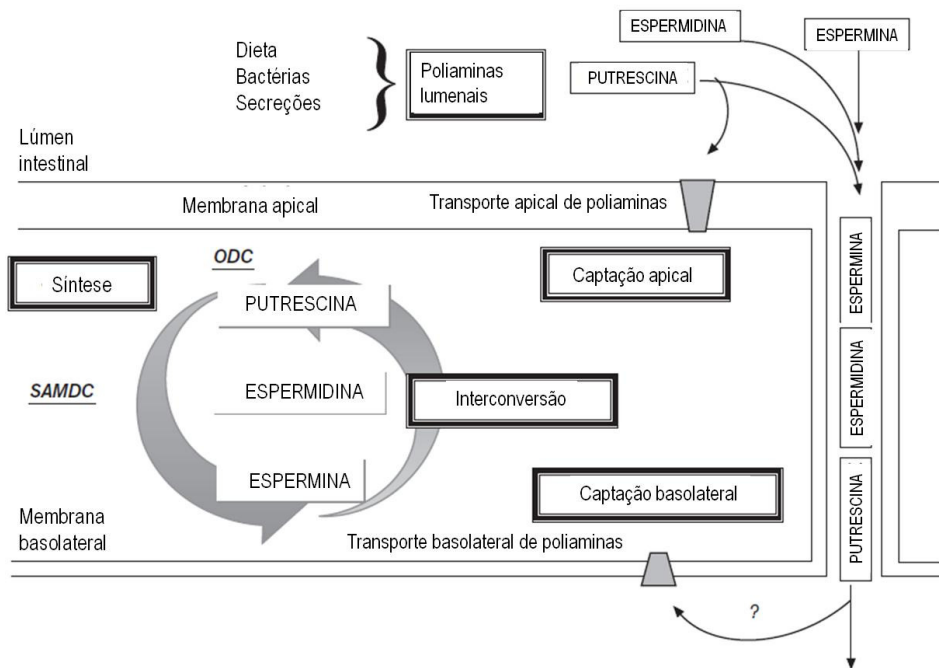


Figura 6 - Manutenção de concentrações intracelulares de poliaminas em células epiteliais intestinais humanas. As concentrações intracelulares de poliaminas são mantidas pela síntese e pela captação de poliaminas endógenas do lúmen intestinal. Ocorre estímulo pela síntese de poliaminas (estímulo das atividades da ODC e S-adenosilmethionine descarboxilase - SAMDC), e captação através da membrana apical ou basolateral. Entretanto, a maioria das poliaminas lumenais parece ser absorvida passivamente através da rota paracelular e através da membrana basolateral, ou ainda, são metabolizadas antes de alcançar o sistema circulatório.

Fonte: MILOVIC (2001).

Dentro dos enterócitos, as aminas bioativas são rapidamente metabolizadas no organismo por conjugação ou mediante reações de oxidação por aminoxidases como monoaminoxidases (MAO) e diaminoxidases (DAO), assim como também ocorrem interconversões de um tipo de amina para outro (SMITH, 1981). Assim, as poliaminas sofrem interconverções e reações de acetilação (GLÓRIA, 2005).

No organismo, a principal via de degradação das poliaminas é pela desaminação oxidativa promovida pela DAO, a qual está presente na mucosa intestinal, fígado e rim. Esta enzima atua não somente nas poliaminas livres, mas também em seus derivados acetilados. Outra enzima, a PAO (poliaminoxidase) também participa no catabolismo das poliaminas, entretanto atua, preferencialmente, sobre as poliaminas livres (GLÓRIA, 2005).

As aminoxidases podem ser de duas classes, dependendo do co-fator. As aminoxidases que contém o co-fator cobre na molécula, agem sobre os grupamentos amino primários, enquanto as aminoxidases que contém o co-fator FAD agem sobre os

grupamentos amino secundários, como é o caso das poliaminoxidases (GLÓRIA, 2005). As poliaminoxidases são específicas para metabolização das poliaminas. A oxidação de espermidina produz 1-pyrroline, 1,3-diaminopropano, peróxido de hidrogênio e γ -aminobutiraldeído, enquanto a oxidação da espermina produz 1,3-aminopropilpirrolina, além de diaminopropano e peróxido de hidrogênio. Diaminopropano pode gerar β -alanine (SMITH, 1985; GLÓRIA, 2005).

De acordo com SMITH (1981), durante a oxidação de aminas, promovida pelas aminoxidases há produção de peróxido de hidrogênio, aldeídos e amônia (Figura 7).

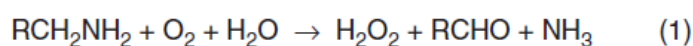


Figura 7 - Equações para a oxidação de aminas por aminoxidases na presença (1) e ausência de catalase (2).

Fonte: GLÓRIA (2005).

O composto γ -aminobutiraldeído formado pela oxidação da espermidina pode formar GABA (ácido 4-aminobutírico) e este ser transaminado e resultar em ácido succínico e entrar no ciclo de Krebs. Esta sequência metabólica completa o ciclo do carbono e do nitrogênio, reciclando completamente o carbono e nitrogênio das poliaminas. Isso pode explicar porque as poliaminas podem atuar como fonte de nitrogênio para as células (GLÓRIA, 2005) (Figura 8).

HOLTITA (1977) demonstrou que a espermidina é degradada em putrescina e 3-aminopropionaldeído e espermina em espermidina e 3-aminopropionaldeído. Sendo a poliaminoxidase uma flavoproteína, localizada nos peroxissomos de células hepáticas, e promove a oxidação de poliaminas quando o pH está em torno de 10.

PEGG et al. (1982) analisaram a biosíntese e a interconversão de poliaminas no organismo de ratos e verificaram que as concentrações de poliaminas variaram em um mesmo tecido e atribuíram isso, a ação inicial de três enzimas (ornitina descarboxilase, S-adenosilmetionina descarboxilase e espermidina/espermina N^1 -acetiltransferase) envolvidas no processo de descarboxilação e acetilação, além da ação posterior das poliaminoxidases. As acetilases agiram tanto na espermina quanto na espermidina para formar derivados N^1 -acetil, os quais foram então oxidados por poliaminoxidases formando espermidina e putrescina, respectivamente. Os autores verificaram ainda que

a meia vida destas enzimas é curta (menos de 60 min), enquanto a das poliaminoxidases é de mais de 20 horas.

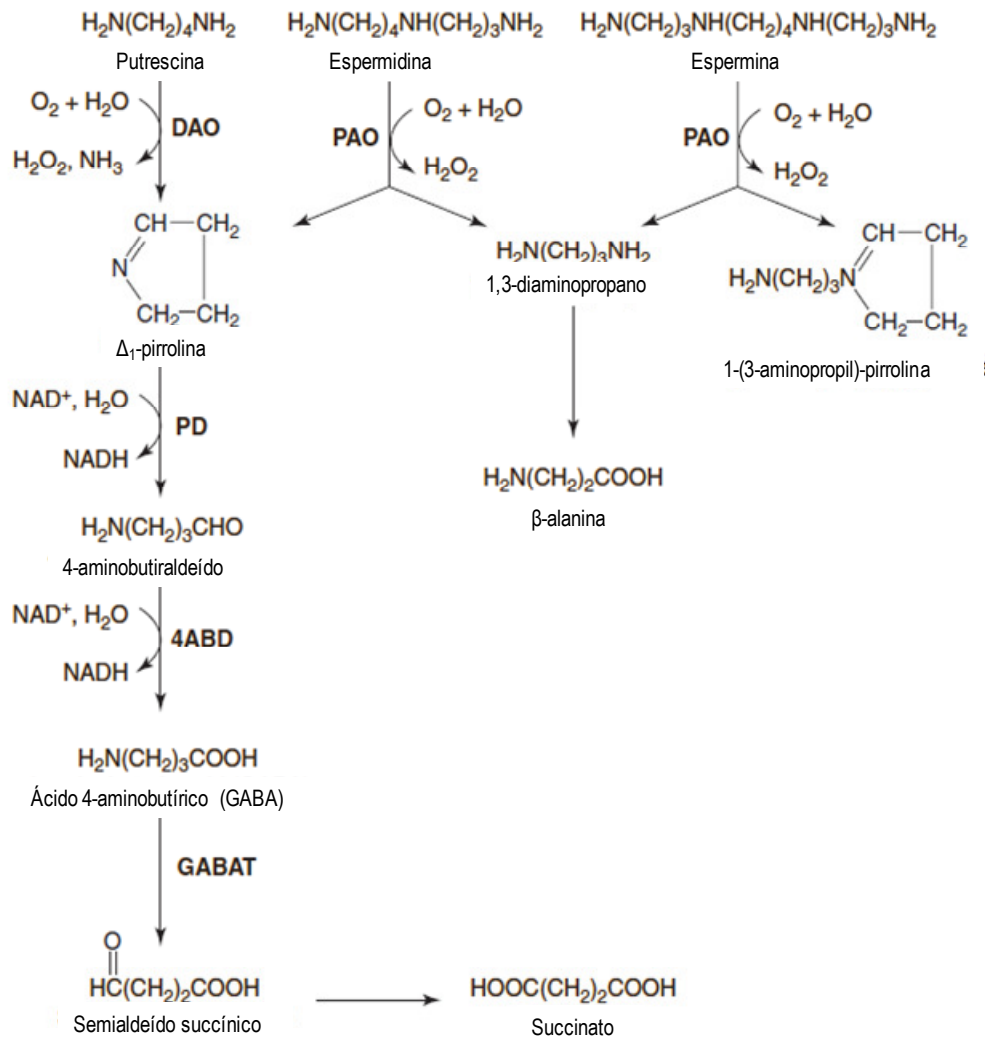


Figura 8 - Metabolismo de putrescina, espermidina e espermina.

Fonte: GLÓRIA (2005).

HOSOMI et al. (1986) avaliaram a distribuição de poliaminas em diversos segmentos (duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon) da mucosa intestinal de ratos saudáveis, e observaram que houve predominância de espermidina (460 nmol/10 cm) em todos eles, seguida por espermina (290 nmol/10 cm), putrescina (32 nmol/10 cm) e cadaverina (8 nmol/10 cm), sendo que as maiores concentrações foram encontradas sempre no ceco.

É provável que exista no organismo um local de armazenamento de poliaminas do qual são liberadas, quando necessário, por processos regulados por hormônios e fatores de crescimento (BARDÓCZ et al., 1992; 1995). Assim, estudos realizados por

BARDÓCZ et al. (1990; 1992) sugeriram que o músculo e a pele podem ser importantes locais de armazenamento de poliaminas.

Em um deles, BARDÓCZ et al. (1990) verificaram que após 1 h de incorporação de putrescina marcada com ^{14}C via intubação em ratos, apenas 29 a 39% da atividade foi encontrada como poliamina e 11 a 15% como putrescina. De acordo com os autores, esta intensa quebra de putrescina em metabólitos não poliamínicos ocorreu, provavelmente, devido a ação da diaminoxidase, que é uma das enzimas mais abundantes no tecido intestinal. Entretanto, espermina e espermidina marcadas foram altamente conservadas, tendo sido recuperadas, na forma original, 87 a 96% da espermidina e 79 a 82%, da espermina.

Em outro estudo, BARDÓCZ et al. (1992), injetaram, por via intraperitoneal espermidina marcada com ^{14}C em ratos *Hooded-Lister* divididos em três grupos segundo a composição da dieta: (a) controle, (b) acrescida de clenbuterol, agonista β -adrenoreceptor que induz hipertrofia do músculo esquelético, e (c) acrescida de feijão, ou seja, de lectina, que induz crescimento hiperplásico no intestino. Após o sacrifício destes animais, observou-se que, em condições normais, a espermidina estava distribuída em vários órgãos, com acúmulo no músculo (Tabela 3). Nas demais dietas, com clenbuterol e com feijão, foram observados um maior acúmulo de espermidina no músculo e no intestino, respectivamente, devido a necessidade de altas concentrações desta amina para o desenvolvimento do tecido.

Tabela 3 - Distribuição de espermidina marcada com ^{14}C administrada por dia, em diferentes órgãos de ratos submetidos a dietas diversas

Órgão	Percentual de espermidina no órgão / dieta		
	Controle	Feijão	Clenbuterol
Músculo esquelético	11	5	32
Trato digestivo	8	22	9
Fígado	8	10	10
Rim	6	7	5
Pâncreas	2	3	1

Fonte: BARDÓCZ et al. (1992).

Baseado nestes resultados, espermidina e espermina foram consideradas as fontes ideais de poliaminas uma vez que são bem conservadas para posterior utilização pelo organismo. Além disso, este estudo demonstrou que a putrescina não atuou como fator de crescimento, mas apenas como precursora de poliaminas. Entretanto, verifica-se que a absorção das poliaminas no intestino é dependente das enzimas catabólicas presentes nos enterócitos (BARDÓCZ et al., 1992).

1.6 Aspectos toxicológicos

Embora as aminas sejam constituintes normais de muitos alimentos e desempenhem funções fisiológicas essenciais, podem se tornar um perigo à saúde, podendo causar intoxicação se consumidas em grandes quantidades, se as enzimas metabolizadoras estão inibidas, se efeitos sinérgicos ou potencializadores ocorrem, ou se houver deficiência genética para o seu catabolismo (LIMA & GLÓRIA, 1999).

A mais frequente intoxicação causada por aminas biogênicas em alimentos envolve a histamina (peixes), seguida pela tiramina (queijos) (CINQUINA et al., 2004; LANDETE et al., 2008). A intoxicação histamínica resulta da ingestão de alimentos que contêm altos teores de histamina. Os principais sintomas são erupções na pele, náuseas, dor de cabeça, palpitações, vômitos, dores abdominais, distúrbios respiratórios e taquicardia, sendo que seu efeito pode ser potencializado pela presença concomitante de tiramina, putrescina, cadaverina, espermina, espermidina, dentre outras aminas (LIMA & GLÓRIA, 1999; GLÓRIA, 2005, KALÁČ & GLÓRIA, 2009).

A temperatura de estocagem é um importante fator que pode afetar o conteúdo de aminas bioativas no alimento, devido a inibição ou ativação no crescimento de microrganismos, principalmente aqueles que descarboxilam aminoácidos, sendo que o perfil e teores de aminas bioativas pode ser utilizado como índice de qualidade (HALÁSZ et al., 1994).

As poliaminas espermidina e espermina, quando administradas por via oral, em altas concentrações em animais de laboratório, podem causar paralisia muscular, sedação, hipotermia, hiperglicemia, convulsões (COUTTS et al., 1986), redução da pressão sanguínea e tremores musculares (TIL et al., 1997).

TIL et al. (1997) avaliaram a toxicidade de algumas aminas em ratos e verificaram que a DL50 para espermina é de 600 mg/kg/dia, por via oral. Entretanto, na concentração de 19 mg/kg de peso vivo/dia foi verificada ausência de toxicidade. A espermina isoladamente possui toxicidade renal, podendo causar desequilíbrios no processo de coagulação, degeneração do miocárdio, além de alterações na pulsação e respiração quando administrada em doses superiores a 180 mg/kg.

1.7 Extração, separação e quantificação de aminas bioativas

A determinação de aminas bioativas é feita através das etapas de extração, purificação, separação e quantificação. A natureza da amostra, a presença de

compostos interferentes e a ocorrência de várias aminas simultaneamente na mesma alíquota são problemas típicos encontrados na análise de aminas bioativas em alimentos (SHALABY, 1996). Não é uma técnica simples, pois estas substâncias possuem estruturas químicas distintas e estão presentes em faixas de concentração variáveis, às vezes muito baixas, em uma matriz complexa. Técnicas cromatográficas, especialmente a cromatografia líquida de alta eficiência são as mais utilizadas, uma vez que fornecem alta resolução, sensibilidade e versatilidade, e o tratamento da amostra é simples (LAVIZZARI et al., 2006).

1.7.1 Métodos de extração

A etapa de extração é considerada crítica e sua eficiência depende do tipo e da natureza das aminas presentes, do solvente utilizado e do alimento analisado (TAMIN et al., 2002). Diversos métodos são descritos na literatura. Destes, a extração com ácido é a mais utilizada. Como ácidos extratores citam-se o ácido perclórico (HClO_4) (Yamamoto et al., 1982), o ácido clorídrico (HCl) e o ácido tricloroacético (TCA), os quais permitem a extração de aminas ligadas a diversos componentes da matriz (CHANG et al., 1985; SANTOS et al., 2003).

PECHANEK et al. (1980) avaliaram a extração de aminas bioativas de diversos tipos de carnes e produtos cárneos bovino e suíno, utilizando diferentes ácidos e observaram que TCA foi o melhor ácido para extração de histamina, putrescina e cadaverina, enquanto HCl foi mais eficiente para histamina e o ácido perclórico apresentou melhores resultados para espermina. Os autores concluíram que a extração com TCA foi mais eficiente para um maior número de aminas, além de apresentar maior facilidade e rapidez no método e ser de manipulação mais segura.

ZEE et al. (1983) em trabalho semelhante ao de PECHANEK et al. (1980), observaram que o TCA foi o melhor extrator para espermina, enquanto TCA e ácido perclórico promoveram melhor extração de histamina e tiramina e o HCl extraiu melhor a putrescina e a cadaverina.

Por serem hidrossolúveis, as aminas bioativas também podem ser extraídas com água a temperatura ambiente ou aquecida. Outros solventes como etanol, metanol, acetona, acetonitrila ou diclorometano também podem ser utilizados (WANG, 1972; MORET & CONTE, 1996).

As resinas de troca iônica ou catiônica, as de partição com butanol ou éter etílico podem ser utilizadas para purificação antes da separação, quando há presença de interferentes (COUTTS et al., 1986).

1.7.2 Métodos de separação e quantificação

Os métodos cromatográficos são os mais utilizados para a separação e quantificação de aminas bioativas, dentre eles cromatografia em papel, em camada delgada (CCD), de troca iônica, gasosa (CG) e líquida de alta eficiência (CLAE), sendo que a CCD e a CLAE são as mais empregadas (YAMAMOTO et al., 1982; COUTTS et al., 1986; HÄKKINEN et al., 2007). Também são descritos na literatura métodos utilizando técnicas de eletroforese e imunoensaio (STAHL, 1969; GONG & HAUSER, 2006; HÄKKINEN et al., 2007).

Até o início da década de 80 a CCD era a mais utilizada para a separação de aminas, sendo substituída a partir de então pela CLAE com vantagens em termos de sensibilidade e especificidade (SLOCUM et al., 1989). A CCD consiste na identificação da amina em função da distância percorrida pela amostra, comparada com a distância percorrida pelo padrão. Esta distância percorrida é medida do local de aplicação até o local onde há uma mancha produzida pela revelação da amostra. A quantificação é feita pela intensidade da coloração da mancha produzida. Isto é realizado por meio da determinação da área da mancha, por densitômetro ou cortando-se a mancha, extraindo as aminas com solventes e fazendo a leitura em espectrofotômetro ou espectrofluorímetro após centrifugação (DOMÍNGUEZ, 1975; SEILER, 1986; GRINBERG, 1990). A maior dificuldade nesta técnica é a eluição dos aminoácidos juntamente com as aminas, tornando as separações demoradas e difíceis (DOMÍNGUEZ, 1975; SEILER, 1986; GRINBERG, 1990).

Geralmente para a separação de aminas bioativas, as placas de CCD são impregnadas com sílica gel (ABE & SAMEJIMA, 1975). Entretanto, compostos polares podem ser separados utilizando-se sulfato de cálcio. KHAN (2006) propôs a utilização de placas confeccionadas com sulfato de cálcio ao invés de sílica com vantagens em termos de resolução e separação, por promover melhor separação de aminas alifáticas não daniladas, facilitando a etapa de preparo das amostras, além de reduzir o tempo de análise.

Outras substâncias utilizadas como fase estacionária para separação de aminas são a celulose (HAMMOND & HERBST, 1968) e o óxido de alumínio (DOMÍNGUEZ, 1975; COLLINS et al., 2006).

Diversos trabalhos relataram a separação de aminas bioativas por CCD, entretanto, a separação das poliaminas espermidina e espermina nem sempre é conseguida devido a semelhança entre as moléculas. ABE & SAMEJIMA (1975) promoveram a separação de espermidina e espermina por CCD utilizando placas de

sílica gel e solução de álcool butílico, ácido acético e piridina, como fase móvel. Com este método, os autores conseguiram a separação de 17 aminas, sendo que os fatores de retenção para espermidina e espermina foram de 0,18 e 0,36, respectivamente, e os aminoácidos eluíram após a separação de todas as aminas.

Depois da separação nas placas, as aminas devem ser reveladas para que possam ser analisados os fatores de retenção de cada substância. Como reveladores podem ser utilizados a fluorescamina (ABE & SAMEJIMA, 1975); a 2,6-dicloroquinona; a 4-cloroimida (ROSS, 1968); o iodo (RANDERATH, 1969); a α -naftilamina (RANDERATH, 1969), sendo a ninidrina o reagente mais comum (HAMMOND & HERBST, 1968; RANDERATH, 1969; STAHL, 1969; GRINBERG, 1990).

WETTLAUFER & WEINSTEIN (1988) afirmaram que a separação de poliaminas por CCD é eficiente, entretanto, a quantificação é laboriosa porque requer a remoção da sílica das placas, dependendo do método utilizado.

A CLAE e a CG tem a vantagem de, em um mesmo equipamento, realizar a separação e a quantificação, com rapidez e sensibilidade (VALE & GLÓRIA, 1997; LIMA, 1999), sendo a CLAE por fase reversa, a mais adequada para a análise de aminas em alimentos (MORET & CONTE, 1996). A utilização de um contra-íon como o sal sódico dos ácidos hexanosulfônico, heptanosulfônico ou octanosulfônico na fase móvel utilizada na CLAE de fase reversa, melhora a separação das aminas, devido a neutralização destas e aumento do tempo de retenção na fase estacionária. A desvantagem desta técnica é a mistura de solventes orgânico e aquoso na mesma fase móvel, o que exige seu preparo constante para garantir estabilidade no momento da utilização, que pode ser por sistema isocrático ou gradiente (LIMA, 1999).

Para que possam ser determinadas por cromatografia utilizando detecção por ultravioleta tradicional ou fluorescência, as aminas devem passar por processos de derivação, no entanto, há relato de trabalhos que citam a determinação de aminas não derivadas (GONG & HAUSER, 2006; KHAN, 2006; HÄKKINEN et al., 2007).

1.7.2.1 Derivação

A derivação consiste em formar compostos que apresentem absorção no ultravioleta natural ou fluorescência, aumentando a sensibilidade do método; é realizada também, quando uma substância apresenta o mesmo comprimento de onda de um interferente. Um dos principais métodos de derivação de aminas é a dansilação, que consiste na adição de cloreto de dansila (5-[dimetilamino]-naftaleno-1-sulfonilclorídrico) à amostra, promovendo a transformação das aminas em compostos

fluorescentes, permitindo sua detecção no UV, no comprimento de onda de 365 nm (STAHL, 1969; GRINBERG, 1990; HÄKKINEN et al., 2007) e por fluorescência. Outros reagentes derivantes são o cloroformato de etila (YAMAMOTO et al., 1982) e 2,4-dinitrofluorobenzeno (MORUZZI & CALDARERA, 1964; WANG, 1972) e o *o*-ftalaldeído (VALE & GLÓRIA, 1997; DALGAARD et al., 2006; LAVIZZARI et al., 2006).

Utilizando CCD há relatos de diversos trabalhos que realizaram a separação de poliaminas dansiladas para reduzir a formação de caudas, entretanto, além de ser um método dispendioso, os compostos dansilados são modificados pela ação da luz, temperatura, pH e polaridade do solvente (NAHUM & HORVATH, 1981; WETTLAUFER & WEINSTEIN, 1988; KHAN, 2006). Além disso, o cloreto de dansila reage não apenas com as aminas, mas com compostos fenólicos e alguns alcoóis e açúcares e estes derivados podem mascarar ou interferir com a separação de aminas dansiladas (SEILER & DECKARDT, 1975).

A CCD não detecta a agmatina, quando é utilizado o cloreto de dansila como derivante, pois este não reage com a função guanidino da agmatina e, portanto, seus derivados dansilados exibem pouca mobilidade nas placas de sílica gel eluídas com solventes não-polares utilizados para a separação de aminas dansiladas (SEILER, 1971; WETTLAUFER & WEINSTEIN, 1988).

Apesar da ampla utilização, há relato da ocorrência de degradação de poliaminas após a reação de dansilação. RUSTENBECK et al. (1995) verificaram perdas na concentração de poliaminas quando em concentrações de 1 a 20 pmol, devido a reação destas com a sílica, após tempo de contato prolongado. O principal problema da derivação, entretanto, é o aumento no tempo de análise e a possibilidade de se obter resultados imprecisos devido a reação incompleta ou a instabilidade da reação (HÄKKINEN et al., 2007).

No caso da cromatografia utilizando coluna a derivação pode ser feita antes da amostra entrar na coluna, ou seja antes da separação, ou após a saída da coluna (HÄKKINEN et al., 2007). Como agentes derivantes são também utilizados ninidrina, 2-naftaleno, cloreto de benzoíla, *o*-ftaldialdeído, dentre outros (WETTLAUFER & WEINSTEIN, 1988). O uso do *o*-ftaldialdeído tem como vantagem a maior seletividade e sensibilidade, embora tenha menor estabilidade (VALE & GLÓRIA, 1997).

Para a reação com o *o*-ftaldialdeído é recomendada a derivação após a separação, pois o tempo entre a formação do complexo e sua detecção é curto. Além disso, a reação pós-coluna requer menor tratamento da amostra e menor tempo de análise (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993). Segundo GLÓRIA & DAESCHEL (1995), a

derivação pós-coluna com o-ftaldialdeído seguida por detecção fluorimétrica é mais sensível, seletivo e simples, exigindo menor quantidade e preparo da amostra.

2 Oxidação

A oxidação pode ser definida como o processo no qual o oxigênio é adicionado, ou o hidrogênio ou elétrons são removidos do componente oxidado por um oxidante, geralmente provocando efeitos indesejáveis (ARAÚJO, 2004). Assim, estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar alternativas para retardar o processo de oxidação, causado pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que provoca danos irreversíveis às células. No organismo vivo a oxidação causa o envelhecimento celular precoce e aumenta a incidência de algumas doenças. Sob o aspecto alimentar a oxidação promove a deterioração dos alimentos como carnes e produtos cárneos, reduzindo a qualidade nutricional e o período de armazenamento. Por isso, o conhecimento e a compreensão dos mecanismos das reações de oxidação e as formas de controle são de suma importância para a indústria (FENNEMA, 1996; FARACI & DIDON, 2004; VENTANAS et al., 2006).

2.1 Compostos produzidos durante a oxidação

Do oxigênio molecular absorvido pelos organismos aeróbios, 95 a 98% é reduzido formando água na cadeia respiratória, através do transporte de elétrons na mitocôndria. O restante é reduzido univalentemente, em um processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, o qual irá ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua desemparelhado, conseqüentemente, produzindo intermediários altamente reativos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

Os termos agente oxidante, radical livre, espécie radicalar, espécie ativada e espécie reativa são frequentemente utilizados para designar, de forma genérica as espécies reativas de oxigênio (ERO) de importância biológica. Entretanto, nem sempre são usados adequadamente, uma vez que apresentam diferentes características químicas. Radical pode ser compreendido, sob o ponto de vista químico, como um grupo de átomos que se comporta como uma unidade (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986). As espécies reativas de oxigênio ocorrem como parte normal do metabolismo celular ou por exposição a fatores ambientais.

Na formação das espécies reativas de oxigênio, o oxigênio, devido a sua configuração eletrônica, tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos como radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (Figura 9).

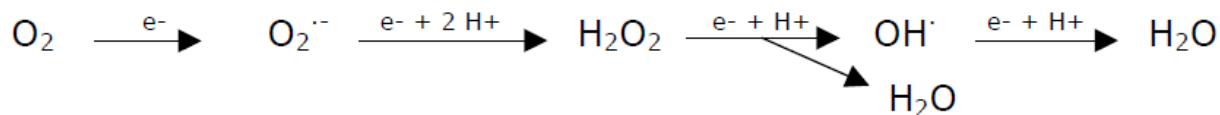


Figura 9 - Formação das espécies reativas de oxigênio.

Fonte: OXIDAÇÃO... (s.d.).

O radical superóxido, representado por $\text{O}_2^{\cdot -}$ ou $\text{O}^{\cdot -}$ é formado após a primeira redução do oxigênio molecular (O_2), ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990), produzindo lesão biológica secundária. Radicais livres como os ânions superóxidos são produzidos durante a respiração celular e por uma variedade de enzimas, incluindo xantina oxidase, ciclooxigenase e NADPH oxidase. Esta última, uma enzima que se encontra ligada à membrana das células, é a principal fonte de geração dos radicais superóxidos que possuem alta capacidade oxidante pela reação de Fenton, formando o radical hidroxila, o qual é muito reativo. Os superóxidos promovem oxidação em lípidos, proteínas e DNA (ARAÚJO, 2004; FENG & ARRIAGA, 2008).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, por participar da reação que produz o radical hidroxila. Além disso, tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas, sendo altamente tóxico para as células (ARAÚJO, 2004).

O radical hidroxila (OH^\cdot), considerado a espécie do oxigênio, mais reativa em sistemas biológicos pode promover mutação do DNA, inativar proteínas (enzimas e membrana celular) e iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986).

O radical hidroperoxila (HO_2^\cdot) representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Existem evidências de que o

hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O oxigênio molecular, no estado fundamental, possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais p de mesma energia, chamados de degenerados, caracterizando, portanto, um estado tripleto ($^3\text{O}_2$). Conseqüentemente, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do spin. Uma forma mais reativa do oxigênio, conhecida como oxigênio singlete, pode ser gerada por um acréscimo de energia. Nela, a restrição da regra de conservação do spin é removida. Sendo assim, o oxigênio singlete é muito mais oxidante que o oxigênio molecular no seu estado fundamental (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Portanto, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). O oxigênio tripleto é um di-radical com dois elétrons paralelos separados em orbitais e constitui 21% do ar. O $^3\text{O}_2$ reage com elementos e íons, formando óxidos, mas não com compostos orgânicos. No entanto, reage facilmente com radicais livres (ARAÚJO, 2004).

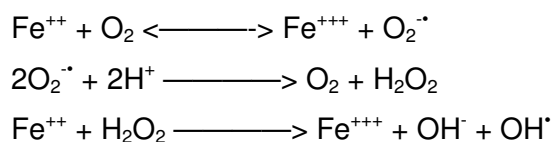
Para inibir ou retardar a formação dos produtos da oxidação podem ser utilizados antioxidantes. Antioxidantes são substâncias que retardam ou inibem o processo de oxidação, quando presentes em baixa concentração, comparada a do substrato oxidável, e diminuem significativamente a velocidade da reação ou prolongam o período de indução. Os principais mecanismos de ação de compostos antioxidantes incluem a captação de radicais e supressão de estados excitados, além de sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a ligação de íons metálicos à proteínas, o que os torna indisponíveis para a produção de espécies oxidantes (FENNEMA, 1996; ARAÚJO, 2004).

2.2 Importância do íon ferro na formação das espécies reativas de oxigênio

O estudo sobre os mecanismos de lesão oxidativa tem, progressivamente, confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam a estas lesões. O papel dos metais na formação *in vitro* das espécies reativas de oxigênio é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss. Embora o cobre possa também catalisar a

reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Como pode ser observado a seguir, nas reações de Fenton e de Haber-Weiss são formadas diferentes espécies reativas (Figura 10).

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:

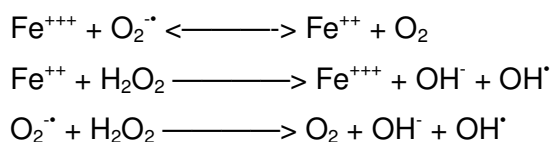


Figura 10 – Produtos de formação das reações de Fenton e Haber-Weiss.

Fonte: HALLIWELL & GUTTERIDGE (1990); FERREIRA & MATSUBARA (1997)

Lesões teciduais associadas a sangramentos podem liberar hemoglobina e ferro, favorecendo reações oxirredutoras, como nos tumores e na artrite reumatóide, quando o ferro é liberado da hemoglobina após microsangramentos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

2.3 Oxidação lipídica

A oxidação dos ácidos graxos insaturados ocorre por diferentes vias em função do meio e dos catalisadores, por meio de mecanismos químicos, como a fotoxidação e a autoxidação (SILVA et al., 1999). Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (MELLO FILHO et al., 1983). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989).

2.3.1 Autoxidação

A autoxidação é uma reação de baixa energia de ativação, bastante complexa, que abrange um grande número de reações interrelacionadas, não sendo significativamente inibida pela diminuição da temperatura de armazenamento. A reação

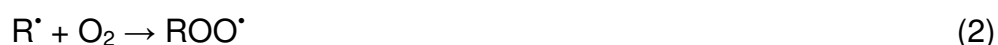
envolve a formação de radicais livres e pode ocorrer na ausência de luz (ARAÚJO, 2004).

O mecanismo de autooxidação dos lipídeos ocorre em três fases. A primeira fase, denominada iniciação, começa lentamente e corresponde ao “período de indução” da reação. É o tempo necessário para se atingir um ponto crítico, com aceleração brusca da velocidade do processo oxidativo. Neste estágio há o início do consumo dos substratos de oxidação tais como o oxigênio e, em quantidades muito menores, os lipídios insaturados (ARAÚJO, 2004).

A iniciação, representada na reação (1) é caracterizada pela formação de radicais (R[•]) das moléculas de lipídeos (RH). A reação inicial ocorre pela remoção do átomo de hidrogênio do grupo metileno (-CH=CH- → -CH=C[•]), a partir de iniciadores (X[•]), como os radicais alquila, alcoila, hidroxila, peróxido, além de hidroperóxido e clivagens térmicas e fotoquímicas (ARAÚJO, 2004).



Terminado o período de iniciação segue a chamada “fase acelerada”, denominada propagação (FENNEMA, 1996). Nesta fase, ocorre o aparecimento dos produtos primários de oxidação, como os peróxidos (ROO[•]) e os hidroperóxidos (ROOH), cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes, com formação de radicais livres e, conseqüentemente, radicais peróxidos, podendo agir como centros iniciadores para a propagação de futuras reações e liberação de outros milhares de radicais livres, representados nas reações (2) e (3). Os peróxidos são, portanto, produtos intermediários instáveis, sobretudo em temperaturas elevadas ou na presença de metais de transição, além disso, podem decompor-se em produtos secundários como ácidos, aldeídos, álcoois, cetonas, epóxidos, etc, apresentando efeitos deletérios similares. São inodoros e incolores e oxidam o Fe²⁺ a Fe³⁺ (KOLAKOWSKA, 2003; ARAÚJO, 2004; PEGG & SHAHIDI, 2005).



Desta forma, inicialmente há uma alta concentração de peróxidos que, em um dado momento, se reduz devido a instabilidade da molécula. Por outro lado, a concentração de aldeídos, apesar de aumentar mais lentamente, não se reduz,

atingindo concentrações elevadas ao final do processo de oxidação, que é a terceira fase (FENNEMA, 1996; ARAÚJO, 2004).

A terceira fase, denominada término (reações 4, 5 e 6), portanto, é caracterizada pelo aparecimento dos compostos secundários inativos obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos, cuja natureza e proporção dependem de diversos parâmetros (FENNEMA, 1996; PEGG & SHAHIDI, 2005). Nesta fase os radicais reagem entre si formando um produto não radical. As reações também podem terminar quando um dos radicais reage com um antioxidante, removendo um hidrogênio e formando um radical inerte do antioxidante (GORDON, 2001).



Desta forma, a oxidação cessa quando todo o oxigênio estiver esgotado ou houver formação de compostos inativos. Estes compostos gerados não são degradados e progressivamente acumulam nos alimentos, ocasionando então, forte redução da palatabilidade, caracterizada pelo sabor e odor desagradáveis característicos da oxidação (FENNEMA, 1996; PEGG & SHAHIDI, 2005).

2.3.2 Fotoxidação

A fotoxidação é um mecanismo alternativo à formação de radicais livres. A presença de fotossensores nos tecidos animal e vegetal, como a mioglobina, hemoglobina, riboflavina e clorofila, na presença de luz e oxigênio, dá início ao processo de transferência de energia para a formação de peróxido (FENNEMA, 1996; GORDON, 2001).

Os fotossensores absorvem luz na região visível e/ou próximo do ultravioleta, tornando-se eletronicamente excitados, passando do estado singlete (1 Sensores) para triplete (3 Sensores*), pela absorção da energia do fóton ($h\nu$). Nessa situação, transferem energia para o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), que resulta na excitação da molécula do oxigênio para o estado singlete ($^1\text{O}_2^*$), conforme indicado nas reações (7) e (8). O oxigênio singlete reage com duplas ligações por adição formando o hidroperóxido, representado na reação (9) (ARAÚJO, 2004).



Diferente da autooxidação, a fotoxidação não envolve a formação de radicais livres, independe da pressão de oxigênio, e não apresenta período de indução. Os hidroperóxidos são diferentes dos formados na autooxidação e, por degradação, originam aldeídos, álcoois, e hidrocarbonetos (SILVA et al., 1999; ARAÚJO, 2004).

De acordo com GORDON (2001), a fotoxidação pela excitação de lipídeos, na presença de riboflavina, é caracterizada pela transferência de um elétron por um átomo de hidrogênio entre um sensor triplete excitado e um substrato, produzindo radicais e continuando como na autooxidação.

2.4 Oxidação proteica

A modificação de proteínas pode ser induzida pelas espécies reativas de oxigênio, por cátions metálicos (Fe^{2+} , Cu^+), por peróxidos lipídicos, por oxidoredutases, dentre outros. Todos os aminoácidos são susceptíveis à oxidação, principalmente os aromáticos, que são os alvos preferidos de ataque. Existem, portanto, muitos mecanismos para oxidação de proteínas e, ao mesmo tempo, muitas substâncias passíveis de tal modificação (SCHACTER, 2000). A oxidação direta de lisina, arginina, prolina e treonina fornece derivados carbonílicos (Figura 11). Além disso, grupos carbonila podem ser introduzidos em proteínas via reação com aldeídos derivados da peroxidação lipídica ou gerados a partir da reação de redução de açúcar (p.ex., glicose) ou produtos de sua oxidação com resíduos de lisina (reações de glicação e de glicoxidação formando carboximetil-lisina) (BERLETT & STADTMAN, 1997; SCHACTER, 2000). A glicação é um processo não enzimático a que estão sujeitas todas as proteínas e consiste de 2 etapas: a glicose e o grupo amino de lisina reagem e formam frutose-lisina (FL); FL sofre desidratação, rearranjo e ciclização, seguida de reação que forma os AGEs ("Advanced Glycation end products"), denominada reação de Maillard (MCCALL & BALZ, 1999).

Os radicais livres formados após a oxidação dos lipídeos reagem com as proteínas, formando radicais lipídeo-proteína. Estes radicais livres conjugados podem sofrer polimerização com ligações cruzadas de proteínas. Os compostos carbonila formados (aldeídos e cetonas) após a peroxidação lipídica reagem com grupos amino

de proteínas (via reação carbonila-amina) e formam base de Schiff, promovendo a formação de ligações cruzadas e proteínas poliméricas, produzindo efeito deletério no seu valor nutricional. Os resíduos de aminoácidos mais susceptíveis à oxidação são os aromáticos, metionina, cisteína/cistina, triptofano, histidina e tirosina em menores proporções (FENNEMA, 1996; FENG & ARRIAGA, 2008).

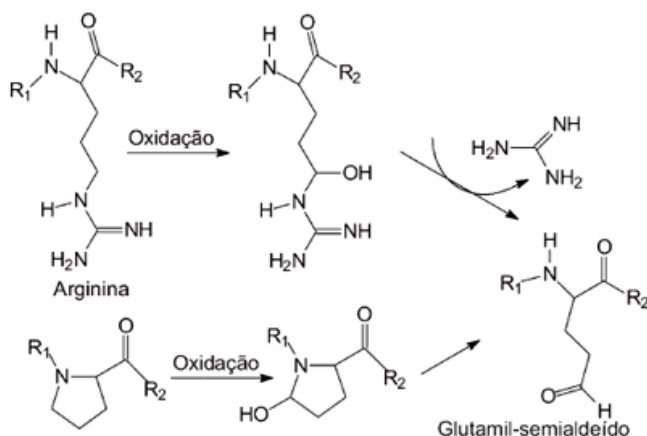


Figura 11 – Processo de formação de grupos carbonila, por oxidação de aminoácidos.

Fonte: VASCONCELOS et al. (2007).

FENG & ARRIAGA (2008) sugeriram dois principais mecanismos de geração de carbonila protéica: a partir de metal catalítico (cobre e ferro) e através da reação de cadeias laterais de aminoácidos com produtos de oxidação lipídica, assim como com açúcares redutores ou seus produtos.

KJÆRSGÅRD et al. (2006) avaliaram os teores de proteína carbonilada após o armazenamento de filés de truta congelados, durante dois anos a -20 e -80 °C, devido a perda de solubilidade protéica neste período. Verificou-se que a -80 °C não houve alteração, mas a -20 °C ocorreu aumento no conteúdo de proteína carbonilada o que induziu alterações na solubilidade protéica. Os autores sugerem que há proteínas que são mais susceptíveis à oxidação que outras, devido a sua localização celular, sequência de aminoácidos e função bioquímica.

Além do efeito deletério no valor nutricional, a oxidação de proteínas está relacionada aos processos de envelhecimento e de desenvolvimento de desordens neurodegenerativas. Uma vez oxidadas, as proteínas tornam-se alvos de degradação por proteases endógenas. Este processo proteolítico diminui o acúmulo de proteínas sem função bioquímica adequada (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

2.5 Oxidação em carnes e produtos cárneos

Estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar alternativas para retardar o processo de oxidação em carnes e produtos cárneos, tanto durante as fases de processamento e armazenamento, quanto logo após o abate dos animais, momento em que se inicia a oxidação devido à interrupção do sistema antioxidante natural (BUCKLEY et al., 1995; HOUBEN et al., 1998).

Considerando-se os componentes químicos dos alimentos, os lipídios são os mais propensos à oxidação devido à presença de elétrons altamente instáveis próximos às ligações duplas da molécula. A oxidação lipídica é a primeira causa de ranço durante o tempo de estocagem de carnes e produtos cárneos e está intimamente relacionada à presença de ácidos graxos polinsaturados. Desta forma, oxida-se inicialmente o lipídio com maior quantidade de ácidos graxos insaturados, em virtude da presença de duplas ligações (FENNEMA, 1996; ARAÚJO, 2004; PEGG & SHAHIDI, 2005).

Durante o processamento de produtos cárneos, vários compostos oxidantes são produzidos, incluindo radicais livres. Estes podem formar-se durante a oxidação lipídica e protéica, irradiação e fotoxidação de compostos como riboflavina (FENNEMA, 1996; MERCIER et al., 1998; KJÆRSGÅRD et al., 2006; VENTANAS et al., 2006). Assim, além da presença de ácidos graxos polinsaturados, os fenômenos de oxidação dos lipídios dependem de mecanismos reacionais diversos e extremamente complexos, que funcionam pela ação de agentes catalisadores. Estes podem estar relacionados ao tipo de interface entre os lipídios e o oxigênio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), as condições de armazenamento como exposição à luz (ação fotoquímica), ao calor (que fornece energia de ativação para provocar o início da reação) e ao oxigênio livre no interior da embalagem. Outros fatores que interferem na oxidação de lipídios são a presença de microrganismos, a presença de pró-oxidantes (mioglobina, hemoglobina, íons metálicos de transição, principalmente, íon ferro-heme e não-heme) ou de antioxidantes (FENNEMA, 1996; PEGG & SHAHIDI, 2005).

Os componentes pró-oxidantes são liberados devido à formação dos radicais livres. Estes promovem alterações no metabolismo celular, com desnaturações protéicas que interferem nos mecanismos reguladores dos fluxos de íons através das membranas celulares. Estas alterações promovem a liberação de ferro e de outros agentes oxidantes, resultando na geração de mais radicais, causando a oxidação de mais ácidos graxos, com formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído)

culminando com a morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; PARDI et al., 2006). O músculo esquelético é particularmente mais susceptível à reação de oxidação devido as altas concentrações dos agentes pró-oxidantes (KANNER, 1994; PEGG & SHAHIDI, 2005).

A oxidação de lipídeos e proteínas presentes nas carnes causa, além da redução no valor nutricional, a deterioração no produto, frequentemente resultando em perda de qualidade devido a alterações de cor, textura e reduzido tempo de armazenamento, além de conferirem odor e sabor desagradáveis (MERCIER et al., 1998; KJÆRSGÅRD et al., 2006; VENTANAS et al., 2006).

A oxidação lipídica promove a modificação da cor de carnes, pela transformação do pigmento oximioglobina, de coloração vermelho brilhante, em metamioglobina, tornando a carne marrom-acinzentada, aspecto que o consumidor rejeita. Quanto à textura, lipídios oxidados e produtos da oxidação lipídica podem formar complexos proteína-lipídio ou provocar cisão de proteínas. Também são formados complexos proteína-proteína e aldeídos-grupamentos amino de bases de Schiff, formando polímeros, levando à desnaturação protéica, inibição da atividade enzimática e diminuição da solubilidade (MOREY et al., 1973; KANNER, 1994).

Portanto, a oxidação é um fenômeno espontâneo e inevitável com implicação direta no valor comercial tanto da própria carne como de todos os produtos que a partir dela serão formulados. Este processo pode ser determinado por análises laboratoriais, que determinam tanto produtos primários (dienos conjugados e hidroperóxidos) quanto secundários (aldeídos, ácidos e álcoois), provenientes da oxidação lipídica, formados durante o armazenamento (GEORGANTELIS et al., 2007; FENNEMA, 1996).

Os antioxidantes utilizados em alimentos geralmente agem apenas em uma de suas frações. Assim, aqueles que atuam na fração lipídica não oferecerem proteção contra a oxidação de compostos solúveis em água, como a mioglobina. Enquanto aqueles que atuam na fração aquosa são ineficientes em músculos processados, nos quais a incorporação à membrana celular lipídica é dificultada. Desta forma, os mais adequados são aqueles que apresentam boa penetração na fração aquosa e lipídica do alimento, como é o caso das poliaminas (DECKER & CRUM, 1991; LØVAAS, 1991).

Os antioxidantes presentes nos alimentos, não podem reverter o processo de oxidação uma vez iniciado, mas podem inibi-lo ou retardá-lo (LØVAAS, 1991). No entanto, devem ser incorporados o mais rápido possível e, por isso, a adição na dieta dos animais é uma estratégia interessante (GEORGANTELIS et al., 2007)

2.6 Sistema antioxidante endógeno

Existem evidências de que diversas doenças estão associadas ao desequilíbrio oxidativo, provocado por estresse fisiológico, devido à alta produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992). Entretanto, no organismo animal há diversos mecanismos intrínsecos de defesa contra reações de oxidação provocada pelas espécies reativas de oxigênio, que incluem antioxidantes solúveis em sistemas lipídicos (ubiquinona, carotenóides, tocoferóis), sistemas enzimáticos (catalase, glutaciona peroxidase, superóxido dismutase) e compostos de baixo peso molecular solúveis em água. Neste último grupo encontram-se as poliaminas, principalmente a espermina. Assim, os sistemas de antioxidantes endógenos quando encontrados nos alimentos têm um excelente potencial para uso como aditivos “naturais”, podendo prevenir o estresse oxidativo no organismo (KANNER et al., 1987; LØVAAS & CARLIN, 1991; SASAKI et al., 1996).

A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) tem papel antioxidante, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, na presença do próton H^+ . Em humanos esta enzima está presente em três formas: citoplasmática (cobre zinco SOD), mitocondrial (manganês SOD) e extracelular (SOD3 – cobre zinco SOD). A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio. É encontrada no sangue (eritrócitos), medula óssea, mucosas, rim e fígado. Assim, o sistema antioxidante enzimático (Figura 12) constitui a primeira defesa endógena a agir contra ataques das espécies reativas de oxigênio, impedindo sua formação ou sequestram-nas de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar (COHEN et al., 1996; FARACI & DIDON, 2004).

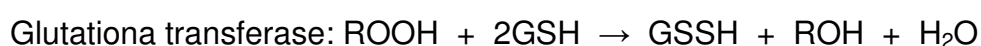
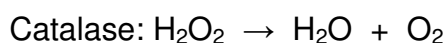
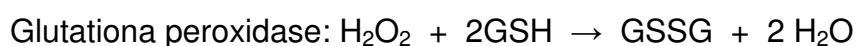
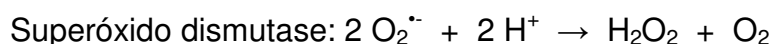


Figura 12 - Interações entre as enzimas antioxidantes endógenas.

Fonte: ARAÚJO (2004).

O que faz com que o peróxido de hidrogênio seja potencialmente danoso é sua facilidade de difusão através das membranas biológicas e sua alta instabilidade. Assim, o peróxido de hidrogênio produzido na mitocôndria alcança facilmente outros compartimentos celulares, podendo causar danos oxidativos, inclusive no núcleo celular (KANNER et al., 1987; COHEN et al., 1996).

Através da ação das enzimas antioxidantes as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio evitando, assim, a formação de radical hidroxila extremamente reativo e deletério à elas (COHEN et al., 1996; FARACI & DIDON, 2004).

A formação de radicais livres, assim como os processos de lipoperoxidação, nem sempre os são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na resposta inflamatória participando na formação de prostaglandinas e de outras vias de transdução de sinais. Entretanto, o excesso pode ser lesivo (SHACTER, 2000; DALLE-DONNE et al., 2003).

O óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) é uma espécie reativa de nitrogênio que tem um elétron não pareado e reage facilmente com oxigênio, radical superóxido, dentre outros. O óxido nítrico derivado das células endoteliais é considerado essencial para a homeostase vascular, promovendo vasodilatação, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea basal, dentre outros. O óxido nítrico modula reações inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo. No entanto é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. A baixa formação de óxido nítrico (em várias doenças vasculares) reduz a perfusão tecidual e promove a formação de trombo, enquanto a alta formação de óxido nítrico (patológico) produz vasodilatação pronunciada e choque e com a redução da atividade plaquetária a homeostase fica prejudicada (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; DUSSE et al., 2003).

Modificações oxidativas de enzimas e estruturas protéicas têm um papel significativo na etiologia/progressão de doenças como Alzheimer, diabetes, doenças pulmonares e renais crônicas, dentre outras, sendo que o conteúdo de proteína carbonilada é o melhor e mais utilizado marcador de oxidação protéica e tem sido utilizado em diagnósticos (SHACTER, 2000; DALLE-DONNE et al., 2003). Cisteína e metionina são aminoácidos particularmente propensos ao ataque oxidativo por espécies reativas de oxigênio, com formação de proteína carbonilada derivada (aldeídos e cetonas) (BERLETT & STADTMAN, 1997).

O estresse fisiológico pode provocar liberação de enzimas, tais como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH). A AST é encontrada em quase todos os tecidos, mas principalmente nos hepatócitos, células musculares esqueléticas e cardíacas enquanto ALT é encontrada no fígado, coração, músculo e rim. A LDH é uma enzima inespecífica por ser encontrada em muitas células do organismo, não tendo valor quando analisada isoladamente (PÉREZ et al., 2002; THRAL, 2006; CÂMARA-SILVA et al., 2007).

Como as espécies reativas de oxigênio são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores. Cabe salientar que a composição das defesas antioxidantes difere de tecido a tecido, de tipo de célula a tipo de célula e possivelmente de célula a célula do mesmo tipo, em um dado tecido (COHEN et al., 1996; FARACI & DIDON, 2004).

2.7 Métodos de análise da oxidação

Diversos métodos para determinação da oxidação lipídica e protéica, tanto em alimentos quanto em tecidos biológicos, são citados na literatura e contribuem para o estudo destes processos determinando, inclusive, o estágio em que eles se encontram, uma vez que há produção de diferentes compostos formados durante o processo de oxidação e que caracterizam cada uma das etapas. Assim, durante a oxidação podem ser determinados os compostos formados nas fases iniciais (dienos conjugados, hidroperóxidos) e finais (aldeídos, cetonas, alcanos) e que fornecem informações sobre a fase em que a oxidação se encontra (SILVA, 1999).

O início da oxidação de ácidos graxos polinsaturados é caracterizado pela troca de posição da dupla ligação. Assim, ligações duplas não conjugadas ($C=C-C-C=C$) são convertidas a ligações conjugadas ($C=C-C=C$). Esta troca ocorre quando um hidrogênio é perdido do grupo metileno posicionado entre duas duplas ligações existentes na configuração original. Forma-se um radical intermediário que se transforma em estruturas hidroperóxido dieno conjugado. Este processo pode ser acompanhado por aumento na absorção a 234 nm, indicativo de auto-oxidação (GUNSTONE & NORRIS, 1983; WHITE, 1995).

O final do processo de oxidação dos ácidos graxos pode ser determinado pela presença de malonaldeído. O malonaldeído é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácido graxo polinsaturado por cisão beta dos ácidos

graxos polinsaturados peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível. A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico, forma produtos que podem ser determinados por absorção no visível a 532 nm (Figura 7) (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

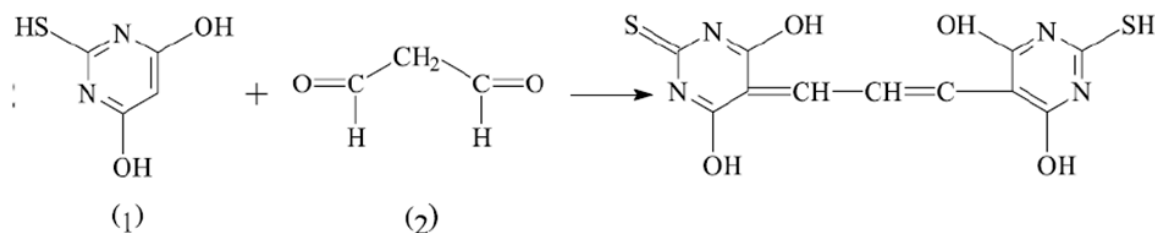


Figura 13 - Reação do ácido tiobarbitúrico-TBA (1) e malonaldeído-MDA (2) resultando no complexo TBA-MDA.

Fonte: GRIFFITHS et al. (2002).

Além da oxidação lipídica, a oxidação de proteínas e a formação de carbonila fornecem importante informação sobre o processo de oxidação. A formação de carbonilas tem início devido à ação dos radicais livres, formados durante a oxidação dos ácidos graxos, sobre as proteínas. As carbonilas formadas reagem com a dinitrofenilhidrazina, formando hidrazonas, que podem ser medidas espectrofotometricamente (FENG & ARRIAGA, 2008).

Os métodos mais utilizados para aferição indireta das reações de oxidação em sistemas biológicos e, conseqüentemente, das lesões oxidativas provocadas nas células são os espectrofotométricos e cromatométricos, que medem a atividade de enzimas que compõem o sistema antioxidante endógeno, como superóxido dismutase e catalase. Dependendo do local onde estão presentes estas enzimas, as medidas podem ser realizadas em tecidos e sangue, dentre outros (GRIFFITHS et al., 2002; FARACI & DIDON, 2004; FENG & ARRIAGA, 2008).

CAPÍTULO I: Determinação do perfil e teores de aminas bioativas em subprodutos, casca de maracujá, testículo bovino e fígado suíno

1 Objetivo

Pesquisar matrizes de baixo custo, provenientes de aproveitamento de resíduos ou subprodutos da indústria de alimentos, quanto ao perfil e teores de aminas bioativas para posterior extração de espermina e fornecimento desta para animais.

2 Material e métodos

2.1 Amostras

Quatro amostras de maracujá azedo (*Passiflora edulis*) foram adquiridas no mercado de Belo Horizonte, MG, Brasil. A polpa foi retirada, sendo utilizada para a análise somente a casca (albedo e flavedo). Cinco amostras de testículo bovino (corpo do testículo) e nove amostras de fígado suíno foram adquiridas em um matadouro-frigorífico localizado na cidade de Pedro Leopoldo/MG e foram transportadas até o laboratório, em isopor contendo gelo.

2.2 Reagentes, solventes e padrões

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção daqueles utilizados na cromatografia líquida de alta eficiência (acetonitrila e metanol) que foram de grau cromatográfico. Os solventes orgânicos foram filtrados em membrana HVLP, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura, com condutividade de 18,2 mΩ, obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões de dez aminas bioativas foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA), dentre eles dicloridrato de putrescina (PUT), dicloridrato de cadaverina (CAD), cloridrato de tiramina (TIM), dicloridrato de histamina (HIM), cloridrato de 5-hidroxitriptamina (serotonina – SRT), complexo sulfato creatinina

agmatina (AGM), tricloridrato de espermidina (EPD), tetracloridrato de espermina (EPM), cloridrato de 2-feniletilamina (FEM) e triptamina (TRM). O reagente de derivação cromatográfica *orto*-ftalaldeído (OPA) também foi adquirido da Sigma.

2.3 Métodos de análise

2.3.1 Extração de aminas bioativas

Para a extração das aminas do maracujá foi utilizado o método de SANTIAGO-SILVA et al. (2011). Foram adicionados 7 mL de ácido clorídrico (HCl) a 1 N em 5 g de amostra de casca de maracujá moída em processador e pesada em tubo de centrífuga de polipropileno. Os tubos foram agitados por 5 min em agitador orbital TE-140 Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil) a 250 rpm e centrifugados em centrífuga refrigerada Jouan CR3i (Saint Herblain, França) a 4 °C, a 11180 $\times g$ por 10 min e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo. Esta etapa foi repetida mais duas vezes com o mesmo volume de ácido, totalizando 21 mL adicionados. Os sobrenadantes foram misturados e armazenados a -18 °C até o momento das análises.

A extração das aminas do testículo e do fígado foi realizada de acordo com o método de THEODORO (2003). Foram adicionados 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% em 5 g de amostra triturada e homogeneizada, pesada em tubo de centrífuga de polipropileno. As amostras foram misturadas em agitador orbital TE-140 Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil) a 250 rpm e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4 °C, a 8422 $\times g$ por 21 min e o sobrenadante filtrado em papel de filtro qualitativo. Esta etapa foi repetida mais duas vezes com o mesmo volume de ácido, totalizando 21 mL adicionados. Os sobrenadantes foram misturados e armazenados a -18 °C até o momento das análises.

2.3.2 Determinação de aminas bioativas por CLAE

Imediatamente antes da injeção no cromatógrafo, o sobrenadante foi filtrado em membrana HAWP (Millipore Corp., Milford, MA, EUA) de 13 mm de diâmetro e 45 μm de tamanho do poro. A separação e a quantificação das aminas foram realizadas de acordo com VALE & GLÓRIA (1997). O cromatógrafo utilizado (Shimadzu, Kioto, Japão) era composto por três bombas com conjunto de lavagem automática do pistão, sendo duas modelo LC-10 AD e 1 LC-10 ADvp acoplada a uma câmara de mistura, injetor automático modelo SIL-10 ADvp, detector espectrofluorimétrico modelo RF-10AXL, com comprimento de onda de 340 e 450 nm de excitação e emissão,

respectivamente, unidade de controle CBM-20 A conectada a um microcomputador. A coluna e pré-coluna utilizadas foram μ Bondapak[®]C18 10 μ m (3,9 x 300 mm) e μ Bondapak[®] (Waters Milford, MA, EUA), respectivamente, mantidas à temperatura de 22 ± 1 °C.

Para a separação das aminas foram utilizadas duas fases móveis: fase móvel A = solução tampão acetato de sódio 0,2 mol/L contendo octanossulfonato de sódio 15 mmol/L, pH ajustado para 4,9 em potenciômetro DM20 (Digimed, SP, Brasil) utilizando ácido acético glacial; e B = acetonitrila, em fluxo de 0,5 mL/min. Estas soluções foram filtradas em membranas com poro de 0,45 μ m, do tipo HAWP (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA) em éster de celulose para a fase móvel A e HVWP para a fase móvel B, desgaseificadas em aparelho ultra-som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil). Foi utilizado um gradiente de eluição para este sistema binário.

Para a derivação pós-coluna, um tubo de teflon, protegido da luz, de 2,0 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, foi conectado entre a câmara de mistura e o detector. A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água grau CLAE, pH ajustado a 10,5-11,0 com hidróxido de potássio, filtrada em membrana HAWP de 47 mm de diâmetro e 0,45 μ m de diâmetro do poro e bombeada à câmara de mistura a um fluxo de 0,4 mL/min. Foram adicionados a esta solução 1,5 mL de Brij-35, 1,5 mL de 2-mercaptoetanol e 0,2 g de *o*-ftalaldeído dissolvido em 3 mL de metanol (LIMA & GLÓRIA, 1999). Esta solução foi preparada diariamente e mantida ao abrigo da luz.

A identificação das aminas bioativas foi baseada na comparação dos tempos de retenção das aminas encontradas nas amostras com os das aminas na solução padrão. A confirmação foi feita pela adição de solução padrão contendo a amina suspeita à amostra. Soluções padrão foram analisadas intercaladas às amostras. A quantificação foi realizada por interpolação em curva analítica externa e o valor encontrado na amostra multiplicado pelo fator de correção correspondente a esta amina.

Para o preparo das soluções padrão foram consideradas as massas das bases livres para resultar em uma concentração de 1 mg/mL em 10 mL de ácido clorídrico.

Todas as soluções foram acondicionadas em tubos hermeticamente fechados, identificadas e armazenadas sob refrigeração para a realização das análises, exceto a solução tampão de acetato de sódio:octanossulfonato de sódio, que foi mantida entre 21 e 23 °C.

2.4 Análise estatística

Todas as amostras foram analisadas em duplicata. A partir dos dados foram calculados a média, desvio-padrão e coeficiente de variação.

3 Resultados e discussão

Para se obter espermina a um custo reduzido optou-se pela sua extração e purificação, a partir de um dado alimento, não havendo necessidade, portanto, de se utilizarem padrões de custo elevado. Inicialmente foram consultados dados disponíveis na literatura a respeito do perfil e teores de aminas bioativas em diversos subprodutos, tanto de origem animal quanto vegetal. Após este levantamento foram determinadas algumas das fontes mais abundantes e algumas delas como casca de maracujá, testículo bovino e fígado suíno foram analisadas.

O método utilizado para extração das aminas bioativas variou de uma amostra para outra devido às diferentes composições de cada uma. Entretanto a determinação de aminas por CLAE foi a mesma para todos os alimentos.

Das 10 aminas analisadas, putrescina, espermidina e espermina estavam presentes no testículo e no fígado. Além destas, agmatina estava presente no testículo e cadaverina e histamina estavam presentes no fígado, entretanto, a cadaverina foi apenas detectada, mas não foi quantificada.

Não foram encontradas aminas bioativas na casca de maracujá. Entretanto, de acordo com resultados obtidos por SANTIAGO-SILVA et al. (2011), a polpa desta fruta contém altos teores de aminas bioativas, principalmente, espermina (3,3 mg/100 g).

No fígado a presença de poliaminas foi pesquisada porque este órgão contém uma grande variedade de sistemas enzimáticos capazes de aminar, transaminar e descarboxilar aminoácidos. No testículo esperava-se encontrar espermina, devido a dados de literatura (SASAKI et al., 1996), inclusive pelo fato da espermina ter sido isolada pela primeira vez a partir do fluido seminal e ter sido assim denominada em função deste achado.

No fígado a concentração média de aminas bioativas totais foi de 20,6 mg/100 g, sendo 0,1 mg/100 g de putrescina; 0,8 mg/100 g de histamina; 3,3 mg/100 g de espermidina e 16,6 mg/100 g de espermina. No testículo, a concentração média de aminas bioativas totais foi de 13,7 mg/100 g, sendo 2,3 mg/100 g de putrescina; 0,1

mg/100 g de agmatina; 4,0 mg/100 g de espermidina e 7,3 mg/100 g de espermina (Figura I.1).

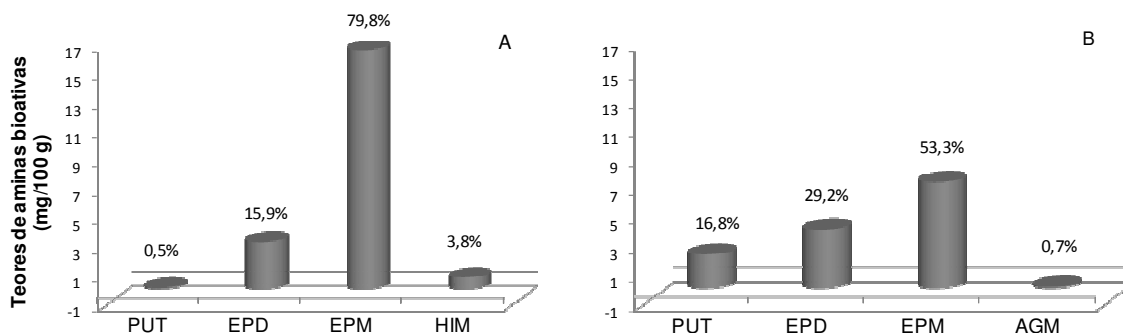


Figura I.1 - Perfil e teores de aminas bioativas e percentual de contribuição do teor de cada amina ao total de aminas bioativas no fígado suíno (A) e no testículo bovino (B). PUT: putrescina; EPD: espermidina; EPM: espermina; HIM: histamina; AGM: agmatina.

Tanto no fígado quanto no testículo houve predominância de espermina, seguida por espermidina. No fígado a presença de histamina era esperada, pois esta é encontrada naturalmente, em baixas concentrações, em tecidos de origem animal, proveniente, principalmente de mastócitos e basófilos, uma vez que estas células estão presentes em tecidos vascularizados (COUTTS et al., 1986). Segundo o autor, o tecido muscular frequentemente apresenta concentração de histamina de 1 mg/100 g, semelhante a obtida neste trabalho (0,8 mg/100 g), sendo referente, portanto, à concentração fisiológica.

No tecido espermático do peixe salmão, SASAKI et al. (1996) encontraram teores de 335 mg/100 g de espermina e 13 mg/100 g de putrescina, enquanto espermidina não foi detectada. Os teores encontrados por estes autores foram muito superiores aos obtidos neste trabalho utilizando o mesmo tipo de tecido, entretanto, de espécies diferentes.

Para determinação do alimento a ser utilizado para a obtenção de espermina foram levados em consideração aspectos tais como maior concentração de poliaminas, presença de poucos tipos diferentes de aminas, reduzida concentração de aminas biogênicas, custo e facilidade de obtenção deste subproduto, além da facilidade para utilização em um método de baixo custo e de fácil execução.

Por ser de origem animal era esperado que o testículo e o fígado apresentassem maior concentração de espermina em relação a casca de maracujá. Entretanto, ao

contrário do que se esperava, no testículo, não foi encontrada uma alta concentração de espermina, em comparação ao fígado.

4 Conclusões

O testículo bovino e o fígado suíno são fontes de aminos bioativas, sendo a espermina predominante em ambos. Na casca de maracujá não foram detectadas aminos bioativas. Portanto, como fonte de poliaminas foi selecionado o fígado suíno, pois este apresentou o perfil de aminos bioativas ideal, caracterizado pela presença de poucas aminos além de espermina e espermidina o que facilita o processo de purificação posterior, além de apresentar uma concentração de espermina maior. É também um subproduto de custo reduzido, sendo adquirido com relativa facilidade.

CAPÍTULO II: Aminas bioativas em milho fresco, em conserva, seco, germinado e embrião

Artigo aceito para publicação no periódico Food Chemistry em 30 de setembro de 2011 (Anexo A)

1 Objetivos

Pesquisar o potencial de diferentes tipos de milho quanto perfil e teores de aminas bioativas para posterior extração de espermina e fornecimento desta para animais. O objetivo específico foi determinar o perfil e os teores de poliaminas em produtos de milho comumente disponíveis na dieta brasileira.

2 Material e métodos

2.1 Amostras

Amostras de milho (*Zea mays* L.) fresco, seco e em conserva foram adquiridos no mercado de Belo Horizonte, MG, Brasil. Os grãos de milho fresco foram cuidadosamente removidos da espiga para manter o embrião intacto. O milho em conserva foi drenado e os grãos foram analisados como grão inteiro e também como embrião e grão sem embrião, separadamente. Dois cultivares de milho (BRS2020 e PL8080) foram fornecidos pela Associação de Produtores de Sementes de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. A germinação destes cultivares foi feita mantendo-se as sementes em incubadora a 22 ± 2 °C, $90 \pm 2\%$ de umidade relativa e na presença de luz. Estes foram analisados antes e depois da germinação, no 5º dia de germinação.

2.2 Reagentes, solventes e padrões

Os reagentes, solventes e padrões são os mesmos descritos no Capítulo I.

2.3 Métodos de análise

2.3.1 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método descrito na AOAC (1995). Foi usado para calcular e expressar os resultados de aminos bioativas em base seca.

2.3.2 Aminos bioativas

As aminos foram extraídas de acordo com GLÓRIA et al. (2005). Três gramas de amostra de milho foram usadas após trituração e homogeneização e as aminos foram extraídas com ácido tricloroacético 5%. As amostras foram misturadas por 5 min em agitador orbital TE-140 Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil) a 250 rpm e centrifugadas em centrífuga refrigerada Jouan CR3i (Saint Herblain, França) a 8422 $\times g$ por 20 min, a 4 °C. Esta etapa foi repetida mais duas vezes. Os sobrenadantes foram misturados, filtrados em papel de filtro qualitativo e armazenados a -18 °C até o momento das análises.

As condições utilizadas para separação e quantificação das aminos bioativas por cromatografia líquida de alta eficiência são as mesmas descritas no Capítulo I.

2.4 Análise estatística

Ao menos três diferentes lotes de cada produto foi analisado em triplicata. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

3 Resultados e discussão

3.1 Teor de umidade dos diferentes produtos de milho

O teor de umidade variou significativamente entre os produtos de milho analisados. Altos valores médios foram encontrados em milho em conserva (78,3 g/100 g) e fresco (74,3 g/100 g). O milho germinado apresentou teor médio de umidade de 70,9 g/100 g. O milho seco apresentou teor de umidade de 11,3 a 12,7 g/100 g. Estes valores são similares àqueles apresentados na literatura (LUPATINI et al., 2004;

BARBOUR et al., 2008). Devido às diferenças significativas observadas no conteúdo de umidade dos produtos de milho investigados, os teores de aminos foram calculados e comparados em base seca.

3.2 Perfil de aminos bioativos livres em milho fresco, em conserva e seco

O perfil de aminos bioativos em milho fresco, em conserva e seco estão indicados na Tabela II.1 e na Figura II.1. Das 10 aminos bioativas analisadas, espermidina e putrescina estavam presentes em todos os produtos analisados, enquanto serotonina, tiramina e triptamina não foram detectadas em nenhuma amostra. Cadaverina e feniletilamina não foram detectadas em milho em conserva. Histamina foi detectada apenas em milho fresco. Agmatina foi apenas quantificada em milho seco.

Tabela II.1 - Teores médios de aminos bioativos livres em milho fresco, em conserva e seco (*Zea mays*)

Aminos	Teores médios ^A (mg/100 g bs) / milho		
	fresco	conserva	seco
Espermidina	9,18 ± 0,12 ^a	10,5 ± 0,42 ^a	1,90 ± 0,09 ^b
Espermina	0,94 ± 0,08 ^c	1,70 ± 0,07 ^b	2,79 ± 0,16 ^a
Putrescina	3,40 ± 0,16 ^b	29,8 ± 2,58 ^a	0,51 ± 0,02 ^c
Cadaverina	0,52 ± 0,03 ^a	nd ^c	0,11 ± 0,01 ^b
Histamina	0,13 ± 0,00 ^a	nd ^b	nd ^b
Agmatina	nd ^b	nd ^b	0,32 ± 0,01 ^a
Feniletilamina	0,54 ± 0,03 ^a	nd ^b	0,51 ± 0,08 ^a

^An = 9 lotes analisados em triplicata; bs = base seca; nd = não detectado; limite de detecção: 0,1 µg/mL; limite de quantificação: 0,4 mg/100 g; médias (± desvio-padrão) com diferentes letras na mesma linha (a,b,c) são estatisticamente diferentes (teste t de Student, p ≤ 0,05).

A presença de espermidina e espermina era esperada em produtos de milho porque as poliaminas estão presentes naturalmente em vegetais. Putrescina era também esperada em baixas concentrações porque é um intermediário na síntese de espermidina e espermina (BARDÓCZ, 1995; GLÓRIA, 2005). A presença de espermidina e putrescina em milho fresco e em conserva foi apresentado por OKAMOTO et al. (1997) e ZOUMAS-MORSE et al. (2007); entretanto, espermina não foi investigada por estes autores. CAO et al. (2010) investigaram e detectaram espermina, espermidina e putrescina em milho seco.

De modo geral, espermidina e espermina contribuíram com mais de 67% do total dos teores de aminos bioativos em milho fresco e seco, entretanto, representou apenas

29% em milho em conserva (Figura II.1). Putrescina foi a amina predominante em milho em conserva (71% do teor total). Cadaverina, histamina e feniletilamina representaram menos de 15% do total de aminas bioativas em milhos fresco e seco.

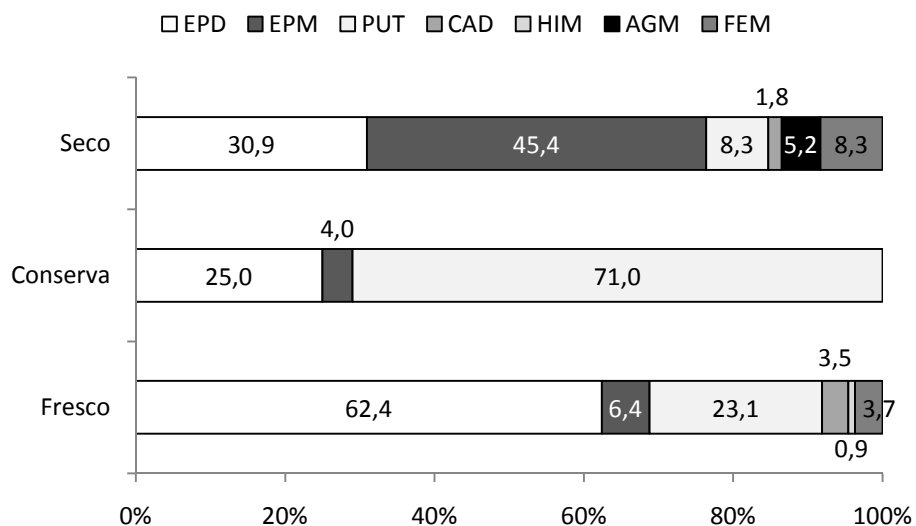


Figura. II.1 - Porcentagem de contribuição de cada amina ao total de aminas em milho fresco, em conserva e seco (*Zea mays* L.). (EPD – espermidina, EPM – espermina, PUT – putrescina, CAD – cadaverina, HIM – histamina, AGM – agmatina, FEM – feniletilamina).

Espermidina foi a amina que contribuiu com maiores teores em milho fresco (62,3%). Foi seguida por putrescina (23,1%), espermina (6,4%), feniletilamina (3,7%), cadaverina (3,5%) e histamina (0,9%). Em milho em conserva, a putrescina contribuiu com a maioria do total de aminas (71%), seguida por espermidina (25%) e espermina (4%). Portanto, o perfil de aminas em milho parece ser significativamente afetado pelo processo de conserva. Milho seco continha mais espermina (45,4%) seguido por espermidina (30,9%), putrescina e feniletilamina (8,3%), agmatina (5,2%) e cadaverina (1,8%).

Baseado nestes resultados, o perfil de aminas bioativas livres variaram significativamente entre os diferentes produtos de milho analisados. As diferenças são, provavelmente, associadas aos cultivares, às práticas de cultivo e às etapas do processamento como descrito por SHALABY (2000), LIANG & LUR (2002), GLÓRIA (2005) e FRÍAS et al. (2007).

3.3 Concentrações de aminas bioativas livres nos diferentes produtos

As concentrações totais de aminas em base seca variaram de 10,9 a 17,1 mg/100 g no milho fresco; de 5,0 a 6,9 mg/100 g no milho seco; de 14,7 a 79,7 mg/100 g no milho em conserva e de 13,8 a 18,1 mg/100 g no milho germinado (Figura II.2). A concentração total de aminas foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) em milho em conserva (42 mg/100 g) comparado ao fresco (14,7 mg/100 g) e seco (6,1 mg/100 g).

De acordo com a Figura II.2, as poliaminas espermidina e espermina contribuíram com 70% do total de aminas em milho fresco e seco; entretanto, no milho em conserva as poliaminas representaram apenas 30% das aminas.

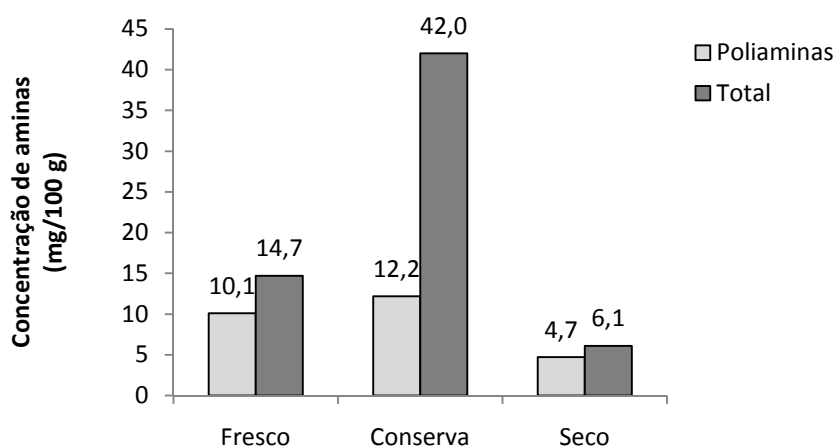


Figura II.2 - Concentrações de poliaminas e de aminas bioativas total em milho fresco, em conserva e seco (*Zea mays* L.).

As concentrações de putrescina em milho em conserva variaram entre as amostras de diferentes marcas e entre lotes da mesma marca (dados não apresentados). As altas concentrações de putrescina correlacionaram-se significativamente com o tempo de estocagem – quanto maior o período de estocagem, maior a concentração. Estudos realizados por SHALABY (2000) e CIRILO et al. (2003) indicaram que o aquecimento e cozimento afetaram as concentrações de aminas. Além disso, aminas putrefativas como a putrescina usualmente aumentam durante período de estocagem dos alimentos.

Diferentes concentrações de aminas em produtos de milho são apresentados na literatura. OKAMOTO et al. (1997) encontraram altas concentrações de putrescina e espermidina em milho fresco. ZOUMAS-MORSE et al. (2007)

encontraram baixas concentrações de espermidina e putrescina em milho fresco e conserva. As diferenças observadas no perfil e teores de amins podem ser relacionadas a diversos fatores tais como cultivares, práticas de cultivo, estresse hídrico, tempo de colheita, maturidade do grão, tipos de processamento e estocagem (FELIX & HARR, 1987; LIANG & LUR, 2002; FRÍAS et al., 2007).

3.4 Influência da germinação no perfil e teores de amins

As alterações que ocorreram nas concentrações de amins durante a germinação do milho estão indicadas na Tabela II.2. Durante a germinação, ocorreu aumento de três a seis vezes nas concentrações de espermidina e espermina e 57 vezes nas concentrações de putrescina. Portanto, durante a germinação ocorre aumento significativo nas concentrações de poliaminas e putrescina. Este resultado indica maior qualidade do produto germinado comparado ao produto não germinado, com relação às poliaminas.

Tabela II.2 - Concentrações médias de amins bioativas livres em milho seco e germinado (*Zea mays*)

Amins	Concentrações médias (mg/100 g bs) / milho	
	Seco	Germinado
Espermidina	2,00 ± 0,08 ^b	6,89 ± 1,02 ^a
Espermina	1,07 ± 0,09 ^b	5,95 ± 1,1 ^a
Putrescina	0,05 ± 0,00 ^b	2,83 ± 0,23 ^a
Histamina	0,24 ± 0,01 ^b	0,39 ± 0,00 ^a
Agmatina	0,12 ± 0,01 ^b	0,31 ± 0,17 ^a

n = 9 lotes analisado em triplicata; bs = base seca. Limite de detecção: 0,1 mg/mL; Limite de quantificação: 0,04 mg/100 g. Médias (± desvio-padrão) com diferentes letras na mesma linha (a-b) são significativamente diferentes (Teste t de Student, p ≤ 0,05).

Nenhuma alteração significativa foi observada nas concentrações de agmatina no milho germinado comparado ao não germinado; entretanto, as concentrações de cadaverina e feniletilamina foram menores enquanto as concentrações de histamina foram maiores comparadas ao milho seco (não germinado). O aumento nas concentrações de histamina podem estar associados à proteção da planta contra predadores durante a germinação (GLÓRIA, 2005). Além disso, as baixas concentrações de cadaverina e feniletilamina podem estar associadas com seu papel na elongação e produção de indol, respectivamente.

Em milho germinado BOGET et al. (1995) encontraram concentrações de putrescina, espermidina e espermina inferiores às obtidas neste trabalho. Seria

interessante investigar as razões para esta diferença, se está relacionada ao cultivar utilizado ou se o aumento observado no quinto dia de germinação poderia estar seguido por redução nas concentrações ao longo da germinação. GLÓRIA et al. (2005) verificaram resultados similares aos descritos em para soja germinada: durante a germinação houve aumento significativo nas concentrações totais de amins (6,6 vezes nas primeiras 48-72 h), seguido por redução com 96 h. O aumento significativo nas concentrações de espermidina, espermina e putrescina observados nas 48-72 h sugeriram que este foi o período de maior crescimento e replicação celular.

De acordo com FELIX & HARR (1987), após a germinação de 30 diferentes variedades de plantas incluindo milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine Max*), ocorreu aumento acentuado nas concentrações de poliaminas nos cotilédones e endosperma, enquanto cadaverina e putrescina apresentaram variações nas concentrações totais dependendo do tipo de planta e estágio de desenvolvimento.

FRÍAS et al. (2007) avaliaram alfafa e feno grego germinado obtidos por três diferentes condições de germinação (temperaturas e quantidade de luz) e observaram um aumento no conteúdo total de amins bioativas. As concentrações de amins aumentaram significativamente durante a germinação da alfafa, enquanto apenas a concentração de espermina aumentou em feno grego.

Baseado nos resultados obtidos neste estudo e também em dados da literatura, as concentrações de poliaminas aumentam e posteriormente diminuem durante a germinação. Entretanto, mais estudos são necessários para determinar o tempo de germinação requerido para alcançar o conteúdo máximo de poliaminas.

3.5 Perfil e teores de amins em diferentes partes do milho

Para determinar se o perfil de amins livres no embrião do grão era diferente do restante do grão, as duas partes foram separadas e analisadas separadamente. Milho em conserva foi utilizado para esta etapa. Altas concentrações de espermina e espermidina foram detectadas no embrião (Tabela II.3), entretanto, as concentrações de putrescina não foram significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Portanto, o germe do milho apresentou altas concentrações de espermidina.

Para fins alimentares, quando altas concentrações de espermina são desejadas, o embrião do milho pode ser usado. Ao contrário, quando concentrações reduzidas de espermina são necessárias, o milho sem embrião pode ser usado. Estudos são necessários para otimizar um processo para remoção do embrião.

Tabela II.3 - Concentrações médias de aminas bioativas livres no embrião do grão de milho e no grão sem embrião (*Zea mays*)

Aminas	Concentrações médias (mg/100 g bs) / milho	
	embrião	sem embrião
Espermidina	5,80 ± 0,46 ^a	4,74 ± 0,38 ^a
Espermina	1,03 ± 0,09 ^a	0,66 ± 0,08 ^b
Putrescina	14,3 ± 2,40 ^a	15,5 ± 2,76 ^a
Total	21,1 ± 0,98 ^a	20,9 ± 1,07 ^a

n = 3 lotes analisados em triplicata; bs = base seca. Médias (± desvio-padrão) com diferentes letras na mesma linha são estatisticamente diferentes (Teste t de Student, p ≤ 0.05).

4 Conclusões

Observou-se que o milho é uma fonte significativa de poliaminas. Milho fresco contém principalmente espermidina seguida por putrescina. Espermina, cadaverina, feniletilamina, histamina e agmatina estavam também presentes, mas em baixas concentrações. O perfil e teores de aminas foram significativamente diferentes em milho em conserva e seco comparado ao milho fresco. A putrescina foi a amina predominante em milho em conserva enquanto espermina foi predominante em milho seco. Durante a germinação do milho por cinco dias, houve um aumento significativo nos teores de espermidina, espermina e putrescina. O embrião do milho contém altos teores de espermina comparado ao milho sem o embrião. Os diferentes tipos de produtos de milho disponíveis podem ser usados para atender diferentes dietas e necessidades nutricionais. Comparando-se o perfil e teores de aminas do milho e do fígado suíno, analisado no Capítulo I, verificou-se que o fígado apresentou-se ideal como substrato para extração de espermina devido a presença de poucas aminas e maior concentração de espermina, em relação ao milho.

CAPÍTULO III: Separação de aminas bioativas por cromatografia em camada delgada e em coluna

1 Objetivos

Desenvolver um método para a separação e purificação de espermina a partir de extrato de fígado suíno, obtido no Capítulo I. Os objetivos específicos foram: i) desenvolver método para a separação das aminas bioativas por cromatografia em camada delgada utilizando sulfato de cálcio, e ii) separar as aminas bioativas por cromatografia em coluna.

2 Material e métodos

2.1 Amostras

Nove amostras de fígado suíno foram adquiridas em um matadouro-frigorífico localizado na cidade de Pedro Leopoldo/MG e transportadas em isopor contendo gelo. A partir do fígado foram extraídas as aminas bioativas para preparo dos extratos.

2.2 Reagentes, solventes e padrões

Foram utilizados os mesmos reagentes, solventes e padrões descritos no Capítulo I.

2.3 Métodos

2.3.1 Obtenção e concentração do extrato

Para extração das aminas a partir de fígado suíno (THEODORO, 2003) foram adicionados 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% em 5 g de amostra triturada e homogeneizada, pesada em tubo de centrífuga de polipropileno. As amostras foram misturadas por 10 min em mesa agitadora a 250 rpm e centrifugadas a 4 °C, a 8422 x g por 21 min e o sobrenadante filtrado em papel de filtro qualitativo. Esta etapa foi

repetida mais duas vezes com o mesmo volume de ácido, totalizando 21 mL adicionados.

O volume final de filtrado obtido de todas as amostras foi coletado e concentrado em rotavapor (R-114 Büchi, Uster, Suíça), com banho de água à temperatura de 50 a 60 °C (para não degradar as aminas), com pressão reduzida. Foram conectados ao rotavapor uma bomba de vácuo modelo 151VC/1700 rpm (Fabbe-Primar, Brasil) e um *trap* contendo nitrogênio líquido. O sistema de rotavapor com bomba de vácuo foi utilizado com *trap* contendo nitrogênio líquido, para evitar que resíduos de amostra ou solvente penetrassem na bomba, danificando-a.

A partir deste extrato concentrado foi realizada a separação das aminas bioativas por destilação, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em coluna (CC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.3.2 Destilação do extrato

As etapas de separação e purificação das aminas bioativas foram realizadas no laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG, coordenado pela professora Dorila Piló-Veloso.

Para a separação das aminas bioativas foi utilizado o método de destilação de ZOTOV et al. (2007). O extrato concentrado obtido a partir de fígado suíno foi destilado utilizando coluna de fracionamento. As frações destiladas foram recolhidas separadamente, na saída da coluna, de acordo com o ponto de ebulição de cada uma das aminas. Para aquecimento da amostra utilizou-se banho de nujol sobre chapa de aquecimento. As temperaturas da chapa de aquecimento e da saída da coluna foram controladas durante todo o tempo, não ultrapassando 150 °C e 100 °C, respectivamente.

As frações destiladas e o conteúdo restante (não destilado) foram analisados quanto ao teor de aminas bioativas por CLAE.

2.3.3 Separação preparativa de aminas por cromatografia em coluna

2.3.3.1 Preparo da coluna

Para a CC utilizou-se coluna de vidro com 82 cm de altura e 2 cm de largura, com extremidade esmerilhada para encaixe de conector com saída para bomba de vácuo. A fase estacionária foi preparada com sulfato de cálcio anidro da marca Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e solução propanol e água na proporção de 75% (3:1, v/v).

Esta mistura foi colocada em agitador magnético durante 4 h, intercaladas, a cada 1 h, com 1 min em ultra-som. Para o empacotamento foi aplicada pressão de 0,3 kgf/cm³, com auxílio de bomba a vácuo, sobre a fase móvel, durante 2 h e, após este período, a coluna foi deixada em repouso por 10 h, de forma que a altura final da fase estacionária foi de 28 cm.

2.3.3.2 Separação das aminas bioativas por CC

O extrato de fígado concentrado foi introduzido na coluna após estabilização da fase móvel. A fase móvel foi sendo adicionada à coluna, cuidadosamente, à medida que estava sendo consumida. Frações foram coletadas individualmente, a cada 5 mL, em frascos de vidro para penicilina e identificadas sequencialmente. Após coletadas, as frações foram imediatamente analisadas por CCD e comparadas quanto aos padrões de aminas bioativas comerciais para identificação. Posteriormente estas mesmas frações foram analisadas quanto ao perfil e teores de aminas bioativas, por CLAE.

A corrida terminou após o deslocamento completo da amostra, verificado concomitantemente por CCD, quanto a ausência de manchas nas placas.

2.4 Métodos de análise

2.4.1 Determinação qualitativa das aminas por CCD

2.4.1.1 Preparo das placas

A fase estacionária das placas utilizadas na CCD foi preparada com sulfato de cálcio anidro da marca Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), de acordo com KHAN (2006), com modificações na proporção dos reagentes. Adicionaram-se 8 mL de água destilada e 24 mL de propanol da marca Synth (Diadema, SP, Brasil) em 7 g de sulfato de cálcio anidro. Esta mistura foi colocada em agitador magnético durante 4 h, intercaladas, a cada 1 h, com 1 min em ultra-som e, logo em seguida, despejada sobre placas de vidro de 4,5 x 10 cm, previamente limpas com acetona e espalhada com auxílio de um homogeneizador de placas, para formação de uma camada uniforme com espessura de 0,25 mm.

Após a aplicação da fase estacionária, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por aproximadamente 10 min e depois colocadas em estufa a 110 °C, por 1 h e armazenadas à temperatura ambiente até o momento da utilização.

2.4.1.2 Separação das aminas bioativas por CCD

Antes da aplicação dos extratos e dos padrões de aminas, as placas foram colocadas em estufa durante 3 min para reativação. Na mesma placa foram aplicados os padrões de aminas e o extrato de fígado concentrado, sempre na mesma sequência, com auxílio de capilares e a eluição foi feita em cuba contendo fase móvel.

Como fases móveis foram testadas soluções de: acetona e água (2:1); etanol e água (1:1); propanol e água (1:1, 2:1, 3:1, 1:1 + NH₄OH (1:20) e 2:1 mais adição de NH₄OH (1:60)); metanol e água (6:1 e 5:1); acetonitrila e água (1:1, 2:1 + NH₄OH (1:20) e 1:1 + NH₄OH (1:60)). O tempo de corrida variou de acordo com a fase móvel utilizada e foi determinado pela observação visual do término das placas, não sendo, portanto, contabilizado.

As amostras foram reveladas com solução alcóolica de ninidrina a 0,2% e colocadas em estufa a 110 °C, durante 30 min para o aparecimento de manchas coloridas.

A identificação das manchas do extrato de fígado foi baseada na comparação das distâncias percorridas pelas aminas encontradas no extrato com os padrões de aminas, desde o ponto de aplicação até o ponto de deslocamento final.

2.4.2 Determinação quantitativa e qualitativa das aminas por CLAE

Foram utilizadas as mesmas condições descritas no Capítulo I.

3 Resultados e discussão

3.1 Concentração dos extratos

A amostra concentrada final apresentou coloração amarela mais acentuada que a inicial e maior opacidade. Após decantação observou-se que houve precipitação de substância branca no fundo do recipiente. Após centrifugação a 1800 x g, 4 °C por 20 min, observou-se que houve redução da turbidez e maior quantidade de substância branca depositada no fundo do recipiente. O conteúdo líquido foi vertido restando apenas a substância branca precipitada no fundo do frasco. Ambos (líquido vertido e substância branca) foram analisados quanto ao teor de aminas bioativas por CLAE e verificou-se que a substância branca não apresentava aminas bioativas, as quais estavam presentes no líquido vertido.

O pH das amostras antes e depois da concentração foi igual a 1,0, enquanto o do balão coletor e do *trap* foram de 2,15 e 5,0, respectivamente, o que sugere a evaporação do ácido utilizado na extração das aminas.

Para avaliar a eficiência do processo, amostras coletadas no balão contendo a amostra concentrada, no tubo coletor e no *trap* foram analisadas por CLAE, quanto ao teor de aminas bioativas. Putrescina, cadaverina, histamina (traços), espermidina e espermina, esta última em grande quantidade, estavam presentes na amostra concentrada, sugerindo que não foram destruídas pelo calor aplicado durante o processo de concentração em rotavapor. No balão coletor e no *trap* foram encontrados traços de putrescina, espermidina e espermina.

A concentração do extrato em rotavapor apresentou-se eficiente e auxiliou os processos subsequentes de purificação, diminuindo o volume de solventes necessários. Desta forma, outras amostras foram concentradas, seguindo o mesmo processo e também foram analisadas por CLAE quanto ao teor de aminas bioativas.

3.2 Purificação do extrato por destilação em coluna de fracionamento

Com a amostra concentrada, optou-se, inicialmente, por promover a separação das aminas utilizando-se destilação em coluna de fracionamento. Como o ponto de ebulição das aminas em questão é relativamente alto, pensou-se que este método poderia promover a separação tanto das aminas, quanto destas do ácido tricloroacético utilizado na extração.

A temperatura da solução que saiu através da coluna não ultrapassou 100 °C e apresentou odor característico de acetato e de amina. Esta solução e o conteúdo restante do balão contendo a amostra foram analisados quanto ao perfil de aminas por CLAE e constatou-se apenas a presença de espermidina em ambos. Ao final do processo, a amostra contida no balão mantido sob chapa de aquecimento a 50 °C apresentava-se com coloração marrom escura. Verificou-se, portanto, que houve degradação das aminas por este processo, pois apenas a espermidina foi detectada. Possivelmente o uso de vácuo poderia reduzir a temperatura durante o processo de separação e, reduzir as perdas de aminas, entretanto, não havia equipamento com esta característica que pudesse ser utilizado.

3.3 Otimização da CCD para separação de aminas

Após o preparo das primeiras placas de CCD observou-se a presença de irregularidades sobre a superfície, caracterizadas por numerosos pontos salientes, que comprometeriam a eficiência da separação da amostra. Assim, foram testados diversos métodos de preparo como alteração do solvente, das proporções de solvente e sulfato de cálcio, maior tempo de agitação, aplicação de ultra-som, utilização de peneira para redução do tamanho das partículas de sulfato de cálcio (60 mesh) e maceração em cápsula de porcelana. Destes, um maior tempo de agitação (4 h) e aplicação de ultra-som (4 min) apresentaram melhores resultados, de forma a obterem-se placas com superfície uniforme (Figura III.1).

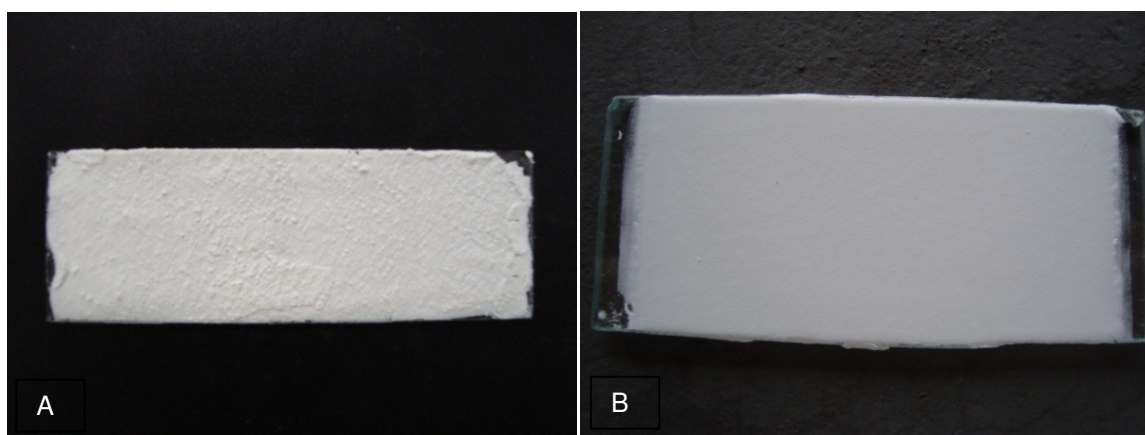


Figura III.1 - Placas de cromatografia em camada delgada preparadas com sulfato de cálcio para a separação de aminas: (A) presença de imperfeições sobre a superfície, e (B) placa com superfície uniforme.

Para os testes preliminares nas placas foram aplicadas amostras de extrato de fígado e de padrões de espermidina e espermina, sempre em uma mesma sequência para padronização das placas. Nestes testes optou-se por utilizar apenas os padrões de espermidina e espermina para facilitar a manipulação das placas e aplicação do método e, posteriormente os padrões de outras aminas também seriam utilizados.

Foram testadas diversas fases móveis para a separação das aminas, mudando-se o tipo e a proporção de solventes para alteração da polaridade da solução. Inicialmente foram testados solventes puros (acetona, etanol, propanol, metanol e acetonitrila) para verificação do perfil da separação nas placas, entretanto, verificou-se que acetona e acetonitrila deslocaram muito pouco a amostra, e os padrões permaneceram completamente retidos no local de aplicação na fase estacionária. Metanol, etanol e propanol deslocaram muito pouco a amostra e os padrões.

Para aumentar a polaridade da fase móvel e possibilitar o deslocamento das aminas foram testadas diversas proporções destes solventes em água, além da adição de uma base forte, o hidróxido de amônio (Tabela III.1).

Após a observação das placas verificou-se que as soluções de propanol e de acetonitrila apresentaram os melhores resultados, sendo que o propanol apresentou melhor resolução (separação das manchas) em comparação à acetonitrila. A adição de hidróxido de amônio com intenção de reduzir as caudas, não apresentou bons resultados, pois estas continuaram a ser formadas. Optou-se, portanto, por utilizar como fase móvel, solução de propanol e água a 75% (3:1, v/v). Os resultados de alguns testes com diferentes fases móveis estão ilustrados na Figura III.2.

Tabela III.1 - Fases móveis testadas na cromatografia em camada delgada para separação de extrato de fígado, contendo aminas bioativas e os resultados obtidos

Fase móvel	Proporção (v/v)	Resultado
Acetona e água	2:1	Pouca eluição da amostra e formação de cauda nos padrões
Etanol e água	1:1	Eluição total, não promovendo separação da amostra
	3:1	Eluição total, não promovendo separação da amostra
Propanol e água	1:1 e 2:1	Eluição da amostra e padrões, porém pouca resolução e formação de cauda
	1:1+NH ₄ OH (1:20)	Eluição total da amostra e padrões, unindo-se no final da placa
	2:1+NH ₄ OH (1:60)	Eluição total e boa separação da amostra e padrões, porém com formação de cauda
	3:1	Eluição parcial e separação da amostra e padrões
Metanol e água	6:1	Pouca eluição da amostra e padrões
	5:1	Pouca eluição da amostra e padrões
Acetonitrila e água	2:1	Eluição parcial da amostra, porém, pouca resolução. Formação de cauda na eluição da espermidina e pouca eluição da espermina
	2:1+ NH ₄ OH (1:20)	Eluição total da amostra e padrões, unindo-se ao final da placa
	1:1	Amostra separou bem, mas houve formação de muita cauda
	1:1+NH ₄ OH (1:60)	Eluição total e boa separação da amostra e padrões, porém com formação de cauda

NH₄OH: hidróxido de amônio.

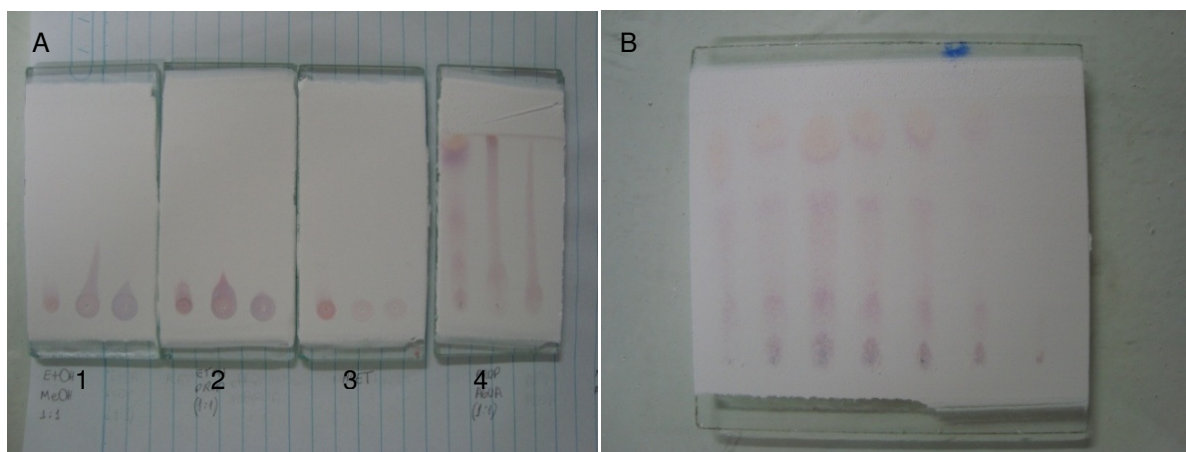


Figura III.2 - Placas de CCD preparadas com sulfato de cálcio, para a separação de aminas. Testes com fase móvel na cromatografia em camada delgada: (A1 e A2) amostras pouco eluídas, (A3) amostras retidas, (A4) formação de cauda, e (B) separação das aminas, utilizando fase móvel propanol:água a 75% (3:1, v/v). Fase móvel: A1=etanol e metanol, 1:1; A2=etanol e propanol, 1:1; A3=acetona; A4=propanol e água 1:1.

3.4 Otimização da CC para a separação das aminas

Após o estabelecimento das condições de preparo da fase móvel e da fase estacionária, iniciaram-se os testes com a coluna cromatográfica. Foram testados dois tipos de coluna, uma mais curta e larga (25 x 2,0 cm) e outra mais comprida e estreita (40 x 1,0 cm), entretanto, em ambas não ocorreu o deslocamento da fase móvel, havendo a necessidade da aplicação de vácuo com bomba.

Foi então utilizada uma coluna mais longa e mais larga que as anteriores (82 x 2 cm). Foi introduzida a fase estacionária composta por sulfato de cálcio e solução de propanol e água a 75% e foi feito o empacotamento da coluna. Após introdução da amostra e eluição de fase móvel, composta por propanol:água (3:1 v/v), foram coletadas, na saída da coluna, frações de aproximadamente 5 mL, para serem analisadas imediatamente por cromatografia em placas, para verificar a separação das aminas.

Após a separação das amostras das primeiras colunas construídas verificou-se que a quantidade de amostra introduzida foi insuficiente, pois, ao serem analisadas as frações nas placas não foi identificada nenhuma substância, mesmo após a concentração destas frações. Na tentativa de verificar a ausência de manchas nas placas, estas foram também reveladas em câmara de ultravioleta, onde verificou-se a presença de aminas apenas após a aplicação de amostra mais concentrada. Assim, nas colunas seguintes foi introduzida uma quantidade maior de amostra, ajustando-a

ao tamanho da coluna e à quantidade de fase estacionária. No início observou-se, através da CCD, que a distância da mancha ao ponto de aplicação no início da placa (d_r) estava muito próxima, o que poderia ser devido a alta concentração da amostra ou a concentração da fase móvel utilizada, optando-se, portanto, pela aplicação de fase móvel com gradiente de concentração. Os gradientes utilizados foram propanol e água a 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30% e água pura, sendo que o monitoramento através de placas de cromatografia em camada delgada seguiu este mesmo gradiente.

Após a coleta das frações e preparo das placas observou-se que no gradiente a 5% não houve deslocamento de nenhuma substância. Os gradientes a 10% e 15% promoveram o deslocamento de substância, provocando a presença de duas manchas, com d_r de aproximadamente 4,5 e 5,0 cm. O gradiente a 20% promoveu o deslocamento de substância com o mesmo fator de retenção da mancha produzida pelo gradiente a 10% e 15% além de outra com fator de retenção menor, de aproximadamente 3 cm. A 25% houve eluição de outra substância, com fator de retenção diferente dos anteriores (aproximadamente 6 cm), sugerindo, portanto, a presença de quatro substâncias diferentes detectadas pelo método de cromatografia em camada delgada. A 30% e com água pura as placas não revelaram substância, indicando que a polaridade da fase móvel de 10% a 25% é suficiente para arrastar todos os componentes da amostra.

Para analisar os resultados obtidos nas placas, nas frações nas quais verificou-se a presença de alguma substância, foram determinadas as aminas bioativas por CLAE. Verificou-se a presença de aminoácidos, os quais eluem logo no início do cromatograma, anteriormente à eluição de aminas bioativas. Após análise por CLAE observou-se que a substância eluída com fase móvel a 10% foi a cadaverina e a 15% foi a espermidina e a histamina. À 20 e 25% houve eluição apenas de aminoácidos, enquanto a espermina não foi detectada.

Como o objetivo deste trabalho foi a obtenção de aminas purificadas, estas não poderiam ter sua constituição alterada por derivação, por isso buscou-se por métodos de separação nos quais as aminas não precisariam ser derivadas, como sugerido por KHAN (2006).

KHAN (2006) comparou a separação de poliaminas utilizando placas impregnadas com sílica e com sulfato de cálcio e observou que a separação com sulfato de cálcio foi melhor para a separação de poliaminas. Estes resultados são similares aos obtidos neste trabalho. Este autor investigou vários solventes e verificou que o metanol promoveu a melhor separação das aminas, mas o fator de retenção da

espermidina e da espermina foi o mesmo. No presente trabalho o uso de propanol apresentou melhores resultados quando comparado à solução com metanol, além de promover a separação entre espermina e espermidina.

A quantidade de aminas obtidas em escala laboratorial foi pequena, sendo recomendada, portanto, a utilização de métodos em escala industrial, com objetivo de reduzir tempo e custo.

4 Conclusões

Na CCD, a solução de propanol apresentou melhor resolução para separação das aminas e foi utilizada como fase móvel, na proporção de 75% (3:1, v/v). Como fase estacionária foi utilizado sulfato de cálcio com espessura de 0,25 mm, distribuído em placa de vidro medindo 4,5 x 10 cm.

Na CC foi utilizada uma coluna de vidro com 82 cm de comprimento e 2 cm de largura. Como fase estacionária foi utilizado sulfato de cálcio e como fase móvel propanol e água (3:1, v/v) à pressão de 0,3 kgf/cm³, com bomba a vácuo, sendo a altura final da fase estacionária de 28 cm. O método de CC proporcionou boa separação das aminas, entretanto, mais estudos são necessários para conseguir melhor separação e um extrato rico em espermina e livre de interferências.

CAPÍTULO IV: Avaliação de parâmetros bioquímicos sanguíneos, aminos bioativas e estabilidade oxidativa em carne de rato após administração de espermina - Experimento piloto

1 Objetivos

Adequar tratamentos (doses e tempos) e técnicas analíticas para verificar o efeito antioxidante da espermina *in vivo*. Os objetivos específicos foram: i) avaliar o coeficiente de eficácia alimentar; ii) verificar a influência dos tratamentos sobre os parâmetros bioquímicos séricos; iii) avaliar o pH da carne; iv) avaliar os teores de aminos bioativas na carne; v) e avaliar a oxidação pelas análises de dienos conjugados (carne) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (carne e fígado) e vi) perfil de ácidos graxos na carne.

2 Material e Métodos

2.1 Animais e dieta

Foram utilizados ratos *Wistar, Rattus norvegicus var. albinus* com 90 dias de idade, pesando aproximadamente 300 g, provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas plásticas de polipropileno, receberam água e dieta Labina (Purina) *ad libitum* (Tabela IV.1) e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) (FIOCRUZ, 2005).

Tabela IV.1 - Composição centesimal da ração comercial para ratos Labina (Purina)

Componentes	Concentrações (g/100 g)
Umidade (máx)	13
Proteína bruta (mín)	23
Extrato etéreo (mín)	4
Matéria fibrosa (máx)	5
Matéria mineral (máx)	10
Glicídios (diferença)	45
Cálcio (máx)	1,3
Fósforo (mín)	0,85

2.2 Tratamentos

Dezesseis ratos machos foram aleatoriamente distribuídos em dois experimentos, sendo 8 animais para cada experimento. No experimento piloto 1 (EP1), os animais foram distribuídos em quatro grupos, recebendo diferentes doses de espermina, 0, 27, 100 e 167 mg/kg/dia, respectivamente grupos controle, G8, G30 e G50, durante diferentes períodos de tempo, sendo dois animais para cada tratamento (Tabela IV.2). Após a realização do EP 1 e observação dos resultados foi realizado o EP 2. No EP2, os animais foram distribuídos em quatro grupos, recebendo as mesmas doses de espermina do EP1, entretanto, durante um período único de tempo para todos os grupos, sendo dois animais para cada tratamento (Tabela IV.3). Foram preparadas soluções aquosas de espermina a partir do padrão tetracloridrato de espermina (S-2876) da Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, EUA) e estas foram administradas por gavagem.

Tabela IV.2 - Condições experimentais do experimento piloto 1, utilizando oito animais, sendo dois animais por grupo, diferentes doses de espermina (0 a 50 mg) e períodos de tratamento (quatro a dez dias)

Grupo	Dose EPM (mg)/animal diluída em 0,3 mL de água	Dose/dia (mg EPM/kg)	Período (dias)
Controle	0	0	7
G8	8	27	10
G30	30	100	7
G50	50	167	4

EPM = espermina; kg = quilograma de peso vivo.

Os animais do EP 1, submetidos a 7 e 10 dias de tratamento foram pesados ao 5º dia para ajuste da dose administrada em função da alteração de peso corporal.

Tabela IV.3 - Condições experimentais do experimento piloto 2, utilizando oito animais, sendo dois animais por grupo, diferentes doses de espermina (0 a 50 mg) e um período de tratamento (quatro dias)

Grupo	Dose EPM (mg)/animal diluída em 0,3 mL de água	Dose/dia (mg EPM/kg)
Controle	0	0
G8	8	27
G30	30	100
G50	50	167

EPM = espermina; kg = quilograma de peso vivo.

2.3 Eutanásia e coleta de material para análises

Os animais foram eutanasiados 48 h após a administração da última dose do tratamento, utilizando associação de cloridrato de cetamina (1,16 g/10 mL) e cloridrato de xilazina (200 mg/10 mL), nas doses de 66 mg/kg e 8,6 mg/kg, respectivamente e cloreto de potássio a 20% (FIOCRUZ, 2005).

Após a aplicação intraperitoneal de 0,1 mL da associação de cetamina e xilazina/100 g de peso vivo, o sangue foi coletado por punção intracardíaca. Para obtenção do soro, o sangue foi imediatamente centrifugado a 2330 x g durante 10 min. Em seguida foi aplicada outra dose de anestésico, por via intraperitoneal, e 1 mL de cloreto de potássio, por via intracardíaca, até completa parada cardíaca, determinada por ausculta.

Após a eutanásia foram retirados a pele e as vísceras e a carcaça foi armazenada em refrigerador a 4 °C por 24 h. Após este período a carne foi separada dos ossos, moída em multiprocessador, embalada em sacos de polietileno e armazenada em refrigerador a -18 °C, separadas em dois grupos (0 e 45 dias). Estas amostras foram analisadas quanto ao teor de aminas bioativas, pH, perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa pelos métodos de dienos conjugados (DC) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O fígado foi separado das outras vísceras, moído e armazenado, individualmente, em sacos de polietileno para análises de TBARS. No sangue foi feita avaliação dos parâmetros bioquímicos.

As análises de pH, DC e TBARS foram realizadas aos 0 e 45 dias (respectivamente T0 e T45), após a eutanásia dos animais, enquanto as análises de aminas bioativas e ácidos graxos foram realizadas apenas uma vez.

2.4 Métodos de análise

2.4.1 Determinação do consumo de alimento, variação de peso e rendimento em carne

Os animais foram pesados no início e final do experimento, assim como a quantidade de ração consumida foi calculada no mesmo período. Para cálculo do rendimento em carne foi utilizado o peso inicial do animal e o peso obtido após a retirada de toda a carne

2.4.2 Análise do sangue quanto aos parâmetros bioquímicos

As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de patologia clínica da Escola de Veterinária da UFMG, utilizando o aparelho automático Cobas Mira (Roche) com sistemas comerciais da Bioclin®. Foram avaliadas as concentrações de glicose, uréia, creatinina, albumina, cálcio, fosfatase alcalina, proteínas totais, bilirrubina total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), amilase, colesterol e fósforo, analisadas no soro sanguíneo.

2.4.3 Determinação do pH

Para a determinação do pH foram pesados 2 g de tecido muscular moído, em béquer, ao qual foram adicionados 20 mL de água deionizada (BRASIL, 1999). Esta mistura foi homogeneizada e deixada em repouso durante 30 min. Em seguida o pH foi determinado utilizando potenciômetro DM20 Digimed (São Paulo, Brasil), de acordo com IAL (2004). Momentos antes da medição o aparelho foi aferido com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0.

2.4.4 Determinação de aminas bioativas

Para extração das aminas foi utilizado o método de VALE & GLÓRIA (1997) modificado. Em tubo de centrífuga de polipropileno foram pesados 1 g de amostra e adicionados 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. As amostras foram misturadas por 5 min em mesa agitadora a 250 rpm e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4 °C e 8422 x *g* por 20 min e o sobrenadante filtrado em papel de filtro qualitativo. Esta etapa foi repetida mais duas vezes com o mesmo volume de ácido, totalizando 21 mL adicionados. O volume final foi coletado em proveta, medido e armazenado em refrigerador, a -18 °C até o momento da análise.

O processo de separação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência é o mesmo descrito no Capítulo I.

2.4.5 Determinação de dienos conjugados

Foram pesados 30 mg de lipídios previamente extraídos (FOLCH et al., 1957), em balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com isooctano, de acordo com método da IUPAC (1992). Para a leitura foi utilizada cubeta de quartzo de 1 cm e isooctano como branco. As medidas da absorvância foram efetuadas no comprimento de onda de 232 nm. A concentração de dienos conjugados foi determinada pela

fórmula abaixo, sendo que a concentração da amostra é a quantidade de óleo dissolvida para 100 mL de isooctano.

$$\text{Dienos conjugados (\%)} = \frac{\text{Absorvância}}{\text{Concentração da amostra} \times \text{largura da cubeta}}$$

2.4.6 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação de TBARS foi feita de acordo com metodologia de BUEGE & AUST (1978) modificada. Foram preparados homogeneizados a partir da carne e fígado dos ratos utilizando-se 1 g de amostra moída e 4 mL de solução salina 0,9%. O homogeneizado foi transferido para um frasco de polipropileno e armazenado a -18 °C até o momento das análises.

Foram adicionados 1,8 mL de água deionizada à 200 µL do homogeneizado preparado previamente e 8 mL de solução TBARS contendo ácido clorídrico 0,25 N, adicionado de ácido tricloroacético 15% (p/v) e ácido tiobarbitúrico 0,375% (p/v). Esta mistura foi aquecida por 30 min em banho de água a 90 °C e depois centrifugada a 4 °C e 5000 x g, durante 10 min, para remover a proteína precipitada. Como branco foi utilizada solução de TBARS, salina e água deionizada nas mesmas proporções. Foi feita leitura em espectrofotômetro UV1650p (Shimadzu, Kioto, Japão) a 535 nm e a concentração de malonaldeído foi calculada através do coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^5$ M/cm.

2.4.7 Determinação do perfil de ácidos graxos

Os lipídios previamente extraídos (FOLCH et al., 1957) foram armazenados a 4 °C, em eppendorf sob atmosfera de nitrogênio, até o momento das análises. A determinação do perfil de ácidos graxos foi realizada na EMBRAPA/CNPGL, na cidade de Juiz de Fora, MG, utilizando cromatografia gasosa em coluna capilar de sílica fundida (CPSil-88, 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm) e detector de ionização em chama, de acordo com DESTAILLATS et al. (2007). As condições utilizadas foram: temperatura inicial do forno 45 °C por 4 min, elevada a 175 °C a 13 °C/min e a 215 °C a 4 °C/min. A injeção foi feita no modo *split*, razão 1:50. Como gás de arraste foi utilizado hidrogênio, em fluxo de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi de 250 °C e do detector 250 °C. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com tempos de retenção dos padrões comerciais, sendo apenas detectados, mas não quantificados.

2.5 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, com exceção da análise de ácidos graxos que foi feita apenas uma vez. Os dados foram analisados utilizando o *software* SAEG, com tratamento e tempo como fatores. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão e as diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA). A significância estatística das diferenças foi avaliada utilizando-se testes a 0,05, enquanto as correlações entre diferentes parâmetros foram avaliadas através da correlação de Pearson.

3 Resultados e discussão

3.1 Consumo de ração, variação de peso e rendimento em carne

O consumo de ração e a variação de peso durante os tratamentos podem ser observados na Tabela IV.4. Os ratos apresentaram rendimento em carne de aproximadamente 28%.

Tabela IV.4 - Variação de peso e consumo de ração dos ratos dos experimentos piloto (EP) 1 e 2, após administração de espermina em diferentes doses e tempos de tratamento

Tratamento	EP 1		EP 2	
	Variação de peso (g)	Consumo de ração (g)	Variação de peso (g)	Consumo de ração (g)
Controle	5,542	19,71	-3,291	29,97
G8	-1,513	20,90	3,873	28,58
G30	1,081	22,72	-50,250	16,00
G50	7,403	22,26	-0,624	31,69

Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes letras maiúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes (A-C) (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$). Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes letras minúsculas na mesma linha são significativamente diferentes (a-b) (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

Foi observado que os animais do EP 2, submetidos à dose de 30 mg/dia de espermina (grupo G30) apresentaram uma queda significativa no peso corporal. Isso pode ter ocorrido em função de diarreia apresentada pelos animais, sendo que um deles teve diarreia no primeiro dia de tratamento, enquanto o outro, no segundo dia. Em ambos os casos, a diarreia durou aproximadamente 24 h e não foi observada nos animais dos outros grupos e do outro experimento e não foi correlacionada com o

tratamento experimental. Observou-se também que o consumo de ração do mesmo grupo também foi baixo quando comparado aos outros grupos, o que também explica a maior perda de peso dos animais do grupo.

No EP 1, o consumo de ração foi menor. Isso pode ter ocorrido devido a falta de experiência do manipulador, de forma a causar maior estresse nos animais.

3.2 Influência da administração de espermina nos parâmetros bioquímicos do sangue

Os resultados relativos ao efeito da administração oral de espermina sobre os parâmetros bioquímicos sanguíneos dos animais submetidos ao EP 2 estão apresentados na Tabela IV.5. Foi observada redução nas atividades das enzimas fosfatase alcalina e amilase e aumento na concentração de colesterol nos animais do grupo G30, quando comparado aos animais do grupo controle. Assim como no grupo G30, no grupo G8 também foi observado um aumento nas concentrações de colesterol, entretanto, acredita-se que estas variações observadas não sejam devido a administração de espermina, uma vez que nos animais do grupo G50, que receberam a maior dose, não houve diferença em relação ao grupo controle. Este resultado parece ter sido influenciado pela ocorrência de diarreia nos animais do grupo G30.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos foi importante para a determinação de possíveis alterações decorrentes da administração de espermina, não sendo constatada nenhuma alteração renal ou hepática nos animais tratados, como observado por TIL et al. (1997).

Tabela IV.5 - Efeito da administração oral de espermina sobre os parâmetros bioquímicos de ratos no experimento piloto 2, que receberam diferentes doses de espermina (8, 30 e 50 mg/kg)

Parâmetros	Unidade	Tratamentos			
		Controle	G8	G30	G50
Glicose	(mg/dL)	137,50±9,91	155,50±7,78	125,00±6,90	156,50±10,01
Uréia	(mg/dL)	44,00±3,87	50,00±4,89	46,00±3,59	41,50±3,21
Creatinina	(mg/dL)	0,50±0,23	1,00±0,15	0,65±0,04	0,45±0,01
Albumina	(g/dL)	2,55±0,55	2,80±0,99	2,40±0,79	2,50±0,88
Cálcio	(mg/dL)	11,00±0,09	10,30±0,04	10,80±0,09	9,95±0,07
Fosfatase alcalina	(U/L)	262,50±13,99	244,50±10,97	61,00±7,89*	256,50±15,34
Proteínas totais	(mg/dL)	6,60±1,66	6,80±1,05	6,45±1,39	6,30±1,48
Bilirrubina total	(mg/dL)	0,28±0,01	0,26±0,02	0,29±0,06	0,23±0,02
ALT	(U/L)	197,00±12,45	197,50±9,89	207,00±9,90	201,00±11,73
AST	(U/L)	26,00±1,79	22,00±2,15	25,00±1,57	24,00±1,37
Amilase	(U/L)	873,00±23,89	883,50±15,48	539,00±17,89*	859,50±19,90
Colesterol	(mg/dL)	86,50±58,45	104,50±23,67*	127,00±37,82*	99,00±40,74
Fósforo	(mg/dL)	8,65±1,01	7,40±1,11	9,20±1,45	8,65±0,99

Os valores representam a média (\pm desvio-padrão) obtida em aparelho automático Cobas Mira (Roche) com kits da Bioclin®. *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p \leq 0,05$).

3.3 Influência da administração de espermina no pH

A determinação do pH foi realizada para avaliação da qualidade da carne, em função da administração de espermina, que é uma substância que apresenta propriedades básicas. Observou-se, no EP 1, aumento nos valores de pH dos grupos tratados em relação ao grupo controle, tendo este resultado se repetido no tempo T0 do EP 2, enquanto no tempo T45 foi observado aumento apenas no grupo G30 (Tabela IV.6).

Tabela IV.6 - Valores do pH da carne de rato dos experimentos piloto (EP) 1 e 2, nos tempos T0 e T45, respectivamente 0 e 45 dias após a eutanásia que receberam diferentes doses de espermina (8, 30 e 50 mg/kg)

Tratamento	Valores de pH da carne			
	EP 1		EP 2	
	T45	T0	T45	T45
Controle	6,39±0,00 ^a	6,40±0,00 ^{a,A}	6,40±0,01 ^{a,A}	6,40±0,01 ^{a,A}
G8	6,43±0,02 ^b	6,45±0,01 ^{b,A}	6,39±0,01 ^{a,B}	6,39±0,01 ^{a,B}
G30	6,43±0,02 ^b	6,63±0,05 ^{c,A}	6,62±0,1 ^{b,A}	6,62±0,1 ^{b,A}
G50	6,45±0,02 ^b	6,46±0,01 ^{b,A}	6,42±0,03 ^{a,B}	6,42±0,03 ^{a,B}

Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes letras (a-c) na mesma coluna e na mesma linha (A-B) são significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

3.4 Aminas em carne

Em todas as amostras de carne de rato foram encontradas as aminas putrescina, histamina, espermidina e espermina, sendo que a cadaverina foi encontrada apenas em um dos animais do grupo G8 e em outro do G50 do EP 1 (Tabela IV.7).

Tabela IV.7 - Teores de aminas bioativas (mg/100 g) em carne de ratos tratados com espermina por via oral, dos experimentos piloto (EP) 1 e 2

Aminas (mg/100 g)						
Amostra	PUT	CAD	HIM	EPD	EPM	Total
EP 1						
Controle	0,04±0,00 ^b	ND	1,03±0,01 ^a	2,15±0,11 ^b	12,19±0,48 ^a	15,41±0,47
G8	0,04±0,01 ^b	0,15±0,01 ^a	0,85±0,09 ^a	2,08±0,06 ^b	13,28±0,77 ^a	16,32±0,80
G30	0,01±0,01 ^a	ND	0,74±0,24 ^a	1,58±0,16 ^a	12,48±0,60 ^a	14,81±0,58
G50	0,05±0,01 ^b	0,46±,16 ^b	1,14±0,01 ^a	1,80±0,11 ^a	12,51±0,48 ^a	15,95±0,50
EP 2						
Controle	0,05±0,02 ^a	ND	1,17±0,23 ^a	2,26±0,09 ^a	18,50±0,94 ^b	21,98±1,01
G8	0,04±0,01 ^a	ND	1,10±0,13 ^a	2,14±0,10 ^a	17,18±1,86 ^b	20,44±1,79
G30	0,02±0,01 ^a	ND	1,43±0,34 ^a	2,36±0,43 ^a	15,42±0,99 ^a	19,23±0,95
G50	0,05±0,01 ^a	ND	1,08±0,14 ^a	2,14±0,14 ^a	20,51±1,22 ^c	23,77±1,20

ND = não detectado. Limite de detecção: 0,1 mg/mL; Limite de quantificação: 0,04 mg/100 g. Médias (± desvio-padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-b) (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$). Put: putrescina; Cad: cadaverina; Him: histamina; Epd: espermidina; Epm: espermina.

A administração de espermina à dieta dos ratos não aumentou de forma significativa a concentração de espermina depositada na carne dos animais do EP 1, entretanto, no EP 2 a concentração no grupo controle foi semelhante ao grupo G8; a do grupo G30 foi menor que o do grupo controle e a do grupo G50 foi maior que a do grupo controle.

As concentrações de histamina dos dois experimentos também mantiveram-se inalteradas quando comparados os grupos controle e tratados. As concentrações de espermidina no tecido dos animais dos grupos controle e G8 do EP 1, foram maiores que as concentrações dos outros grupos (G30 e G50). Já no EP 2 as concentrações foram as mesmas em todos os grupos. No grupo G30 do EP 1 a concentração de putrescina foi menor em relação aos outros grupos, entretanto no EP 2, não houve diferença estatística entre eles.

3.5 Influência da administração de espermina na estabilidade oxidativa

3.5.1 Concentração de dienos conjugados

Como indicado na Tabela IV.8, o tempo T0 do EP 1 foi observada maior concentração de DC nos grupos G30 e G50, em relação ao controle e G8, enquanto no tempo T45, a concentração de DC aumentou linearmente em função da dose administrada. Não foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos controle e G8.

Tabela IV.8 - Dienos conjugados em carne de rato, dos experimentos piloto (EP) 1 e 2, nos tempos T0 e T45, respectivamente 0 e 45 dias após a eutanásia dos animais que receberam espermina

Tratamento	Dienos conjugados (%)			
	EP 1		EP 2	
	T0		T45	
Controle	3,685±0,04 ^{A,a,1}	3,825±0,11 ^{B,a,‡}	3,485±0,03 ^{A,a,1}	3,885±0,02 ^{A,a,‡}
G8	3,725±0,06 ^{A,a,1}	3,235±0,05 ^{A,a,‡}	4,170±0,14 ^{B,a,2}	3,800±0,07 ^{A,a,§}
G30	4,400±0,16 ^{B,a,1}	3,830±0,06 ^{B,b,‡}	4,645±0,14 ^{C,a,1}	3,965±0,07 ^{B,b,‡}
G50	5,130±0,11 ^{C,a,1}	4,605±0,03 ^{C,a,‡}	5,305±0,03 ^{D,a,1}	4,860±0,07 ^{C,a,‡}

Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes letras maiúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes (A-C) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes letras minúsculas na mesma linha são significativamente diferentes (a-b) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes números na mesma linha são significativamente diferentes (1-2) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes símbolos na mesma linha são significativamente diferentes (‡ e §) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Estes resultados revelaram um aumento na oxidação lipídica em função do aumento da dose de espermina administrada. Comparando-se os resultados dos EP 1 e 2, tanto no tempo T0 quanto no T45, observou-se que não houve diferença significativa entre o tempo de administração de espermina, em relação a produção de dienos conjugados, no grupo G8. Assim, com a administração de espermina durante quatro ou dez dias a produção de dienos conjugados foi semelhante e igual a do grupo controle, no tempo T0 do EP 1 e no tempo T45 do EP 2.

Este mesmo resultado foi observado no grupo G50, entretanto, tanto a dose como o tempo de administração foram os mesmos, portanto, era de se esperar que não houvesse diferença entre os resultados, assim como no grupo controle.

No grupo G30 foi observada uma redução na produção de dienos conjugados, tanto no tempo T0 quanto no tempo T45, quando administrou-se espermina durante um menor período de tempo (de sete para quatro dias).

Entre os tempos T0 e T45 houve diferença apenas no grupo G8, tanto no EP 1 quanto no EP 2, o que caracteriza formação de dienos conjugados durante o armazenamento. Entretanto, este processo não ocorreu nos grupos controle, G30 e G50.

Verificou-se menor formação de dienos conjugados nas amostras do grupo G8, no tempo T0, do EP 2, pois a concentração foi menor que a do grupo controle. A formação de DC dos grupos G8 do EP 1 e G8 e G30 do EP 2 revelaram-se igual a do grupo controle, enquanto em todos os outros tratamentos houve maior formação de DC nos grupos tratados em relação ao controle, evidenciando maior oxidação lipídica com a administração de espermina nas doses utilizadas no presente experimento.

3.5.2 Concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

3.5.2.1 TBARS na carne

A determinação da concentração de malonaldeído pela análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizada para avaliação da concentração dos produtos secundários da oxidação lipídica. No tempo T0 do EP 1 foi observada maior concentração de malonaldeído na carne de animais dos grupos G30 e G50, em relação ao controle e G8, tendo este resultado se repetido no tempo T45. Não foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos controle e G8 (Tabela IV.9). As respostas ao aumento da dose de espermina e formação de produtos de oxidação foram similares aos resultados da determinação de DC, onde observou-se aumento na oxidação em função do aumento da dose de espermina e resultados similares entre grupos controle e G8.

No EP 2 ocorreu maior formação de malonaldeído em todos os grupos em relação ao controle, nos tempos T0 e T45, sugerindo aumento na formação de produtos de oxidação em função da dose administrada, entretanto, ocorreu menor formação de malonaldeído na maior dose (G50), em relação as doses menores (G8 e G30). Estes resultados revelaram um aumento na oxidação lipídica em função do aumento da dose de espermina administrada.

Comparando-se os resultados dos EP 1 e 2, tanto no tempo T0 quanto no T45, observou-se que houve diferença significativa entre o tempo de administração de espermina, em relação a produção de malonaldeído, nos grupos G8 e G30. Nestes grupos observou-se uma maior produção de malonaldeído no EP 2 (quatro dias de administração), em relação ao EP 1 (dez e sete dias de administração,

respectivamente G8 e G30), sugerindo uma possível adaptação do organismo no metabolismo da espermina, após sete dias de tratamento, como também observado por Til et al. (1997).

No tempo T0 dos EP 1 e 2 não foi observada diferença significativa entre os resultados do grupo G50, como esperado, devido ao fato terem sido as mesmas condições oferecidas. Não ocorreram diferenças significativas na formação de malonaldeído no grupo controle, nos tempos T0 e T45 de ambos os experimentos.

Ao contrário da formação de dienos conjugados, houve formação de malonaldeído durante o armazenamento por 45 dias, em todos os grupos. Esta observação sugere que a espermina não apresentou atividade antioxidante na carne, durante o período de armazenamento avaliado. Este resultado é semelhante ao de SILVA (2010), que utilizou espermina adicionada à embalagem para conservação de carnes. Este mesmo autor sugere que isso pode ter ocorrido devido a utilização de espermina na forma de sal (tetracloridrato de espermina), entretanto, no presente estudo, não houve preocupação com a administração desta mesma substância, contendo ácido clorídrico (HCl), devido ao fato do HCl estar presente naturalmente no trato digestivo dos animais, auxiliando na digestão dos alimentos.

Tabela IV.9 - Concentração de malonaldeído em carne de rato, dos experimentos piloto (EP) 1 e 2, nos tempos T0 e T45

Tratamento	Malonaldeído ($\mu\text{mol.L}^{-1}/\text{g}$)			
	EP 1		EP 2	
	T0	T45	T0	T45
Controle	2,644 \pm 0,03 ^{A,a,1}	2,683 \pm 0,05 ^{A,a,‡}	3,165 \pm 0,03 ^{A,a,2}	3,169 \pm 0,04 ^{A,a,§}
G8	2,594 \pm 0,05 ^{A,a,1}	4,308 \pm 0,14 ^{C,b,‡}	3,128 \pm 0,05 ^{A,a,2}	5,064 \pm 0,10 ^{C,b,§}
G30	2,923 \pm 0,09 ^{B,a,1}	4,845 \pm 0,04 ^{D,b,‡}	3,455 \pm 0,08 ^{B,a,2}	5,044 \pm 0,03 ^{C,b,§}
G50	3,733 \pm 0,04 ^{C,a,1}	3,881 \pm 0,05 ^{B,a,‡}	3,470 \pm 0,03 ^{B,a,2}	4,442 \pm 0,04 ^{B,b,§}

Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes letras maiúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes (A-D) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes letras minúsculas na mesma linha são significativamente diferentes (a-b) (Tukey, $p \leq 0,05$). Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes números na mesma linha são significativamente diferentes (1-2) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes símbolos na mesma linha são significativamente diferentes (‡ e §) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Pela análise de formação de malonaldeído verificou-se que, nos animais tratados com espermina, não foi observada atividade antioxidante em relação ao grupo controle. Entretanto, o grupo G8 do EP 1, nos tempos T0 e T45, apresentaram concentração de malonaldeído semelhante ao controle, enquanto em todos os outros tratamentos houve maior formação de malonaldeído nos grupos tratados em relação ao

controle, evidenciando maior oxidação lipídica com a administração de espermina nas doses utilizadas no presente experimento.

3.5.2.2 TBARS no fígado

Foi observado um aumento nas concentrações de malonaldeído no fígado nos dois tempos (T0 e T45) dos dois experimentos (EP 1 e EP2), quando compararam-se os grupos tratados em relação ao controle (Tabela IV.10). No tempo T0 do EP 1 foi observada maior concentração nos grupos G30 e G50, que não apresentaram diferença significativa entre si, enquanto no tempo T45, o grupo G30 apresentou as maiores concentrações de malonaldeído, em relação aos outros grupos tratados. Nos tempos T0 e T45 do EP 2, os grupos G8 e G50 apresentaram maiores concentrações de malonaldeído em relação ao G30.

Da mesma forma que a análise da concentração de dienos conjugados e malonaldeído em carne, os resultados de malonaldeído em fígado também revelaram um aumento na oxidação lipídica em função do aumento da dose de espermina administrada.

Comparando-se os resultados dos EPs 1 e 2, tanto no tempo T0 quanto no T45, observou-se que houve diferença significativa entre o tempo de administração de espermina, em relação à produção de malonaldeído, nos grupos G8 e G30.

No grupo G8, houve maior formação de malonaldeído durante o menor tempo de administração de espermina (EP2, quatro dias). Este resultado sugere que a administração de espermina por um tempo mais longo (EP1, sete dias) pode apresentar alguma atividade antioxidante, ou ainda, pode ter ocorrido adaptação metabólica à maior ingestão de espermina. Entretanto, ao contrário do grupo G8, no grupo G30, houve menor formação de malonaldeído durante o tratamento mais curto (EP2, quatro dias).

A análise estatística da determinação de DC na carne revelou que o grupo que recebeu a menor dose de espermina apresentou menor formação de DC quando comparado ao grupo controle. Entretanto, na dose intermediária e na mais elevada houve aumento na formação de DC. Na análise de TBARS verificou-se menor formação de malonaldeído na carne do grupo controle em relação aos grupos que receberam espermina. Embora o uso de espermina com finalidade de inibir o processo oxidativo tenha sido comprovado em sistemas biológicos e em óleos vegetais, esta atividade não foi observada *in vivo*, em todas as situações das condições testadas.

Tabela IV.10 - Concentração de malonaldeído ($\mu\text{mol.L}^{-1}/\text{g}$) em fígado de rato, após tratamento com espermina, nos animais dos experimentos piloto (EP) 1 e 2, nos tempos T0 e T45, respectivamente 0 e 45 dias após a eutanásia

Tratamento	Concentração de malonaldeído em fígado de rato ($\mu\text{mol.L}^{-1}/\text{g}$)			
	EP 1		EP 2	
	T0		T45	
Controle	5,851 \pm 0,12 ^{A,a}	5,778 \pm 0,11 ^{A,a}	6,145 \pm 0,12 ^{A,a}	6,010 \pm 0,05 ^{A,a}
G8	6,355 \pm 0,10 ^{B,a}	8,247 \pm 0,17 ^{C,b}	6,835 \pm 0,06 ^{B,a}	8,916 \pm 0,07 ^{D,b}
G30	8,718 \pm 0,11 ^{C,a}	7,058 \pm 0,19 ^{B,b}	9,205 \pm 0,22 ^{D,a}	7,469 \pm 0,13 ^{B,b}
G50	8,577 \pm 0,05 ^{C,a}	8,276 \pm 0,06 ^{C,a}	8,875 \pm 0,07 ^{C,a}	8,464 \pm 0,13 ^{C,a}

Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes letras maiúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes (A-D) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Médias (\pm desvio-padrão) com diferentes letras minúsculas na mesma linha são significativamente diferentes (a-b) (Tukey, $p \leq 0,05$).

A atividade antioxidante da espermina foi observada apenas quando se utilizou a menor dose, comparada ao grupo controle, pela análise de DC, não tendo este resultado se repetido quando analisado por TBARS. Nas análises de TBARS e nas doses mais elevadas de espermina analisadas por DC a espermina apresentou atividade pro-oxidante, talvez devido às concentrações utilizadas, uma vez que, de maneira geral, observou-se aumento da oxidação com aumento da dose administrada.

3.6 Ácidos graxos em carne de rato

Foram detectados 41 ácidos graxos nas amostras de carne de rato, entre saturados, polinsaturados e monoinsaturados (Tabela IV.11). De todos os ácidos graxos analisados só não foram detectados o C11 em um dos animais do grupo G8 e o C22:2 c13c16 em um dos animais controle.

Tabela IV.11 - Perfil de ácidos graxos na carne de ratos do experimento piloto 2, tratados com espermina em diferentes doses (8, 30 e 50 mg/kg), durante 4 dias

Perfil de ácidos graxos na carne de ratos		
Saturados	Monoinsaturados	Polinsaturados
C4	C14:1 c9	C18:2 c9c12
C6	C16:1 c9	C18:3 c9c12c15
C8	C17:1 c10	CLA c9t11
C10	C18:1 t6-8	CLA t10c12
C11	C18:1 t9	C20:2 c11c14
C12	C18:1 t10	C20:3 n6
C13	C18:1 t11	C20:4 n6
C14	C18:1 t12	C22:2 c13c16
C15	C18:1 t13-14	DHA
C16	C18:1 c9	
C17	C18:1 c11	
C18	C18:1 c12	
C20	C18:1 c13	
C22	C18:1 t16	
C23	C20:1 c11	
C24	C24:1 n9	

3.7 Avaliação da correlação entre as análises realizadas

Foram consideradas todas as possibilidades de correlação entre a avaliação de dienos conjugados e TBARS. A possibilidade de correlação entre estas análises foi avaliada pelo teste de Pearson.

Estão representadas na Tabela IV.12, as correlações que apresentaram grau de significância $\leq 0,05$ no presente experimento. As demais correlações apresentaram-se de baixa magnitude no presente experimento, por isso não foram destacadas.

Tabela IV.12 - Correlações entre as análises de dienos conjugados (DC) e malonaldeído (TBARS) na carne de ratos recebendo espermina por via oral, do experimento piloto 1

Variáveis	Correlações	
	Correlação (r)	Significância (P)
DC x TBARS carne	74,94%	0,0001
DC x TBARS fígado	80,91%	0,0001
TBARS carne x TBARS fígado	67,85%	0,0001

No EP 1, houve uma correlação positiva significativa ($p \leq 0,0001$) entre a concentração de DC e TBARS tanto na carne quanto no fígado, ou seja, quando a concentração de DC apresentava-se elevada, a de TBARS também encontrava-se em concentrações elevadas. A observação da elevação destes fatores indica a formação

de substâncias provenientes da oxidação lipídica, sendo a formação de DC característica do primeiro estágio da oxidação, enquanto a de TBARS, do segundo estágio.

A correlação entre a análise de TBARS na carne e TBARS no fígado também foi positiva, indicando que estas tiveram um comportamento semelhante ao longo do experimento. No EP 2 não foram observadas correlações significativas ($p \leq 0,0001$).

4 Conclusões

Os tratamentos com espermina provocaram alteração de peso e consumo de ração quando comparadas as diferentes doses, entretanto, não provocaram alterações de parâmetros bioquímicos séricos, de aminos bioativas e perfil de ácidos graxos, nos animais, entretanto, foram observadas aumento no pH da carne nos grupos tratados.

A atividade antioxidante da espermina foi observada apenas quando se utilizou a menor dose, comparada ao grupo controle, pela análise de DC, não tendo este resultado se repetido quando analisado por TBARS. Nas análises de TBARS e nas doses mais elevadas de espermina analisadas por DC, ao contrário da ação esperada, a espermina apresentou atividade pro-oxidante.

Estes resultados foram provenientes de um estudo inicial, no qual poucos animais foram utilizados, comprometendo sua confiabilidade estatística, entretanto, os resultados foram importantes para adequar os tratamentos e técnicas analíticas empregadas em experimento posterior com maior número de animais.

CAPÍTULO V: Avaliação de parâmetros de qualidade na carne após administração de espermina, utilizando ratos Wistar como modelo experimental

1 Objetivos

Determinar o efeito da administração (por gavagem) de espermina na carne e fígado de ratos Wistar. Os objetivos específicos foram: i) avaliar o coeficiente de eficácia alimentar; ii) avaliar o perfil e teores de aminos bioativas na carne; iii) avaliar a cor e o pH da carne; iv) avaliar a oxidação lipídica na carne e fígado; v) e avaliar a oxidação protéica no fígado.

2 Material e métodos

2.1 Animais e dieta

Este experimento foi conduzido no Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, coordenado pela Médica Veterinária Maria Adelaide Fernandes.

Foram utilizados *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem *Wistar*, adultos, com idade de aproximadamente 90 dias e peso médio de 330 g. Antes do período experimental, os cuidados de higienização e alimentação foram diários e realizados por tratador único. Dois dias antes do início dos tratamentos, os animais passaram por período de adaptação, no qual foram alojados em gaiolas plásticas (polipropileno) individuais com tampo metálico, alimentados com dieta própria (Tabela V.1) para a espécie (Labina®, Purina, SP, Brasil) e água à vontade.

Após o período de adaptação, os animais receberam as respectivas doses de espermina, por gavagem, realizada sempre no período da manhã. Os animais foram pesados antes e após os tratamentos. A quantidade de alimento ingerido por cada animal foi medida para determinação da taxa de conversão alimentar.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Processo nº 005/10) (Anexo B).

Tabela V.1 - Composição centesimal da ração comercial para ratos Labina (Purina)

Componentes	Concentrações (g/100 g)
Umidade (máx)	13
Proteína bruta (mín)	23
Extrato etéreo (mín)	4
Matéria Fibrosa (máx)	5
Matéria Mineral (máx)	10
Carboidrato (diferença)	45
Cálcio (máx)	1,3
Fósforo (mín)	0,85

Valores encontrados na embalagem do produto.

2.2 Tratamentos

Sessenta ratos machos foram distribuídos aleatoriamente em seis tratamentos, sendo dez animais para cada tratamento. Os tratamentos envolveram a administração de duas doses de espermina (27 e 54 mg/kg) e dois períodos de tratamento (6 e doze dias) e seus respectivos grupos controle.

As doses foram fornecidas diariamente aos animais, de cada tratamento, através de gavagem, com introdução de 0,3 mL de solução de tetracloreto de espermina (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Os animais dos grupos controle receberam apenas 0,3 mL de água.

O experimento foi realizado em três tempos (blocos). Em cada bloco foram utilizados 20 animais, sendo composto por três ou quatro animais de cada tratamento.

2.3 Eutanásia, coleta de sangue, retirada de vísceras, pele e músculos

Para anestesia foi utilizado tiopental sódico (0,025 mg/mL), por via intraperitoneal, na dose de 25 a 30 mg/kg (FIOCRUZ, 2005). Com o animal anestesiado foi feita punção de sangue intracardíaco, com seringa de 5 mL (lavada com heparina e enxaguada com soro fisiológico entre um animal e outro), até completa retirada do sangue e parada cardíaco-respiratória. Em seguida foi feita incisão na pele e músculos abdominais, sob linha média. O fígado foi retirado, dividido em partes e cada uma das partes foi acondicionada em embalagem individual de polietileno identificada, para análises de TBARS, proteína carbonilada e total. As amostras de fígado foram colocadas em gelo seco até o armazenamento a -80 °C.

Logo em seguida, foram retiradas as outras vísceras, os membros e a pele. A carcaça, contendo os músculos e os ossos, foi lavada com água corrente para retirada de sujidades e colocadas, individualmente, em sacos de polietileno identificados e foram armazenadas em refrigerador a 4 °C, durante 24 h.

Depois de 24 h, a carne foi moída em multiprocessador e acondicionada em embalagens de polietileno para análise de cor. Foi então dividida em embalagens de polietileno identificadas individualmente para as análises de pH, TBARS, dienos conjugados e aminas bioativas. As embalagens foram armazenadas em refrigerador a 4 °C, até o momento das análises.

2.4 Reagentes, soluções e padrões

São os mesmos descritos no Capítulo I.

2.5 Métodos de análise

2.5.1 Determinação do consumo de alimento, variação de peso e rendimento em carne

Mesmos métodos descritos no Capítulo IV.

2.5.2 Determinação de aminas bioativas

Mesmo método descrito no Capítulo IV

A separação e a quantificação das aminas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) estão descritas no Capítulo I. Os padrões de aminas bioativas utilizados foram preparados em ácido tricloroacético.

2.5.3 Determinação da cor

Para a avaliação instrumental da cor da carne foi utilizado Colorímetro portátil Colortec PCM (Clinton, EUA), com fonte de luz D-65 (que corresponde a luz natural do dia) e ângulo de observação de 10°, calibrado contra um padrão de cor branca e outro de cor preta, de acordo com HONIKEL (1998).

A cor da carne de rato foi determinada na amostra moída, uma vez que a quantidade de carne obtida a partir de apenas um músculo seria insuficiente para a realização de todas as análises deste estudo. Por isso, todos os músculos foram utilizados, sendo moídos e homogeneizados. Para as análises, as amostras estavam

acondicionadas em embalagens de polietileno com altura de aproximadamente 1,5 cm, sendo o leitor colocado sobre a embalagem.

Os valores da cor foram calculados de acordo com a escala CIE L* a* b* (*Centre International de L'Eclairage*). A tonalidade e a cromaticidade foram determinadas, respectivamente pelas equações (b^*/a^*) e $[(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$.

2.5.4 Determinação do pH

Para as análises de pH (IAL, 2004, modificado) foram pesados 2 g de amostra moída, em tubo de centrífuga, ao qual foram adicionados 20 mL de água deionizada. Os tubos foram agitados em vórtex (Biomatic, São Paulo, Brasil) durante 30 seg e centrifugados a $10400 \times g$, durante 15 min, a 23 °C, em centrífuga MR23i (Jouan, França). O sobrenadante foi transferido para béquer de 50 mL e deixado em repouso durante 30 min. Em seguida o pH foi determinado utilizando potenciômetro Digimed DM20 (São Paulo, SP, Brasil), aferido previamente, com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0.

2.5.5 Preparo de homogeneizado de fígado

Para as análises de malonaldeído, proteína carbonilada e proteína total em fígado foram preparados homogeneizados pesando-se 400 mg de amostra, em tubo de homogeneizador de tecidos, onde adicionaram-se 2 mL de solução tampão fosfato 50 mM, pH 6,7 (AEBI, 1984). Para a análise de TBARS foi retirada uma alíquota do homogeneizado total. Para as análises de proteína carbonilada e total foi utilizada uma alíquota do sobrenadante obtido pela centrifugação a $10400 \times g$, em centrífuga Jouan MR23i, durante 5 min, a 4 °C. Todas as alíquotas foram armazenadas a -80 °C, até o momento das análises.

2.5.6 Avaliação da oxidação lipídica

A oxidação lipídica foi avaliada através da determinação de produtos primários (dienos conjugados) e secundários (malonaldeído) formados durante o armazenamento sob refrigeração. Estas análises foram realizadas nos tempo 0, 3 e 6 dias após a eutanásia, para verificação da oxidação durante o período de armazenamento.

2.5.6.1 Determinação de dienos conjugados

Em tubo de ensaio com tampa foram pesados 15 mg de lipídeos, previamente extraídos da carne de rato (FOLCH et al., 1957) e adicionaram-se 5 mL de isooctano.

Logo em seguida os tubos foram agitados em vórtex, durante 5 seg de acordo com o método 2.505 da IUPAC (1992). Foi feita leitura em espectrofotômetro UV1650p (Shimadzu, Kioto, Japão) a 234 nm. Os resultados foram expressos em valores de absorvância.

A medida dos dienos conjugados foi determinada pela fórmula a seguir, sendo que a concentração da amostra é a quantidade de óleo (g) dissolvida para 100 mL de isoctano.

$$\text{Dienos conjugados} = \frac{\text{Absorvância}}{\text{Concentração da amostra} \times \text{largura da cubeta}}$$

2.5.6.2 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para determinação de malonaldeído foi realizada tanto na carne, quanto no fígado (BUEGE & AUST, 1978). Para análise da carne, amostras de 0,5 g de carne de rato foram pesadas em tubo de centrífuga e foram adicionados 3 mL de solução ácida, contendo ácido clorídrico 0,25 N, ácido tricloroacético 15% (p/v) e ácido tiobarbitúrico 0,375% (p/v). Os tubos foram agitados durante 10 seg em vórtex e logo em seguida, aquecidos em banho de água a 92,5 °C, durante 30 min. Posteriormente foram centrifugados a 10400 x g, durante 15 min, a 23 °C; em centrífuga MR23i (Jouan, França). O sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro UV1650p (Shimadzu, Kioto, Japão) a 535 nm.

Para análise no fígado foram pipetados 150 µL de homogeneizado preparado com 400 mg de amostra e 2 mL de solução tampão fosfato 50 mM, pH 6,7. O restante do método foi semelhante ao utilizado para determinação na carne. Os resultados foram expressos em valores de absorvância. A concentração do malonaldeído foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5$ M/cm, sendo o resultado das análises expressos em mg de malonaldeído/kg de amostra.

2.5.7 Avaliação da oxidação protéica

A avaliação da oxidação protéica foi determinada pelo conteúdo de proteína carbonilada (LEVINE et al., 1990). Foi utilizado o sobrenadante do mesmo homogeneizado preparado para análise de TBARS, obtido por centrifugação a 10400 x g, em centrífuga MR23i (Jouan, França), durante 5 min, a 4 °C. Em eppendorf foram pipetados 500 µL do sobrenadante e adicionaram-se 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Agitou-se em vórtex, durante 10 seg e centrifugou-se a 10400 x g, durante 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. No tecido precipitado, adicionaram-se

500 µL solução de dinitrofenilhidrazina (DNPH) a 10 nmol/L em 2 mol/L de HCl. Agitou-se o eppendorf em vórtex, durante 10 seg. As amostras foram incubadas no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 min, agitando-se em vórtex, a cada 15 min. Logo em seguida adicionaram-se 500 µL de TCA 10% e agitou-se em vórtex, durante 10 seg. Centrifugou-se a 10400 x g, durante 10 min, a 4 °C e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de solução etanol:acetato de etila (1:1). Agitou-se em vórtex a cada lavada e centrifugou-se a 10400 x g, durante 10 min, a 4 °C; descartando-se o sobrenadante. Após as duas lavagens com solução de etanol:acetato de etila, dissolveu-se o precipitado em 2 mL de solução aquosa de dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%. Agitou-se em vórtex, durante 10 seg e centrifugou-se a 10400 x g, durante 10 min, a 4 °C. Foi feita leitura em espectrofotômetro UV1650p (Shimadzu, Kioto, Japão) a 370 nm, utilizando-se cubeta de quartzo, com 1 mL de volume interno.

Para cada amostra foi feito um branco, substituindo-se a solução de DNPH por solução de HCl 2 mol/L, para zerar o equipamento.

O conteúdo de carbonila foi determinado através da fórmula a seguir, na qual o coeficiente de extinção molar (CEM) é 21×10^3 M/cm e o valor de p corresponde ao valor de proteína total (mg).

$$\text{Conteúdo de carbonila em nmol/mg de proteína} = \frac{\text{CEM} \times \text{absorvância}}{p}$$

2.5.8 Determinação de proteína total

No mesmo sobrenadante utilizado para análise de proteína carbonilada foi feita a determinação de proteína total de acordo com o método de LOWRY et al. (1951).

2.6 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, com excessão da análise de pH que foi realizada em duplicata. A partir destes dados foram calculados a média, desvio-padrão, erro padrão e coeficiente de variação. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão.

A transformação de variável foi feita quando a suposição de igualdade de variâncias (homocedasticidade) entre os grupos não foi satisfeita. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey após evidências encontradas na Análise de Variância

Simple (ANOVA) utilizando como fontes de variação as doses e os períodos de tratamento. Nas análises de dienos conjugados e malonaldeído, além das variáveis citadas, foi utilizado o tempo de análise como fonte de variação. Foi utilizado o nível de significância de $\alpha=5\%$ ($p \leq 0,05$). Foi utilizado Excel 2007 for Windows (MONTGOMERY, 2001).

3 Resultados e discussão

3.1 Consumo de ração, variação de peso e rendimento em carne

O consumo diário de ração e a variação de peso durante os tratamentos podem ser observados na Tabela V.2.

Tabela V.2 - Variação de peso e consumo diário de ração dos ratos após administração de espermina em diferentes doses e tempos de tratamento

Tempo de tratamento (dias)	Dose de espermina (mg/kg)	Variação de peso (g)	Consumo diário de ração (g)
6	0	21,35±1,87 ^a	30,81±2,69 ^a
	27	20,35±1,44 ^a	31,52±1,48 ^a
	54	18,22±2,09 ^a	35,80±2,56 ^a
12	0	22,52±2,70 ^a	30,13±1,33 ^a
	27	20,29±1,57 ^a	28,47±2,89 ^a
	54	19,34±2,67 ^a	28,87±2,90 ^a

Médias (\pm erro-padrão) com diferentes letras minúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes (a-b) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Utilizando ratos como modelo experimental, este trabalho procurou simular as práticas de manejo e abate de animais de produção, para avaliação de parâmetros de qualidade na carne. Para verificar se os tratamentos com espermina provocaram alteração de peso nos animais foi determinado o coeficiente de eficácia alimentar, entretanto não foram verificadas variações significativas ($p \leq 0,05$). Os valores médios de consumo diário de alimento e ganho de peso, em todos os grupos foi de 30,8 g e 20 g, respectivamente, independente do tratamento aplicado, enquanto o rendimento em carne foi semelhante ao de animais de produção (30%).

3.2 Aminas bioativas na carne

Em todas as amostras de carne de rato foram encontradas as aminas putrescina, histamina, espermidina e espermina, sendo que algumas apresentaram também a cadaverina e a tiramina. Espermina foi quantificada, enquanto as outras aminas foram apenas detectadas, sendo o limite de detecção de (0,04 mg/100 g).

A curva de calibração para quantificação de espermina apresentou equação da reta representada por $y=446155,55x-89265,21$ sendo o coeficiente de determinação (R^2) de 0,996.

Animais tratados durante seis dias com ambas as doses de espermina (27 e 54 mg/kg) apresentaram as mesmas concentrações de espermina dos animais do grupo controle, tendo este resultado se repetido nos animais tratados durante doze dias. Observou-se maior concentração de espermina na carne dos animais tratados durante seis dias, em relação aos tratados durante doze dias, inclusive o grupo controle. Entretanto, não houve diferença estatística entre as concentrações dos animais tratados durante doze dias e aqueles tratados com a menor dose de espermina durante seis dias (Tabela V.3).

Tabela V.3 - Concentração de espermina na carne de ratos, após tratamento com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina por gavagem

Tempo de tratamento (dias)	Dose de espermina (mg/kg)	Espermina na carne (mg/100 g)
6	0	0,46±0,02 ^a
	27	0,45±0,03 ^{a,b}
	54	0,47±0,02 ^a
12	0	0,41±0,01 ^b
	27	0,41±0,01 ^b
	54	0,41±0,01 ^b

Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-b) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=30$.

A concentração de espermina na carne de animais tratados durante doze dias foi menor possivelmente em função da metabolização desta por enzimas metabolizadoras como as poliaminoxidases (PAO). Este resultado pode ser observado também pela diferença na concentração de espermina nos animais dos grupos controle de ambos os tratamentos (seis e doze dias). Assim, é possível que tenha havido maior metabolização de espermina pelo organismo durante o período em que os animais estavam sob condições de tratamento. Da mesma forma, OLSEN et al. (1999)

alimentaram peixes com dieta contendo espermina (0,3 ou 0,7 g/kg), mas não verificaram aumento nas concentrações musculares ou hepáticas desta amina.

De acordo com OLSEN et al. (1999), a espermina é altamente solúvel em água e, por isso, pode ser facilmente absorvida ou excretada pelo organismo. Nos tecidos, as poliaminas sofrem interconversões e reações de acetilação. No organismo, a principal via de degradação das poliaminas é a desaminação oxidativa promovida pela DAO, a qual está presente na mucosa intestinal, fígado e rim. Esta enzima atua não somente nas poliaminas livres, mas também em seus derivados acetilados. Outra enzima, a PAO (poliaminoxidase) também participa no catabolismo das poliaminas, entretanto atua, preferencialmente, sobre as poliaminas livres (GLÓRIA, 2005).

BARDÓCZ et al. (1990; 1992) sugeriram que o músculo e a pele podem ser importantes locais de armazenamento de poliaminas e, por isso, a carne dos ratos foi analisada. Entretanto, ao contrário do que foi avaliado por BARDÓCZ et al. (1992), aparentemente não houve deposição na carne.

3.3 Influência da administração de espermina no pH da carne

O pH da carne não foi alterado em função dos diferentes tratamentos (Tabela V.4). Esta análise foi realizada para verificar possível alteração no pH devido a característica catiônica das poliaminas.

Tabela V.4 - Valores de pH da carne de ratos, após tratamento com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose de espermina (mg/kg)	pH da carne
6	0	6,34±0,07 ^a
	27	6,34±0,11 ^a
	54	6,35±0,07 ^a
12	0	6,33±0,07 ^a
	27	6,40±0,09 ^a
	54	6,35±0,07 ^a

Médias (± erro padrão) com mesma letra na mesma coluna são significativamente iguais (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=20$.

O pH final da carne de frango encontrado por SILVA & GLÓRIA (2002) foi 5,72 e 6,30, respectivamente nos cortes peito e coxa. Enquanto em carne bovina, IMMONEN et al. (2000) encontraram valores de 5,5 a 5,75. Verifica-se portanto, que os valores de pH da carne de rato ficou acima do pH da carne bovina e peito de frango, mas assemelhou-se ao pH da coxa de frango.

Neste estudo o pH foi determinado como parâmetro de qualidade devido a uma possível deposição de espermina na carne de animais dos grupos que a receberam e alteração do pH. Entretanto, não ocorreu deposição desta nos músculos e o pH dos grupos controle e tratados foi o mesmo.

3.4 Influência da administração de espermina na cor da carne

O parâmetro L* não foi influenciado pelas diferentes doses de espermina, mas foi influenciado pelo tempo de tratamento. Os animais que receberam espermina durante seis dias apresentaram carne mais clara em relação ao tempo de tratamento de doze dias, enquanto os valores de a* não sofreram qualquer alteração devido aos tratamentos aplicados. O parâmetro b*, que confere cor amarela às carnes, entretanto, apresentou influência da dose, quando fornecida pelo tempo de doze dias, de forma que, animais que receberam a dose de 27 mg/kg apresentaram carne mais amarela em relação ao grupo controle. Portanto, ambas as doses, quando fornecidas durante seis dias, produziram carne mais clara em relação ao fornecimento durante doze dias. O mesmo ocorreu com o parâmetro b*, ou seja, carne mais amarela, na qual os valores mais altos foram observados nos animais tratados durante doze dias.

A tonalidade (b^*/a^*) e a cromaticidade ou saturação $[(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$, da mesma forma apresentaram influência do tempo e não da dose, sendo ambas maiores no tempo de tratamento de doze dias (Tabela V.5).

Tabela V.5 - Parâmetros de cor avaliados em carne de ratos, após tratamento com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina

Tempo Tmt (dias)	Dose EPM (mg/kg)	L*	a*	b*	Tonalidade	Saturação
6	0	51,22±0,64 ^a	4,67±0,44 ^a	27,87±0,81 ^a	0,018±0,001 ^a	28,28±0,78 ^a
	27	52,12±1,16 ^a	5,14±0,55 ^a	27,23±1,27 ^a	0,017±0,001 ^a	27,74±1,30 ^a
	54	51,94±0,85 ^a	4,64±0,35 ^a	28,03±0,68 ^a	0,018±0,000 ^a	28,42±0,69 ^a
12	0	50,41±0,77 ^{a,b}	4,56±0,52 ^a	29,22±0,84 ^{a,c}	0,019±0,001 ^{a,b}	29,61±0,83 ^{a, b}
	27	48,45±1,28 ^b	4,28±0,36 ^a	31,02±0,80 ^b	0,020±0,000 ^b	31,33±0,78 ^b
	54	48,88±1,50 ^b	4,38±0,50 ^a	29,68±0,52 ^{b,c}	0,020±0,001 ^b	30,03±0,50 ^b

Tmt: tratamento; EPM: espermina. Médias (± erro padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-b) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$, $n=30$).

A cor da carne depende da concentração de pigmentos e das suas propriedades físico-químicas, sendo o estado de oxidação da mioglobina o principal fator. O sistema

CIE L*, a* e b* foi utilizado para avaliação da cor da carne, onde o valor de L* igual a zero corresponde ao preto e 100 ao branco, sendo que é inversamente proporcional a porcentagem do pigmento mioglobina presente no tecido muscular. Os valores de a* variam do -a* que representa o verde ao +a* que representa o vermelho. O valor do -b* corresponde ao azul e o +b* ao amarelo. Assim, quanto maior o teor de mioglobina na carne, menor o valor de L* e maior o valor de a* (GEORGANTELIS et al., 2007).

Os parâmetros L*, a*, b* e saturação obedeceram a distribuição normal, apresentando coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,95. Para tonalidade, foi necessário transformar a variável $u = \ln(\text{dado})$.

Animais tratados com espermina durante seis dias apresentaram menores valores de b* quando utilizada a menor dose de espermina e um ligeiro aumento quando utilizada a maior dose, ambos em relação ao grupo controle. Nestas condições, animais tratados com a menor dose apresentaram a carne menos amarela em relação ao grupo controle, tendo o inverso ocorrido com os animais tratados com a maior dose, que tiveram a carne mais amarela. Nos animais tratados durante doze dias ocorre aumento no valor de b* quando comparados os grupos controle (0 mg/kg) e grupos tratados. Nestes, com a menor dose (27 mg/kg) houve um aumento em b* e posteriormente os valores reduziram até o grupo tratado com a maior dose (54 mg/kg), sendo ambos maiores que o valor de b* do grupo controle, o que significa que a carne tornou-se mais amarela nos grupos tratados em relação ao grupo controle.

À observação visual não houve diferença na coloração entre os tratamentos, entretanto, foi observado que animais que apresentaram comportamento agitado apresentaram carne mais escura devido à dificuldade em se fazer a sangria. Esta observação foi confirmada pelos maiores valores de a* e menores valores de L*, em relação à carne dos outros animais deste experimento.

A oxidação da mioglobina e formação de metamioglobina é caracterizada pelo aumento nos valores de tonalidade e redução nos valores de a*, b* e saturação (GEORGANTELIS et al., 2007). Neste estudo observou-se que ocorreu aumento nos valores de b*, tonalidade e saturação e redução nos valores de L* nos animais tratados durante doze dias, quando comparados aos tratados durante seis dias.

Nas situações apresentadas nota-se influência significativa do tempo de tratamento, em relação aos parâmetros de cor analisados, principalmente quando comparados os grupos controle de ambos os tempos de tratamento.

3.5 Formação de produtos de oxidação lipídica na carne e no fígado durante o armazenamento

O efeito dos tratamentos com espermina na oxidação lipídica da carne de rato, durante os tempos de armazenamento sob refrigeração (0, 3 e 6 dias), foi analisado através das determinações de dienos conjugados e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

A formação de dienos conjugados, produto primário da oxidação lipídica variou em função dos diferentes tempos e doses de espermina utilizados. Animais tratados durante seis dias não apresentaram variações em relação ao grupo controle, entretanto, animais tratados durante doze dias com a menor dose (27 mg/kg) apresentaram maior formação de dienos conjugados e relação ao grupo controle, enquanto aqueles tratados com a maior dose apresentaram teores de dienos conjugados equivalente ao grupo controle, sendo que ambos os grupos controle apresentaram concentrações estatisticamente iguais (Tabela V.6). A maior concentração de dienos conjugados no grupo tratado com a menor dose, durante doze dias indica maior oxidação em função do tratamento aplicado. Assim, quando comparadas as mesmas doses, fornecidas durante tempos diferentes nota-se que no menor tempo (seis dias) a formação de dienos conjugados foi menor quando comparada ao fornecimento durante maior tempo (doze dias), indicando possível efeito oxidante da espermina quando fornecida por tempo maior.

Tabela V.6 - Concentração de dienos conjugados na carne de ratos, nos dias 0, 3 e 6 após armazenamento sob refrigeração de animais tratados com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose EPM (mg/kg)	Dienos conjugados (%)		
		Tempo de armazenamento (dias)		
		0	3	6
6	0	1,48±0,09 ^{a,A}	1,62±0,07 ^{a,A}	1,77±0,07 ^{a,B}
	27	1,44±0,12 ^{a,A}	1,49±0,10 ^{a,A}	1,76±0,08 ^{a,B}
	54	1,51±0,10 ^{a,A}	1,54±0,14 ^{a,A}	1,74±0,06 ^{a,B}
12	0	1,59±0,08 ^{a,A}	1,53±0,08 ^{a,A}	1,62±0,08 ^{a,A}
	27	1,83±0,12 ^{b,A}	1,64±0,07 ^{a,A}	1,68±0,08 ^{a,B}
	54	1,78±0,15 ^{a,b,A}	1,63±0,08 ^{a,A}	1,70±0,09 ^{a,A}

EPM: espermina. Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras minúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes (a-c). Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras maiúsculas na mesma linha são significativamente diferentes (A-D) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=30$.

Quando avaliada a formação de dienos conjugados durante o armazenamento, nota-se que não houve alteração entre as concentrações avaliadas nos dias 0 e 3.

Entretanto ocorreu maior concentração durante a refrigeração por seis dias, nos animais tratados durante seis dias, enquanto naqueles animais tratados durante doze dias, com a menor dose, ocorreu redução na concentração de dienos conjugados ao longo do período de armazenamento.

A redução nas concentrações de dienos conjugados pode ocorrer, devido à sua decomposição e transformação em produtos secundários da oxidação como aldeídos e cetonas. Além disso, sua taxa de decomposição pode ser menor que a de sua formação a partir dos ácidos graxos insaturados (CHAIJAN et al., 2009).

A formação de malonaldeído na carne, produto secundário da oxidação lipídica, determinada através da análise de TBARS foi influenciada em função das diferentes doses e tempos de tratamento (Tabela V.7).

Animais tratados com espermina durante seis dias apresentaram maior formação de malonaldeído quando comparados ao controle, indicando maior oxidação em função dos tratamentos aplicados. Enquanto os grupos tratados durante doze dias não apresentaram variações estatisticamente significativas, mas apresentaram maiores concentrações quando comparados aos tratados durante seis dias, sugerindo maior oxidação nos grupos tratados durante doze dias, possivelmente em função de estresse causado nos animais devido ao maior período de manipulação. Portanto, quando comparadas as mesmas doses, fornecidas durante tempos diferentes nota-se que no menor tempo (seis dias) a formação de malonaldeído na carne foi menor quando comparada ao fornecimento durante maior tempo (doze dias).

Tabela V.7 - Concentração de malonaldeído na carne de ratos, nos dias 0, 3 e 6 após armazenamento sob refrigeração. Animais tratados com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose EPM (mg/kg)	Malonaldeído (mg/kg carne)		
		Tempo de armazenamento (dias)		
		0	3	6
6	0	1,03±0,00 ^{a,A}	1,08±0,01 ^{a,B}	1,14±0,01 ^{a,b,C}
	27	1,05±0,01 ^{b,c,A}	1,09±0,01 ^{a,B}	1,15±0,00 ^{a,C}
	54	1,04±0,00 ^{b,A}	1,09±0,01 ^{a,B}	1,13±0,01 ^{b,C}
12	0	1,06±0,02 ^{b,c,A}	1,07±0,01 ^{a,A}	1,15±0,01 ^{a,b,B}
	27	1,06±0,01 ^{c,A}	1,08±0,01 ^{a,A}	1,13±0,01 ^{b,B}
	54	1,07±0,01 ^{c,A}	1,08±0,01 ^{a,A}	1,13±0,01 ^{b,B}

EPM: espermina. Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras minúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes (a-b). Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras maiúsculas na mesma linha são significativamente diferentes (A-C) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=30$.

Durante o período de armazenamento de 0 a 6 dias observou-se aumento gradativo na concentração de malonaldeído. Na carne armazenada por 3 dias, notou-

se concentrações semelhantes de malonaldeído em todos os grupos, enquanto maiores concentrações foram observadas nos grupos tratados durante doze dias e armazenamento durante seis dias.

Nota-se que nos grupos tratados durante doze dias a variação na concentração de malonaldeído foi pequena quando comparados o primeiro e o terceiro dias de armazenamento, apresentando uma variação maior no sexto dia, o que indica que o processo de oxidação lipídica, com formação de produtos secundários intensificou-se a partir do terceiro dia. Enquanto os grupos tratados durante seis dias apresentaram variações mais homogêneas ao longo do tempo. Isso pode ter ocorrido em função das concentrações de espermina na carne, sendo encontrados maiores valores naquelas dos grupos tratados durante seis dias. De acordo com MARIUTTI et al. (2009) pode ocorrer redução nas concentrações de malonaldeído devido a degradação ou reações com outros compostos, como as proteínas.

Apesar da reação de TBARS não ser específica para malonaldeído porque o ácido tiobarbitúrico reage com diferentes compostos carbonílicos além do malonaldeído (alcanos, alcenos e alcadienos) esta análise pode ser usada para avaliar a extensão da oxidação lipídica (MARIUTTI et al., 2008). Assim, não deve ser utilizada isolada, mas sim em conjunto com outras análises e, por isso, foi também analisada a concentração de dienos conjugados e proteína carbonilada.

No fígado a concentração de malonaldeído também foi analisada no fígado após transformação da variável $u = \ln(\text{dado})$ para que os dados obedecessem a uma distribuição normal, apresentando R^2 de 0,94. A concentração de malonaldeído no fígado foi influenciada em função das diferentes doses e tempos de fornecimento. Animais tratados durante seis dias com a menor dose de espermina apresentaram concentração semelhantes as do grupo controle, entretanto, os tratados com a maior dose apresentaram concentrações maiores, porém, semelhantes ao grupo tratado com a menor dose, indicando maior oxidação nos grupos tratados com espermina. Nos grupos tratados durante doze dias não foram observadas diferenças entre grupos tratados com espermina e controle, sendo os valores semelhantes ao controle de seis dias e menores quando comparados aos tratados durante seis dias (Tabela V.8).

A formação de malonaldeído no fígado apresentou o mesmo comportamento apresentado na carne, de forma que quando comparadas as mesmas doses, fornecidas durante tempos diferentes nota-se que no menor tempo (seis dias) a formação de dienos conjugados foi menor quando comparada ao fornecimento durante

maior tempo (doze dias), indicando possível efeito oxidante da espermina quando fornecida por tempo maior.

Tabela V.8 - Concentração de malonaldeído no fígado de ratos tratados com diferentes doses e tempos de fornecimento de espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose EPM (mg/kg)	Malonaldeído (mg/kg fígado)
6	0	1,30±0,08 ^{a,c}
	27	1,37±0,09 ^{a,b}
	54	1,54±0,10 ^b
12	0	1,26±0,10 ^{a,c}
	27	1,19±0,05 ^{a,c}
	54	1,14±0,08 ^c

EPM: espermina. Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-b) (Teste de de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=30$.

Ao contrário da análise feita na carne (tempos 0, 3 e 6 dias de armazenamento sob refrigeração), no fígado, a determinação de malonaldeído foi feita apenas uma vez.

De acordo com OGAWA et al. (1996), a ação antioxidante da espermina parece depender da presença de tocoferóis, por mecanismos ainda não esclarecidos. WANG et al. (1996) justificam a hipótese de OGAWA et al. (1996) afirmando que o radical tocoferil e carotenóides são capazes de regenerar o grupo amino da espermina, e por isso, atuam melhor quando presentes no mesmo meio. EYMARD et al. (2010) testaram o uso da espermina em filés de peixe e observaram pouco efeito antioxidante, entretanto, justificaram que os resultados insatisfatórios possam ter ocorrido em virtude de processos de purificação da amostra durante a extração da espermina.

3.6 Oxidação protéica no fígado

O efeito dos tratamentos com espermina na oxidação protéica em fígado de rato foi analisado pela determinação de proteína carbonilada, através da formação de hidrazonas. As concentrações de proteína carbonilada obedeceram a distribuição normal, apresentando R^2 de 0,99.

Observou-se que tanto a dose quanto o tempo influenciaram a formação de proteína carbonilada no fígado, quando analisadas as concentrações dos grupos tratados durante doze dias. Nestes, maiores concentrações foram observadas nos animais tratados com a menor dose (27 mg/kg) em relação ao grupo controle, enquanto que para a maior dose as concentrações foram semelhantes as do grupo controle. Porém, animais tratados com ambas as doses de espermina durante seis dias

apresentaram concentrações semelhantes as do grupo controle. Com relação ao tempo de tratamento, animais tratados durante doze dias com a menor dose apresentaram teor de proteína carbonilada semelhantes a todos os grupos tratados durante seis dias, enquanto aqueles tratados com a maior dose apresentaram teor reduzido, sugerindo ação antioxidante da espermina nestas condições (Tabela V.9).

Tabela V.9 - Concentração de proteína carbonilada no fígado de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose EPM (mg/kg)	Proteína carbonilada ($\mu\text{mol.L}^{-1}/\text{mg}$ de proteína)
6	0	0,86 \pm 0,07 ^a
	27	0,97 \pm 0,07 ^a
	54	0,92 \pm 0,07 ^a
12	0	0,64 \pm 0,08 ^b
	27	0,84 \pm 0,10 ^{a,c}
	54	0,69 \pm 0,08 ^{b,c}

EPM: espermina. Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-f) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=30$.

Eymard et al. (2010) avaliaram o efeito da aplicação de espermina em carne de peixe, sobre a oxidação protéica e verificaram aumento, concluindo que a espermina apresentou atividade pró-oxidante. A oxidação protéica em carnes de diversas espécies tem sido estudado, entretanto, os mecanismos de oxidação de proteínas ainda não estão bem esclarecidos (MERCIER et al., 1998; KJÆRSGÅRD et al., 2006; VENTANAS et al., 2006). Segundo KJÆRSGÅRD et al. (2006), o estudo da oxidação protéica em alimentos está sendo iniciada e ainda há muitos questionamentos a cerca de sua contribuição para a tecnologia de alimentos, qual como sua interação com os produtos de oxidação lipídica.

4 Conclusões

Não houve diferença nos resultados dos grupos que receberam espermina em relação aos controles, sobre os parâmetros de alteração de peso, consumo diário de ração e pH da carne, entretanto maiores concentrações de espermina foram encontradas nos animais tratados durante seis dias.

Animais tratados durante seis dias apresentaram carne mais clara, enquanto aqueles tratados com a menor dose durante doze dias apresentaram carne mais amarela, representada pelos valores dos parâmetros de cor L^* e b^* , respectivamente.

Não houve diferença entre animais tratados durante seis dias, quanto à formação de dienos conjugados, entretanto, nos animais tratados durante doze dias observou-se maior formação.

Houve maior formação de malonaldeído na carne e no fígado de animais tratados com espermina, indicando ação oxidante da espermina. Os tratamentos com espermina não apresentaram influência sobre a oxidação lipídica da carne armazenada sob refrigeração.

Houve maior oxidação protéica no grupo tratado com a maior dose durante maior tempo, quando comparado ao menor tempo de fornecimento.

CAPÍTULO VI: Espermina pode atuar como antioxidante protegendo rato Wistar submetido a gavagem, contra estresse

1 Objetivos

Determinar o efeito da administração de espermina sobre a indução do sistema antioxidante endógeno do organismo. Os objetivos específicos foram investigar o efeito da administração de espermina em rato Wistar sob a forma de gavagem em: i) oxidação lipídica e protéica; ii) na atividade enzimática de superóxido dismutase e catalase; iii) na produção de óxido nítrico; iv) e na atividade de marcadores de lesão hepática (enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase).

2 Material e métodos

2.1 Animais e dieta

São os mesmos descritos no Capítulo V.

2.2 Tratamentos

São os mesmos descritos no Capítulo V.

2.3 Eutanásia, coleta de sangue, retirada de vísceras, pele e músculos

Para anestesia foi utilizado tiopental sódico (0,025 mg/mL), por via intraperitoneal, na dose de 25 a 30 mg/kg (FIOCRUZ, 2005). Com o animal anestesiado foi feita punção de sangue intracardíaco, com seringa de 5 mL (lavada com heparina entre um animal e outro), até completa retirada do sangue.

Para separação do soro, o sangue coletado foi transferido para tubo Falcon de 15 mL, aguardando-se 30 min, para formação do coágulo. Posteriormente foi centrifugado a 1583 $\times g$, durante 15 min, em centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206, marca Fanem (São Paulo, Brasil). A coleta do plasma foi feita em tubo eppendorf, com 10 μ L de heparina, centrifugado a 2000 $\times g$, durante 10 min, em centrífuga Centrimicro, marca Fanem (São Paulo, Brasil). O soro destinado às análises de bioquímica sérica e óxido nítrico foram armazenados, respectivamente a 4 °C e -18 °C, até o momento das análises. Após a coleta do plasma, o sedimento contendo eritrócitos foi armazenado a -80 °C, para análises enzimáticas de catalase e superóxido dismutase (SOD).

Após completa retirada do sangue e parada cárdio-respiratória, foi feita incisão na pele e músculos abdominais, sob a linha média. O fígado foi retirado, dividido em partes e cada uma das partes foi acondicionada em embalagem individual de polietileno identificada para análises de catalase, SOD, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína total e carbonilada. As amostras de fígado foram colocadas em gelo seco até o armazenamento a -80 °C.

2.4 Reagentes, soluções e padrões

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. O padrão de espermina (tetracloridrato) e os reagentes utilizados na análise de óxido nítrico (NADPH, FAD, nitrato redutase e nitrito de sódio) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA). Para análise bioquímica sérica foram utilizados *kits* comerciais da Synermed (Belo Horizonte, Brasil).

2.5 Métodos de análise

2.5.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Amostras de fígado foram mantidas refrigeradas a -80 °C até o preparo de homogeneizados pesando-se 400 mg de amostra e adicionando-se 2 mL de solução tampão fosfato 50 mM, pH 6,7 (AEBI, 1984). Para as análises foram pipetados 150 μ L do homogeneizado, em tubo de centrífuga, onde foram adicionados 3 mL de solução ácida, contendo ácido clorídrico 0,25 N, adicionado de ácido tricloroacético 15% (p/v) e ácido tiobarbitúrico 0,375% (p/v). Os tubos foram agitados durante 10 seg em vórtex e, logo em seguida, aquecidos em banho de água a 92,5 °C, durante 30 min. Posteriormente foram centrifugados a 10.400 $\times g$, durante 15 min, a 23 °C em

centrífuga MR23i. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro UV1650p (Shimadzu, Kioto, Japão) a 535 nm, utilizando cubeta de quartzo de 1 mL de volume interno, lavadas com água deionizada entre uma amostra e outra. Os resultados foram expressos em valores de absorvância.

A concentração do malonaldeído foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5$ M/cm (BUEGE & AUST, 1978), sendo o resultado das análises expressos em mM de malonaldeído/mg de proteína.

2.5.2 Determinação de proteína carbonilada

Mesmo método descrito no Capítulo V

2.5.3 Determinação da atividade da enzima catalase

As determinações das enzimas catalase e superóxido dismutase foram realizadas no laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, coordenado pela professora Maria do Carmo Gouveia Pelúzio.

A atividade da catalase foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro (Pró-análise UV.1600) a 240 nm, nos tempos 0 e 60 seg, após leitura do branco. Para preparo do branco foi utilizada a alíquota de cada amostra e 2 mL de tampão fosfato sem peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984). Para leitura das amostras foram utilizados 2 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,7, contendo peróxido de hidrogênio a 0,048%. Os resultados foram expressos em unidades de catalase/mg de proteína.

As alíquotas de sangue foram armazenadas a -80 °C, até o momento das análises. Para as análises foi feita a separação entre plasma e eritrócitos. O plasma foi descartado. Nos eritrócitos foram feitas três lavagens com 500 µL de NaCl a 0,9% cada uma, centrifugando-se a 2000 x g, durante 8 min, a 4 °C. Após as lavagens preparou-se uma suspensão (homogeneizado), pipetando-se 100 µL dos eritrócitos lavados, em eppendorf contendo 1 mL de água destilada gelada. Para as análises foi utilizado o sobrenadante da suspensão obtido pela centrifugação a 2000 x g, a 4 °C, durante 5 min.

As amostras de fígado foram mantidas refrigeradas a -80 °C até o preparo dos homogeneizados e estes foram analisados imediatamente. Foram pesados 100 mg de amostra e adicionado 1 mL de solução tampão fosfato 50 mM, pH 6,7. Para as análises foram utilizadas alíquotas do sobrenadante, obtido por centrifugação da suspensão (homogeneizado) a 2000 x g, 4 °C, durante 10 min.

Para as análises no fígado e sangue foram utilizadas, respectivamente, alíquotas de 10 µL e 20 µL do sobrenadante dos homogeneizados preparados previamente.

2.5.4 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase

As amostras de fígado e sangue utilizadas foram as mesmas descritas para a análise de catalase. A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo método adaptado de DIETERICH et al. (2000), o qual é baseado na habilidade da superóxido dismutase retirar o oxigênio, diminuindo assim a razão de auto-oxidação do pirogalol, usando leitor de microplaca (Asys, UVM 340). As placas foram preparadas de acordo com a Tabela VI.1 a seguir:

Tabela VI.1 - Reagentes utilizados no plaqueamento para análise de superóxido dismutase por ELISA

	Amostra	Tampão	Reagentes (µL)		
			MTT (1,25 mM)	Pirogalol (100 µM)	DMSO
Branco	-	144	6	-	150
Padrão	-	129	6	15	150
Amostra	30	99	6	15	150

MTT: brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolium; DMSO:dimetilsulfóxido.

Após o preparo da placa, esta foi incubada por 5 min em estufa, a 37 °C e, logo em seguida, foi feita leitura em ELISA a 570 nm. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mg de proteína.

2.5.5 Determinação de proteína total

Foi feita determinação de proteína total de acordo com método de LOWRY et al. (1951) para expressar os resultados de malonaldeído, proteína carbonilada, superóxido dismutase e catalase, utilizando-se o mesmo sobrenadante das análises, para que os resultados fossem expressos em mg de proteína.

2.5.6 Dosagem de nitrato sérico

A dosagem de nitrato no soro sanguíneo foi realizada na Escola de Veterinária da UFMG, com ajuda da professora Gilcinéa de Cássia Santana.

A formação do óxido nítrico foi verificada através da dosagem dos produtos de oxidação estáveis do metabolismo do óxido nítrico (nitratos), utilizando reagente de Griess. Foi pipetada uma alíquota de 50 µL de soro obtido por centrifugação do sangue

em centrífuga Excelsa Baby I, durante 10 min, a 1583 x g. Foram adicionados 150 µL de água deionizada e 30 µL de solução contendo NADPH, FAD e nitrato redutase à concentração de 1 U/mL. Esta mistura foi incubada a 37 °C, durante 24 h. Após este período, foram adicionados 10 µL de sulfato de zinco e homogeneizado (GILLIAM et al., 1993). Em seguida centrifugou-se, durante 5 min, a 2000 x g. Pipetaram-se 100 µL do sobrenadante (amostra) em placas de ELISA (Tabela VI.2).

A quantificação foi feita por curva de calibração construída com nitrito de sódio, em oito concentrações (de 0,78 a 100 µmol/L), sendo duas leituras feitas para cada concentração.

Tabela VI.2 - Reagentes (µL) utilizados no plaqueamento para análise de óxido nítrico por ELISA

	Amostra	Água deionizada	Reagentes (µL)	
			Nitrito de sódio (1 mM/mL de tampão fosfato)	Reagente de Griess*
Branco	-	100	-	100
Padrão	-	-	100	100
Amostra	100	-	-	100

*Reagente de Griess: sulfanilamida a 2,5% e naftilenodiamina a 0,7%.

Após o preparo da placa, esta foi incubada por 10 min, em ausência de luz e logo em seguida, foi feita leitura em ELISA a 540 nm. Os resultados foram expressos em µmol/L.

2.5.7 Análise bioquímica do sangue

As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de patologia clínica da Escola de Veterinária da UFMG, utilizando o aparelho automático Cobas Mira (Roche). Foram avaliadas as concentrações de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH) no soro sanguíneo.

2.6 Análise estatística

As análises de malonaldeído, superóxido dismutase, proteína carbonilada e proteína total foram realizadas em triplicata. As análises de catalase e óxido nítrico foram realizadas em duplicata e a bioquímica sérica foi feita com uma amostra de cada animal. A partir destes dados foram calculados a média, desvio-padrão, erro padrão e coeficiente de variação. Nas tabelas, os resultados são expressos em média ± erro padrão.

A transformação de variável foi feita quando a suposição de igualdade de variâncias (homocedasticidade) entre os grupos não foi satisfeita. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey após evidências encontradas na Análise de Variância Simples (ANOVA) utilizando como fontes de variação as doses e os períodos de tratamento. Nas análises de dienos conjugados e malonaldeído, além das variáveis citadas, foi utilizado o tempo de análise como fonte de variação.

Em todas as conclusões obtidas através das análises foi utilizado o nível de significância de $\alpha=5\%$ ($p \leq 0,05$). Foi utilizado Excel 2007 for Windows (MONTGOMERY, 2001).

3 Resultados e discussão

3.1 Oxidação lipídica no fígado

A oxidação lipídica produzida pelos tratamentos com espermina foi determinada através da concentração de malonaldeído no fígado, pela análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Verificou-se que a formação de malonaldeído foi influenciada pelas diferentes doses e tempos de tratamento. Nos animais tratados durante seis dias com a menor dose (27 mg/kg) a formação de malonaldeído foi semelhante a do grupo controle, entretanto, aqueles tratados com a maior dose (54 mg/kg) apresentaram maior formação, indicando efeito oxidante da espermina. Quando comparados os grupos tratados com ambas as doses notou-se semelhança entre os resultados. Animais tratados durante doze dias tanto com a menor quanto com a maior dose apresentaram concentrações de malonaldeído semelhantes ao grupo controle, entretanto ocorreu maior formação naqueles tratados com a menor dose. Quando comparados os tempos de fornecimento notou-se menor formação de malonaldeído quando utilizados 54 mg/kg durante doze dias (Tabela VI.3).

Desequilíbrios como a hipercolesterolemia causam aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, as quais exercem efeitos citotóxicos por causar a peroxidação lipídica com formação de malonaldeído. Este aldeído, obtido de hidroperóxidos lipídicos é considerado um bom biomarcador dos danos causados por radicais livres em patologias associadas ao estresse oxidativo (MATEOS et al., 2005).

Apesar da reação de TBARS não ser específica para malonaldeído porque o ácido tiobarbitúrico reage com diferentes compostos carbonílicos (alcanos, alcenos e alcadienos), esta análise pode ser usada para avaliar a extensão da oxidação lipídica

(MARIUTTI et al., 2008). Assim, não deve ser utilizada isolada, mas sim em conjunto com outras análises e, por isso, foram feitas outras avaliações para determinação da oxidação.

Tabela VI.3 - Concentração de malonaldeído no fígado de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose EPM (mg/kg)	Malonaldeído (mM/mg de proteína)
6	0	1,35±0,08 ^{a,c}
	27	1,48±0,10 ^{a,b}
	54	1,68±0,11 ^b
12	0	1,26±0,10 ^{c,d}
	27	1,35±0,08 ^{a,c}
	54	1,14±0,08 ^d

EPM: espermina. Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-d) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=30$.

3.2 Oxidação protéica no fígado

A oxidação protéica, determinada pela formação de proteína carbonilada, foi influenciada tanto pelas doses utilizadas, quanto pelo tempo de tratamento. Nos grupos tratados durante doze dias observaram-se maiores concentrações quando utilizada a menor dose (27 mg/kg) em relação ao grupo controle, enquanto que para a maior dose as concentrações foram semelhantes as do grupo controle. Porém, animais tratados com ambas as doses de espermina durante seis dias apresentaram concentrações semelhantes as do grupo controle. Com relação ao tempo de tratamento, animais tratados durante doze dias com a menor dose apresentaram teor de proteína carbonilada semelhantes a todos os grupos tratados durante seis dias, enquanto aqueles tratados com a maior dose apresentaram teor reduzido, sugerindo ação antioxidante da espermina nestas condições (Tabela VI.4).

Tabela VI.4 - Concentração de proteína carbonilada no fígado de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose EPM (mg/kg)	Proteína carbonilada ($\mu\text{mol.L}^{-1}/\text{mg de proteína}$)
6	0	0,86±0,07 ^a
	27	0,97±0,07 ^a
	54	0,92±0,07 ^a
12	0	0,64±0,08 ^b
	27	0,84±0,10 ^{a,c}
	54	0,69±0,08 ^{b,c}

EPM: espermina. Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-f) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=30$.

Estes resultados sugerem que nos animais tratados com a menor dose durante doze dias ocorreu maior oxidação protéica em relação aos grupos controle. Os mecanismos de oxidação de proteínas ainda não estão bem esclarecidos. STARKE-REED & OLIVER (1989) verificaram que a quantidade de carbonila por grama de proteína aumentou progressivamente com o aumento da idade dos ratos estudados, associando-se ao aparecimento de doenças senis.

3.3 Atividade das enzimas antioxidantes no fígado e no sangue

A capacidade antioxidante no fígado e no sangue foi investigada pela quantificação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e catalase. As concentrações da enzima superóxido dismutase no fígado e no sangue de ratos são apresentadas na Tabela VI.5. No fígado a atividade de SOD foi maior nos grupos que receberam espermina em relação aos grupos controle, enquanto nos animais dos grupos que receberam a menor dose (27 mg/kg) a atividade de SOD foi maior em relação àqueles que receberam maior dose (54 mg/kg). Quanto ao período de tratamento, a produção de SOD foi maior nos animais tratados durante doze dias. Quando comparadas a mesma dose fornecida por diferentes tempos notou-se que para 27 mg/kg não houve diferença significativa, entretanto, para 54 mg/kg a produção de SOD foi maior quando administrada durante doze dias. Não houve diferença entre os grupos controle de ambos os tempos (6 e doze dias).

Tabela VI.5 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado e no sangue (eritrócito) de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose EPM (mg/kg)	SOD (U/mg de proteína)	
		Fígado	Eritrócito
6	0	1,16±0,15 ^a	32,50±5,26 ^a
	27	3,53±0,28 ^b	13,41±1,60 ^b
	54	1,82±0,17 ^c	11,68±1,01 ^b
12	0	1,05±0,14 ^a	27,90±4,72 ^a
	27	4,00±0,34 ^b	12,23±1,55 ^b
	54	2,35±0,20 ^d	26,06±2,47 ^a

EPM: espermina. Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-c) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=30$.

No sangue a produção de SOD foi menor nos grupos que receberam espermina em relação aos grupos controle. Entretanto, nos animais dos grupos que receberam a

maior dose (54 mg/kg) durante doze dias a atividade de SOD foi maior em relação àqueles que receberam menor dose (27 mg/kg), mas igual naqueles tratados durante seis dias. Em relação ao período de tratamento, a produção de SOD foi maior nos animais tratados durante doze dias. Quando comparadas a mesma dose fornecida por diferentes tempos notou-se comportamento semelhante ao verificado no fígado, ou seja, para 27 mg/kg não houve diferença significativa, entretanto, para 54 mg/kg a produção de SOD foi maior quando administrada durante doze dias. Não houve diferença entre os grupos controle de ambos os tempos (6 e doze dias).

Observaram-se no sangue altos valores de desvio-padrão nos grupos, entretanto, os desvios foram baixos quando analisadas as duplicatas da mesma amostra, tendo valor médio de 2,34 U/mg de proteína.

O efeito da administração de espermina sobre as concentrações da enzima catalase no fígado e sangue de ratos são apresentadas na Tabela VI.6. No fígado a produção de catalase do grupo tratado durante seis dias com a menor dose foi menor em relação ao grupo controle e o grupo tratado com a maior dose apresentou atividade semelhante a do controle. Enquanto animais tratados durante doze dias o comportamento foi inverso, ou seja, animais tratados com a menor dose apresentaram atividade semelhante ao grupo controle e menor que aqueles tratados com a maior dose. Desta forma, sugere-se atividade antioxidante da espermina nos animais tratados com a maior dose (54 mg/kg) durante doze dias. Com relação a dose fornecida durante diferentes tempos, ambas apresentaram maior atividade quando fornecidas durante maior tempo, sendo que as atividades de catalase no fígado apresentaram resultados semelhantes nos grupos controle de ambos os tempos (6 e doze dias).

Tabela VI.6 - Atividade de catalase no fígado e no sangue (eritrócito) de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose EPM (mg/kg)	Catalase (U/mg de proteína)	
		Fígado	Eritrócito
6	0	10,90±1,10 ^a	14,21±4,60 ^a
	27	7,31±0,88 ^b	14,81±3,11 ^a
	54	11,98±0,84 ^a	3,90±1,20 ^b
12	0	10,59±0,70 ^a	13,54±3,00 ^a
	27	11,68±1,60 ^{a,c}	17,73±3,48 ^a
	54	13,98±0,80 ^c	15,67±4,56 ^a

EPM: espermina. Médias (± erro padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-f) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=20$.

A atividade da enzima catalase no sangue de animais tratados durante seis dias com a menor dose foi estatisticamente igual a do grupo controle e ambas menores que animais tratados com a maior dose, indicando influência negativa da espermina sobre a atividade da enzima catalase com a maior dose. Entretanto, animais tratados com espermina durante doze dias não apresentaram resultados diferentes dos grupos controle. Quando analisada a mesma dose fornecida por diferentes tempos observou-se que 27 mg/kg apresentou resultado semelhante em ambos os tempos e que 54 mg/kg durante doze dias resultou em maior atividade de catalase no sangue em relação a seis dias. Os resultados dos grupos controle de ambos os tempos foram equivalentes.

Da mesma forma como ocorreu nos resultados de superóxido dismutase, quando verificados os resultados das concentrações de catalase no sangue, observam-se altos valores de desvio-padrão nos grupos, entretanto, os desvios foram baixos quando analisadas as duplicatas da mesma amostra, tendo variado de 0,05 a 1,7 U/mg de proteína.

No sangue de animais tratados durante seis dias ocorreu redução na atividade da catalase nos animais tratados quando utilizada a maior dose (54 mg/kg), enquanto animais tratados durante doze dias não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos e controle.

A superóxido dismutase é uma enzima que catalisa a conversão do radical superóxido transformando-o em peróxido de hidrogênio, enquanto a catalase promove a redução de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Portanto, a atuação conjunta destas duas enzimas é importante para que o organismo possa eliminar as espécies reativas de oxigênio, responsáveis por diversos danos celulares. Portanto, níveis elevados da enzima superóxido dismutase relacionam-se com aumento da função endotelial em condições de hipercolesterolemia e prevenção da produção de espécies reativas de oxigênio quando o organismo encontra-se sob elevado estresse oxidativo (COHEN et al., 1996; FARACI & DIDON, 2004).

Assim, baixas concentrações destas enzimas levam a detoxificação ineficiente dos peróxidos lipídicos e de hidrogênio, podendo favorecer a formação de radicais peroxila e hidroxila, sendo este último a espécie reativa de oxigênio mais destrutiva aos sistemas biológicos (WASSMANN et al., 2004), contribuindo para a ocorrência de danos celulares, fato que leva a problemas como aterogênese (CASTRO, 2011).

A oxidação da espermina por aminoxidases produz peróxido de hidrogênio (CERRADA-GIMENEZ, 2011), assim, é possível que o aumento nas concentrações de

catalase tenha sido causado pelo aumento na produção de peróxido de hidrogênio, uma vez que esta enzima promove a redução deste, em água e oxigênio.

Os resultados encontrados na literatura para a atividade da enzima catalase são controversos. Alguns estudos mostraram um aumento na sua atividade (PINHO et al., 2006), outros uma diminuição ou não foram alterados em função dos tratamentos (CASTRO, 2011). A ambiguidade destes resultados pode ser devido a uma variedade de fatores, incluindo divergência de protocolos. A maioria dos ensaios envolve a degradação de seu substrato H_2O_2 que é acompanhada espectrofotometricamente, portanto, a atividade da catalase é dependente não só do montante de proteína catalase, mas também da concentração de H_2O_2 que é usada como substrato (JI, 1995).

O catabolismo das poliaminas deve-se à ação conjunta da enzima N^1 -acetiltransferase e PAO, sendo que esta última tem forte afinidade por substratos acetilados. Este catabolismo gera compostos H_2O_2 e 3-acetaminopropanal, que elevam o estresse oxidativo no organismo (CERRADA-GIMENEZ et al., 2011). É possível que nas situações em que ocorreu baixa atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, tenha ocorrido a metabolização do H_2O_2 , pela enzima glutathione peroxidase, a qual também é responsável pela metabolização deste composto, entretanto, neste trabalho não foi avaliada.

Neste trabalho verificou-se que as concentrações de superóxido dismutase no fígado aumentaram nos grupos tratados com espermina em relação aos controles, sugerindo ação antioxidante da espermina. Entretanto, quando analisada no sangue, o resultado foi inverso, sendo a concentração de superóxido dismutase menor nos animais tratados, em relação aos controles. Quanto às concentrações de catalase, observou-se que no fígado, em animais tratados durante seis dias as concentrações foram semelhantes (dose maior) ou menores (dose menor) que animais dos grupos controle e em animais tratados durante doze dias as concentrações foram semelhantes (dose menor) ou maiores (dose maior) que animais dos grupos controle.

No sangue, as concentrações de catalase em animais tratados durante seis dias foram semelhantes (dose menor) ou menores (dose maior) que animais dos grupos controle e em animais tratados durante doze dias as concentrações foram semelhantes nas duas doses utilizadas em relação ao controle.

Com relação às doses de espermina utilizadas verificaram-se resultados diferentes em relação às concentrações da enzima superóxido dismutase. Enquanto maiores concentrações foram encontradas no fígado de animais tratados com a menor

dose (27 mg/kg), em relação aos grupos controle, no sangue ocorreu o inverso, sendo maiores as concentrações nos grupos controle. No fígado, a maior atividade de catalase foi observada quando utilizada a maior dose (54 mg/kg), enquanto no sangue foi observada menor atividade quando utilizada a maior dose.

De acordo com os resultados observou-se que a enzima superóxido dismutase elevou-se no fígado de animais tratados com espermina, ao mesmo tempo que diminuiu no sangue. Isso pode ter ocorrido devido ao tipo de estresse oxidativo, pois este é bastante específico e pode estar alterado em cada órgão de forma diferente, não necessariamente seguir uma mesma tendência. Estudos mostram que nem sempre as enzimas superóxido dismutase e catalase seguem um aumento ou redução concomitante, por isso, o ideal é dosar outro marcador de estresse oxidativo (como a enzima glutathione peroxidase ou algum produto do estresse como o malonaldeído). Além disso, a catalase é bastante instável e, conseqüentemente, seus resultados são muitos variáveis, devido, principalmente, ao protocolo de análise utilizado.

O aumento na atividade das enzimas antioxidantes pode ser interpretada como um mecanismo compensatório (aumento da síntese desta enzima) devido ao aumento da geração do radical superóxido produzido durante o estresse oxidativo, entretanto, neste trabalho, os grupos tratados apresentaram maiores atividades enzimáticas em relação aos grupos controles, submetidos às mesmas condições, indicando, portanto, que os efeitos benéficos da espermina estão associados à elevação na atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase, sendo sugerida a atuação da espermina como ativadora destas importantes enzimas antioxidantes.

3.4 Nitrato de sódio no soro sanguíneo

Após tratamento com espermina verificou-se que não houve diferença entre os grupos tratados e os grupos controle sobre a produção de nitrato de sódio no soro sanguíneo (Tabela VI.7).

Em relação ao período de tratamento nota-se que a produção de nitrato sanguíneo foi maior nos animais tratados durante seis dias, entretanto, inferior às concentrações encontradas em outros trabalhos. O óxido nítrico é um potente oxidante produzido tanto pelas células endoteliais quanto por macrófagos e pode exercer efeitos aterogênicos ou protetores, dependendo de sua fonte de produção. Quando sintetizado a partir da óxido nítrico sintase endotelial, sua função vasodilatadora oferece proteção contra a hipertensão e a progressão da aterosclerose. Ao contrário, o óxido nítrico

produzido a partir da óxido nítrico sintase induzível, nos macrófagos, contribui para a oxidação da lipoproteína de alta densidade (LDL) (DEANFIELD et al., 2007).

Tabela VI.7 - Concentração de nitrato de sódio no sangue de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose EPM (mg/kg)	Nitrato de sódio (mM)
6	0	0,24±0,01 ^{a,b}
	27	0,24±0,00 ^a
	54	0,26±0,01 ^b
12	0	0,07±0,01 ^c
	27	0,07±0,00 ^c
	54	0,07±0,01 ^c

EPM: espermina. Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-c) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=20$.

Além disso, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nos vasos sanguíneos reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico, podendo induzir disfunção endotelial (TOUSOULIS et al., 2008). A hipercolesterolemia induzida pela dieta proporciona diminuição na atividade da óxido nítrico sintase favorecendo complicações cardiovasculares via redução do relaxamento endotelial (DEVIRIM et al., 2008).

3.5 Enzimas marcadoras de estresse fisiológico

Para resultar em uma distribuição normal, os resultados da concentração da enzima lactato desidrogenase (LDH), sofreram transformação $u = \ln(\text{Dado})$, apresentando coeficiente de determinação (R^2) de 0,992.

Os parâmetros bioquímicos de estresse (ALT, AST e LDH) não sofreram influência do efeito da administração oral de espermina (Tabela VI.8). Alguns estudos (NICOLA, 1996; VENDEMIALE et al., 2001) mostram a importância do fígado em manter o *status redox*, ou seja, o equilíbrio oxidativo do organismo, para não haver excesso de radicais livres que causam danos celulares. Contudo, o dano hepático promove a oxidação e aumento dos radicais livres. Isto, conseqüentemente, pode aumentar os níveis de peroxidação lipídica e os danos celulares. Por isso, a avaliação dos parâmetros bioquímicos foi importante para a determinação de possíveis alterações decorrentes da administração de espermina, não sendo constatada, portanto, nenhuma alteração hepática nos animais tratados nas condições deste experimento. Estes resultados estão de acordo com TIL et al. (1997) que estudaram parâmetros de toxicidade da espermina em ratos, utilizando diversas doses.

Tabela VI.8 - Concentrações de parâmetros bioquímicos séricos de ratos tratados com diferentes doses e tempos de tratamento com espermina

Tempo de tratamento (dias)	Dose EPM (mg/kg)	LDH (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
6	0	6,07±0,65 ^a	84,70±13,21 ^a	108±23 ^a
	27	5,76±0,68 ^a	92,20±7,37 ^a	109±12 ^a
	54	6,09±0,83 ^a	102,40±14,91 ^a	102±24 ^a
12	0	5,75±0,49 ^a	88,22±12,67 ^a	107±19 ^a
	27	5,28±0,56 ^a	82,90±9,74 ^a	103±11 ^a
	54	6,04±0,72 ^a	93,40±12,02 ^a	117±25 ^a

EPM: espermina; LDH: enzima lactato desidrogenase; ALT: enzima alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase. Médias (\pm erro padrão) com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (a-a) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=10$.

Sendo a LDH uma enzima encontrada tanto em células musculares como em hepatócitos, sua liberação é sugestiva de lesão por estresse, com ocorrência de hemólise, entretanto, para que ocorra hemólise outros fatores devem estar associados (COHEN et al., 1998). Assim, é possível que durante a contenção física para realização da gavagem, tenham aumentado os níveis séricos das enzimas ALT, AST e LDH. Entretanto, como todos os animais foram submetidos às mesmas condições, este efeito não pode ser observado, pois a espermina não interferiu em suas concentrações.

4 Conclusões

Nas condições avaliadas houve maior formação de malonaldeído nos grupos tratados indicando efeito oxidante da espermina quando analisado por este parâmetro.

O efeito da administração de espermina sobre o sistema antioxidante enzimático endógeno apresentou resultados satisfatórios, devido ao aumento da atividade da enzima superóxido dismutase e catalase nos grupos tratados em algumas situações, sugerindo sua ativação nas condições avaliadas, o que contribui para a defesa do organismo contra lesões provocadas pela oxidação proveniente de espécies reativas de oxigênio.

Os tratamentos aplicados indicaram maior oxidação protéica nos grupos que receberam espermina em relação aos grupos controle, entretanto, foi observado possível efeito antioxidante nos animais tratados durante doze dias com a menor dose.

Nenhum efeito dos tratamentos foi observado sobre as concentrações de indicadores de estresse oxidativo (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase) e nitrato plasmático.

Neste estudo foram observados diferentes comportamentos dos tratamentos aplicados sobre os efeitos na oxidação, de forma que em determinadas situações nota-se influência positiva e em outras negativas sobre a atividade do sistema enzimático antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F.; SAMEJIMA, K. A new fluorimetric method for the determination of spermidine and spermine in tissues by thin layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 67, p. 298-308, 1975.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, v. 105. p. 121-126, 1984.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis. 16. ed. In: Cunniff, P. (Ed). Arlington, VA: AOAC, vol. 1, método. 934.06,1995.
- ARAÚJO, J.M.A. *Química de Alimentos: teoria e prática*. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 478p.
- ASSIMAKOPOULOS, S.F.; KONSTANTINOOU, D.; GEORGIU, C.; CHRONI, E. Metabolism of polyamines and oxidative stress in the brain of cholestatic rats. *Amino Acids*, v. 38, p. 973-974, 2010.
- BACHRACH, U.; PLESSER, Y.M. A sensitive, rapid, chemiluminescence-based method for the determination of diamines and polyamines. *Analytical Biochemistry*, v. 152, p. 423-431, 1986.
- BARBOUR, G.W.; FARRAN, M.T.; USAYRAN, N.; DAGHIR, N.J. Review of poultry production and the physical and chemical characteristics of imported corn and soybean meal in major feed operations in Lebanon. *World Poultry Science Journal*, v. 64, n. 2, p. 177-185, 2008.
- BARDÓCZ, S. The role of dietary polyamines. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 47, p. 683–690, 1993.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BARDÓCZ, S.; BROWN, D.S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A. Luminal and basolateral polyamine uptake by rat small intestine stimulated to grow by *Phaseolus vulgaris* lectin phytohaemagglutinin *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1034, n.1, p. 46-52, 1990.
- BARDÓCZ, S.; BROWN, D.S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A.; STEWART, J.C.; PALMER, R.M. Effect of the β -adrenoreceptoragonist clenbuterol and phytoheamagglutinin on growth, protein synthesis and polyamine metabolism of tissues of the rat. *British Journal of Pharmacology*, v. 106, p. 476-482, 1992.
- BARDÓCZ, S.; DUGUID, T.J.; BROWN, D.S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A.; WHITE, A.; RALPH, A. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *British Journal of Nutrition*, v. 73, p. 819-928, 1995.

- BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUSZTAI, A. Polyamines in food - implications for growth and health. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, v. 4, p. 66-70, 1993.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *International Journal of Food Science and Nutrition*, v. 47, p. 233-261, 1996.
- BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 272, p. 20313–20316, 1997.
- BOGET, N.; TORNÉ, J.M.; WILLADINO, L.; SANTOS, M. Variations in endogenous polyamine content of maize calli obtained from zygotic and androgenetic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 40, n. 2, p. 139-144, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n. 20 de 21 de julho de 1999. Aprova os métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura. *Diário Oficial*, Brasília, 27 julho 1999.
- BUCKLEY, D.J.; MORRISSEY, P.A.; GRAY, J.I. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *Journal of Animal Science*, v. 73, n. 10, p. 3122-3130, 1995.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CÂMARA-SILVA, I.A.; DIAS, R.V.C.; SOTO-BLANCO, B. Determinação das atividades séricas de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase em eqüinos de diferentes categorias de atividade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 1, p. 250-252, 2007.
- CAO, D.D.; HUA, J.; ZHU, S.J.; HUA, W.M.; KNAPP, A. Relationship between changes in endogenous polyamines and seed quality during development of sh2 sweet corn (*Zea mays* L.) seed. *Scientia Horticulturae*, v. 123, p. 301-307, 2010.
- CASTRO, C.A. Lesão aterosclerótica, capacidade antioxidante e histopatologia de camundongos apoe -/- alimentados com açaí (*Euterpe edulis* Martius) e submetidos ao treinamento físico. Viçosa: Departamento de Educação Física da UFV, 2011. 68f. (Dissertação, Mestrado em Educação Física).
- CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

- CERRADA-GIMENEZ, M.; PIETILA, M.; LOIMAS, S.; PIRINEN, E.; HYVÖNEN, M.T.; KEINÄNEN, T.A.; JÄNNE, J.; ALHONEN, L. Continuous oxidative stress due to activation of polyamine catabolism accelerates aging and protects against hepatotoxic insults. *Transgenic Research*, v. 20, p. 387-396, 2011.
- CHAIJAN, M.; KEWMANEE, D.; HIRUNKAN, F.; ARYAMUANG, S.; PANPIPAT, W. Oxidative stability of refrigerated mackerel fillet as influenced by Maillard reaction products. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, v. 2, n. 4, p. 917-931, 2009.
- CHANG, S.F.; AYRES, J.W.; SANDINE, W.S. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine and tryptophan. *Journal of Dairy Science*, v. 68, p. 2840-2846, 1985.
- CINQUINA, A.L.; CALI, A.; LONGO, F.; DE SANTIS, L.; SEVERONI, A.; ABBALE, F. Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1032, p. 73-77, 2004.
- CIRILO, M.P.G.; COELHO, A.F.S.; ARAÚJO, C.M.; GONÇALVES, F.R.B.; NOGUEIRA, F.D.; GLÓRIA, M.B.A. Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee. *Food Chemistry*, v. 82, p. 397-402, 2003.
- COHEN, G.; KIM, M.; OGWU, V. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for analysis of brain cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 67, p. 53-56, 1996.
- COHEN, J.A.; BRECHER, M.E.; BANDARENKO, N. Cellular source of serum lactate dehydrogenase elevation in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of Clinical Apheresis*, v. 13, p. 16-19, 1998.
- COLLINS, C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora Unicamp, 2006, 453p.
- COUTTS, R.T.; BAKER, G.B.; PASUTTO, F.M. Foodstuffs as sources of psychoactive amines and their precursors: content, significance and identification. *Advances in Drug Research*, v. 15, p. 169-231, 1986.
- DALGAARD, P.; MADSEN, H.L.; SAMIEIAN, N.; EMBORG, J. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, p. 80-95, 2006.
- DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, v. 9, n. 4, p. 169-176, 2003.

- DAS, K.C.; MISRA, H.P. Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 262, p. 127-133, 2004.
- DEANFIELD, J.E.; HALCOX, J.P.; RABELIK, T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, v. 115, p. 1285-1295, 2007.
- DECKER, E.A.; CRUM, A.D. Inhibition of oxidative rancidity in salted ground pork by carnosine. *Journal of Food Science*, v. 56, n. 5, p. 1179-1181, 1991.
- DELOYER, P.; PEULEN, O.; DANDRIFOSSE, G. Dietary polyamines and no neoplastic growth and disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 13, p. 1027-1032, 2001.
- DESTAILLATS, F.; GOLAY, P.A.; JOFFRE, F.; WISPELAERE, M.; HUG, B.; GIUFFRIDA, F.; FAUCONNOT, L.; DIONISI, F. Comparison of available analytical methods to measure trans-octadecenoic acid isomeric profile and content by gas-liquid chromatography in milk fat. *Journal of Chromatography A*, v. 1145, p. 222-228, 2007.
- DEVIRIM, E.; ERGÜDERA, Í.B.; ÖZBEKB, H.; DURAK, I. High-cholesterol diet increases xanthine oxidase and decreases nitric oxide synthase activities in erythrocytes from rats. *Nutrition Research*, v. 28, p. 212-215, 2008.
- DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, v. 101, p. 33-39, 2000.
- DOMÍNGUEZ, X.A. Cromatografía em capa delgada. In: *Cromatografía em papel y em capa delgada*. Monterrey: Eva V. Chesneau, 1975, p. 35-75.
- DROLET, G.; DUMBROFF, B.E.; LEGGE, L.R.; THOMPSON, E.J. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*, v. 25, n. 2, p. 367-371, 1986.
- DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Nitric oxide revision. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
- EYMARD, S.; JACOBSEN, C.; BARON, C.P. Assessment of washing with antioxidant on the oxidative stability of fatty fish mince during processing and storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 58, p. 6182-6189, 2010.
- FARACI, F.M.; DIDON, S.P. Vascular Protection: superoxide dismutase isoforms in vessel wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 24, p. 1367-1373, 2004.
- FELIX, H.; HARR, J. Association of polyamines to different parts of various species plants. *Physiologia Plantarum*, v. 71, n. 3, p. 245-250, 1987.

- FENG, J.; ARRIAGA E.A. Quantification of carbonylated proteins in rat skeletal muscle mitochondria using capillary sieving electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, v. 29, p. 475-482, 2008.
- FENNEMA, O.R. Lipids. In: FENNEMA, O. R. (Ed.) *Food Chemistry*. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996, p. 255-270.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo: revisão. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Salvador: Ministério da Saúde, 2005, 28p.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 497-509, 1957.
- FRÍAS, J.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; GULEWICZ, P.; PEREZ-ROMERO, A.; PILARSKI, R.; GULEWICZ, K.; VIDAL-VALVERDE, C. Biogenic amines and HL60 cytotoxicity of alfalfa and fenugreek sprouts. *Food Chemistry*, v. 105, p. 959-967, 2007.
- FUJISAWA, S.; KADOMA, Y. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Research*, v. 25, p. 965-969, 2005.
- GABORIAU, F.; VAULTIER, M.; MOULINOUX, J.P.; DELCROS, J.G. Antioxidative properties of natural polyamines and dimethylsilane analogues. *Redox Report*, v. 10, n. 1, p. 9-18, 2005.
- GEORGANTELIS, D.; BLEKAS, G.; KATIKOU, P.; AMBROSIADIS, I.; FLETOURIS, D.J. Effect of rosemary extract, chitosan and a-tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. *Meat Science*, v. 75, p. 256-264, 2007.
- GILLIAM, M.B.; SHERMAN, M.P.; GRISCAVAGE, J.M.; IGNARRO, L.J. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. *Analytical Biochemistry*, v. 212, p. 359-365, 1993.
- GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In: HUI, H., NOLLET, L.M.L. (Ed.) *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, v. 4, p. 1-38, New York: Dekker, 2005.
- GLÓRIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A. Metodologia para determinação de aminas biogênicas em bebidas. In: ENCONTRO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 9, 1995, João Pessoa. Livro de Resumos. João Pessoa: UFP, p. 137, 1995.

- GLÓRIA, M.B.A.; TAVARES-NETO, J.; LABANCA, R.A.; CARVALHO, M.S. Influence of cultivars and germination on bioactive amines in soybeans (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 19, p. 7480-7485, 2005.
- GONG, X.Y.; HAUSER, P.C. Enantiomeric separation of underivatized small amines in conventional and on-chip capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, v. 27, n. 21, p. 4375-4382, 2006.
- GORDON, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V.; GORDON, M.H. Antioxidants in food – practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 380 p. (Versão digital em: www.woodhead-publishing.com).
- GOYAL, M.; ASTHIR, B. Polyamine catabolism influences antioxidative defense mechanism in shoots and roots of five wheat genotypes under high temperature stress. *Plant Growth Regulation*, v. 60, p. 13-25, 2010.
- GRIFFITHS, H.R.L.; MOLLER, G.; BARTOSZ, A.; BAST, C.; BERTONI-FREDDARI, A.; COLLINS, M.; COOKE, S.; COOLEN, G.; HAENEN, A.M.; HOBERG, S.; LOFT, J.; LUNEC, R.; OLINSKI, J.; PARRY, A.; POMPELLA, H.; POULSEN, H.; VERHAGEN, H.; ASTLEY, S.B. Biomarkers. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 23, p. 101–208, 2002.
- GRINBERG, N. *Modern thin layer chromatography*. New York: Marcel Dekker, 1990. 490p.
- GUNSTONE, F.D.; NORRIS, F.A. Oxidation. In: GUNSTONE, F.D.; Norris, F.A. (Ed.) *Lipid in Foods: Chemistry, Biochemistry and Technology*. New York: Pergamon Press, 1983. p. 58-65.
- HÁ, H.C.; SIRISOMA, N.S.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J.L.; WOSTER, P.M.; CASERO Jr., R.A. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v. 95, p. 11140–11145, 1998.
- HÁ, H.C.; YAGER, J.D.; WOSTER, P.A.; CASERO Jr, R.A. Structural specificity of polyamines and polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species. [*Biochemical and Biophysical Research Communications*](#), v. 244, p. 298-303, 1998.
- HÄKKINEN, M.R.; KEINÄNEN, T.A.; VEPSÄLÄINEN, J.; KHOMUTOV, A.R.; ALHONEN, L.; JÄNNE, J.; AURIOLA, S. Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass

- spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 45, p. 625-634, 2007.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, v. 5, p. 42-49, 1994.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4 ed. New York: Oxford University Press Inc; 2007. 187p.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, v. 246, p. 501-514, 1986.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, v.186, p. 1-85, 1990.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, v. 59, n. 1, p. 609-623, 1992.
- HAMMOND, J.E.; HERBST, E.J. Analysis of polyamines by thin layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 22, p. 474-484, 1968.
- HAMRE, K.; KOLÁS, K.; SANDNES, K. Protection of fish feed, made directly from marine raw materials, with natural antioxidants. *Food Chemistry*, v. 119, p. 270-278, 2010.
- HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Seminars in Hematology*, v. 26, p. 277-285, 1989.
- HIBASAMI, H.; TANAKA, M.; NAGAI, J.; IKEDA, T. Dicyclohexylamine, a potent inhibitor of spermidine synthase in mammalian cells. *FEBS Letters*, v. 116, n. 1, p. 99-101, 1980.
- HOLTTA, E. Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: purification and properties of polyamine oxidase. *Biochemistry*, v. 16, n. 1, p. 91-100, 1977.
- HONIKEL, K.O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, v. 49, n. 4, p. 447-457, 1998.
- HOSOMI, M.; SMITH, S.M.; MURPHY, G.M.; DOWLING, R.H. Polyamine distribution in the rat intestinal mucosa. *Journal of Chromatography*, v. 375, p. 267-275, 1986.
- HOUBEN, J.H.; EIKELBOOM, G.; HOVING-BOLINK, A.H. Effect of the dietary supplementation with vitamin E on colour stability and lipid oxidation in packaged, minced pork. *Meat Science*, v. 48, n. 3-4, p. 265-273, 1998.
- IAL (Instituto Adolfo Lutz). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4. ed., São Paulo: IAL, 2004. 1004p.

- IMMONEN, K.; RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Some effects of residual glycogen concentration on the physical and sensory quality of normal pH beef. *Meat Science*, v. 55, n. 1, p. 33-38, 2000.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). *Standard methods for the analysis of oils fats and derivatives*. 7. ed. Oxford: Pergamon Press, 1992.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINE-FONT, A. Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with post-column derivatization. *Journal Food Composition and Analysis*, v. 76, p. 1027-1032, 1993.
- JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 9, p. 515-540, 1990.
- JI, L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine Science Sports Exercise*, v. 25, p. 225-231, 1993.
- JI, L.L. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v. 23, p. 135-166, 1995.
- KALAČ, P.; GLORIA, M.B.A. Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkraut. *Transworld Research Network*, p. 267-309, 2009.
- KALAČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, v. 90, p. 219-230, 2005.
- KANNER, J.; GERMAN, J. B.; KINSELLA, J. E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 25, p. 317-364, 1987.
- KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, v. 36, p. 169–189, 1994.
- KHAN, A.U.; MEI, Y.; WILSON, T. A proposed function for spermine and spermidine: Protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v. 89, p. 11426-11427, 1992.
- KHAN, H.A. TLC determination of aliphatic polyamines on calcium sulfate layers. *Chromatographia*, v. 64, n. 7/8, 2006.
- KJÆRSGÅRD, I.V.H.; NØRRELYKKE, M.; BARON C.P.; JESSEN, F. Identification of carbonylated protein in frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and development of protein oxidation during frozen storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 54, p. 9437-9446, 2006.

- KOLAKOWSKA, A. Lipid Oxidation in Food Systems. In: SIKORSKI, Z.E.; KOLAKOWSKA, A. Chemical and Functional Properties of Food Lipids. Boca Raton: CRC PRESS, 2003. (Versão digital em: www.crcpress.com).
- KOMPRDA, T.; NEZNALOVA, J.; STANDARA, S.; BOVER-CID, S. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. *Meat Science*, v. 59, p. 267-276, 2001.
- KRAUSOVÁ, P.; KALACH, P.; KRÍŽEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T. Changes in the content of biologically active polyamines during storage and cooking of pig liver. *Meat Science*, v. 77, p. 269-274, 2007.
- LANDETE, J.M.; RIVAS, B.D.L.; MARCOBAL, A.; MUÑOZ, R. Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 48, p. 697-714, 2008.
- LAVIZZARI, T.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; BOVER-CID, S.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1129, p. 67-72, 2006.
- LAWRIE, R.A. *Meat Science*. 2. ed. Oxford: Pergamon, 1974, 419 p.
- LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 464-478, 1990.
- LIANG, Y.L.; LUR, H.S. Conjugated and free polyamine levels in normal and aborting maize kernels. *Crop Science*, v. 42, n. 4, p. 1217-1224, 2002.
- LIMA, A.S. Metodologia para a determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência - par iônico. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 1999. 77p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. *Boletim da SBCTA*, v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.
- LINDEMOSE, S.; NIESEN, P.E.; MOLLEGARD, N.E. Polyamines preferentially interact with bent adenine tracts in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 33, p. 1790-1803, 2005.
- LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. *British Journal of Nutrition*, v. 84, p. S55-S58, 2000.
- LØVAAS, E. Antioxidative effects of polyamines. *Journal American Oil Chemists Society*, v. 68, n. 6, p. 353-358, 1991.

- LØVAAS, E.; CARLIN, G. Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 11, n. 5, p. 455-61, 1991.
- LØVAAS, E. Hypothesis: spermine may be an important epidermal antioxidant. *Medical Hypotheses*, v. 5, p. 59-67, 1995.
- LØVAAS, E. Antioxidative and metal chelating effects of polyamines. *Advances in Pharmacology*, v. 38, p. 119-149, 1997.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUPATINI, G.C.; MACCARI, M.; ZANETTE, S.; PIACENTINI, E.; NEUMANN, M. Avaliação do desempenho agrônômico de híbridos de milho (*Zea mays* L.) para produção de silagem. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 3, n. 2, p. 193-203, 2004.
- MCCALL, M.R.; BALZ, F. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in human? *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p.1034-1053, 1999.
- MACKINTOSH, C.A.; PEGG, A.E. Effect of spermine synthase deficiency on polyamine biosynthesis and content in mice and embryonic fibroblasts, and the sensitivity of fibroblasts to 1,3-bis-(2-chloroethyl)-*N* nitrosourea. *Biochemical Journal*, v. 351, p. 439-447, 2000.
- MARIUTTI, L.R.B.; NOGUEIRA, G.C.; BRAGAGNOLO, N. Solid Phase Microextraction - Gas Chromatography for the Evaluation of Secondary Lipid Oxidation Products in Chicken Patties during Long-Term Storage. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 10, 1849-1855, 2009.
- MARIUTTI, L. R. B.; ORLIEN, V.; BRAGAGNOLO, N.; SKIBSTED, L. H. Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. *European Food Research and Technology*, v. 227, p. 337-344, 2008.
- MARZABADI, M.R.; LØVAAS, E. Spermine prevent iron accumulation and depress lipofuscin accumulation in cultured myocardial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 21, n. 3, p. 375-381, 1996.
- MATEOS, R.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. DEtermination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Application*, v. 827, p. 76-82, 2005.

- MATKOVICS, B.; KECSKEMETI, V.; VARGA, S.Z.I.; NOVAK, Z.; KERTESZ, Z.S. Antioxidant properties of di- and polyamines. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 104, p. 475-479, 1993.
- MAYER, H.K.; FIECHTER, G.; FISCHER, E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography, A*, v. 1217, p. 3251-3257, 2010.
- MEDINA, M.A.; URDIALES, C.R.; RORÍGUEZ-CASO, C.; RAMIREZ, F.J.; SANCHÉZ JIMÉNEZ, F. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biochemical applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38. p. 23-59, 2003.
- MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochemistry Journal*, v. 218, p. 273-5, 1983.
- MENDONÇA, A.C. Atividade antioxidante de poliaminas e comparação com produtos naturais e sintéticos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2009, 86p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- MERCIER, Y.; GATELLIER, P.; VIAU, M.; REMIGNON, H.; RENERRE, M. Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Science*, v. 48, p. 301-318, 1998.
- MERCK Index. *Encyclopedia of chemicals, drugs, and biological*. 10. ed. Rahway: Merck & Co. Inc., 1983.1463p.
- MILOVIC, V. Polyamines in the gut lumem: bioavailability and biodistribution. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 13, p. 1021-1025, 2001.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, v. 24, p. 184-197, 2005.
- MONTGOMERY, D.C. *Design and analysis of experiments*. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, INC, 2001. 699p.
- MORET, S.; CONTE, L.S. High performance liquid chromatographic 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, p. 363-369, 1996.
- MOREY, K.S., HANSEN, S.P., BROWN, W.D. Reaction of hydrogen peroxide with myoglobins. *Journal of Food Science*, v.38, n.7, p.1104-1107, 1973.
- MORUZZI, G.; CALDARERA, C. M. Occurrence of polyamines in the germs of cereals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 105, p. 209-210, 1964.

- NAGATSU, T. Genes for human catecholamine-synthesizing enzymes. *Neuroscience Research*, v. 12, n. 2, p. 315-345, 1991.
- NAHUM, A.; HORVATH, C. Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 203, p. 53-63, 1981.
- NEWTON, G.L.; AGUILERA, J.A.; WARD, J.F.; FAHEY, R.C. Effect of polyamine induced compaction and aggregation of DNA on the formation of radiation-induced strand breaks: quantitative models for cellular radiation damage. *Radiation Research*, v. 148, p. 272–284, 1997.
- NICOLA, M. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 21, p. 291–295, 1996.
- OGAWA, H.; TSUJI, H.; SETO, A. Synergistic effect of spermine on antioxidation of polyunsaturated oil. *Journal of Japan Oil Chemists Society*, v. 45, n. 12, p. 1327-1332 1996. (Resumo).
- OKAMOTO, A.; SUGI, E.; KOIZUMI, Y.; YANAGIDA, F.; UDAKA, S. Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 61, n. 9, p.1582–1584, 1997.
- OLSEN, R.E.; LØVAAS, E.; LIE, O. The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids, α -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress in juvenile *Arctic char*, *Salvelinus alpinus* (L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 20, n. 1, p.13–29, 1999.
- OUANNES, C.; WILSON, T. Quenching of singlet oxygen by tertiary aliphatic amines effect of DABCO o. *Journal of the American Chemical Society*, v 90, n. 23, p. 6527, 1968.
- OXIDAÇÃO e antioxidantes. Disponível em: < http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/oxid_antiox.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2011.
- PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. *Ciência Higiene e Tecnologia da Carne*. 2.ed. v. 2. Goiânia: UFG, 2006. 624p.
- PAVLOVIC, D.D.; UZUNOVA, P.; GALABOVA, T.; PENEVA, V.; SOKOLOVA, Z.; BJELAKOVIC, G.; RIBAROV, S. Polyamines as modulators of lipoperoxidation. *General Physiology and Biophysics*, v. 11, p. 203-211, 1992.
- PECHANEK, U.; BLAICHER, G.; PFANNHAUSER, W.; WOIDICH, H. Application of column (HPLC) to special problems in food chemistry – a laboratory note. *Chromatographia*, v. 13, p. 421-427, 1980.

- PEGG, A.E.; SEELY, J.E.; PÖSÖ, H.; DELLA RAGIONE, F. ZAGON, I.A. Polyamine biosynthesis and interconversion in rodent tissues. *Federation Proceedings*, v. 41, n. 14, p. 3065-3072, 1982.
- PEGG, R.B.; SHAHIDI, F. Off flavors and rancidity in foods. In: NOLLET, L.M.L. (Ed.) *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*. New York: Blackwell, 2005. p. 217-228.
- PÉREZ, M.P.; PALACIO, J.; SANTOLARIA, M.P.; ACEÑA, M.C.; CHACÓND, G.; VERDE, M.T.; CALVO, J.H.; ZARAGOZA, M.P.; GASCÓN, M.; BELENGUER, S. G. Influence of lairage time on some welfare and meat quality parameters in pigs. *Veterinary Record*, v.33, p.239-250, 2002.
- PINHO, R.A.; ANDRADES, M.E.; OLIVEIRA, M.R.; PIROLA, A.C.; ZAGO, M.S.; SILVEIRA, P.C.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biology International*, v.30, n.10, p.848-853, 2006.
- RANDERATH, K. Alcalóides, aminos y otras combinaciones alcalinas. In: *Cromatografía de capa fina*. Bilbao: Ediciones Urmo, 1969. p. 93-113.
- RIDER, J.E.; HACKER, A.; MACKINTOSH, C.A.; PEGG, A.E.; WOSTER, P.M.; CASERO JR, R. A. Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids*, v. 33, p. 231–240, 2007.
- ROSS, J.H. 2,6-Dichloroquinone 4-Chloroimide as a reagent for amines and aromatic hydrocarbons on thin-layer chromatograms. *Analytical Chemistry*, v. 40, n. 14, 1968.
- RUSTENBECK, I.; LØPTIEN, D.; LENZEN, S. Degradation of dansyl polyamines on high-performance thinlayer chromatographic plates, *Journal of Chromatography B Biomedical Applications*, v. 667, p. 185-187, 1995.
- SANTIAGO-SILVA, P.; LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M.B.A. Functional potential of tropical fruits in respect to free bioactive amines. *Food Research International*, v. 44, p. 1264-1268, 2011.
- SANTOS, W.C.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; GLORIA, M.B.A. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*, v.81, p. 595-606, 2003.
- SASAKI, S.; OHTA, T.; DECKER, E.A. Antioxidant activity of water-soluble fractions of salmon spermary tissue. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 44, p. 1682-1686, 1996.

- SAVA, I.G.; BATTAGLIA, V.; ROSSI, C.A.; SALVI, M.; TONINELLO, A. Free radical scavenging action of the natural polyamine spermine in rat liver mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 41, p. 1272–1281, 2006.
- SEILER, N.; DECKARDT, K. Determination of amines and aminoacids in sugar containing samples by dansylation. *Journal of Chromatography*, v. 107, p. 227-229, 1975.
- SEILER, N. Identification and quantitation of amines by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 63, p. 97-112, 1971.
- SEILER, N. Polyamines. *Journal of Chromatography*, v. 379, p. 157-176, 1986.
- SEILER, N.; RAUL, F. Polyamines and apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 9, p. 623-642, 2005.
- SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, v. 32, p. 307–326, 2000.
- 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. Changes in biogenic amine in mature and germinating legume seeds and their behaviour during cooking. *Nahrung*, v. 44, n. 1, p. 23–27, 2000.
- SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 29, n. 2-3, p. 213-231, 1996.
- SILVA, C.M.G.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1 °C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry*, v. 78, p. 241-248, 2002.
- SILVA, F.A.M. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, n. 1, 1999.
- SILVA, P.S. Filmes antioxidantes incorporados com poliaminas na conservação de carne suína cozida. Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. 2010. (Tese, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SLOCUM, R.D.; FLORES, H.E.; GALSTON, A.W.; WEINSTEIN, L.H. Improved Method for HPLC Analysis of Polyamines, Agmatine and Aromatic Monoamines in Plant Tissue. *Plant Physiology*, v. 89, p. 512-517, 1989.
- SMITH, T. A. Amines in food. *Food Chemistry*, v. 6, n. 3, p. 169 - 200, 1981.
- SMITH, T.A. Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 36, p. 117-143, 1985.
- SMITH, T.K.; MOGRIDGE, J.A.L.; SOUZADIAS, M.G. Growth promoting potential and toxicity of spermidine, a polyamine and biogenic amine found in foods and feedstuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 44, p. 518- 521, 1996.

- SODA, K.; DOBASHI, Y.; KANO, Y.; TSUJINAKA, S.; KONISHI, F. Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Experimental Gerontology*, v. 44, p. 727-732, 2009.
- SOLOMONS, T.W.G. As aminas. In: *Química Orgânica*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1983, v. 3, p. 849-886.
- SOUZA, R.M. Aminas bioativas em ração e seus efeitos sobre o desempenho e deposição em tecidos de frangos. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 2003, 61p. (Tese, Doutorado em Ciência Animal).
- STAHL, E. *Thin Layer Chromatography: a laboratory handbook*. 2. ed. New York: Springer Verlag Berlin, 1969, 1041p.
- STARKE-REED, P.E., OLIVER, C.N. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Archive of Biochemistry and Biophysic*, v. 275, p. 559–567, 1989.
- TABOR, H.; TABOR, C.W.; ROSENTHAL, S.M. Biochemistry of polyamines - spermidine and spermine. *Annual Review of Biochemistry*. v. 30, p. 579-604, 1961.
- TADOLINI, B.; CABRINI, L.; LANDI, L.; VARINI, E.; PASQUALINI, P. Polyamine binding to phospholipid-vesicles and inhibition of lipid-peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.122, p. 550-555, 1984.
- TADOLINI, B.; CABRINI, L.; LANDI, L.; VARINI, E.; PASQUALINI, P. Polyamine binding to phospholipid-vesicles and inhibition of lipid-peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.122, p. 550-555, 1984.
- TAKLE, H.W.; MOERKOERE, T. Spermine enhancement of food shelf life. WO 147214. 04 dez. 2008. 20p.
- TAMIN, N.M.; BENNETT, L.W.; SHELLEM, T.A.; DOERR, J.A. High performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in poultry carcasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p.5012-5015, 2002.
- TANG, W.; NEWTON, R.J. Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation*, v. 46, p. 31-43, 2005.
- THEODORO, K.H. Teor de aminas bioativas como indicador da qualidade de fígado bovino para alimentação humana. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2003. 86p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- THRAL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1 ed. São Paulo: Roca, 2006. 582p.

- TIL, H.P.; FALKE, H.E.; PRINSEN, M.K.; WILLEMS, M.I. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 35, p. 337-348, 1997.
- TOUSOULIS, D.; ANDREOU, I.; ANTONIADES, C.; TENTOLOURIS, C.; STEFANADIS, C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, v. 201, p. 236-247, 2008.
- USDA (United States Department of Agriculture) Crop production reports. 2010. Disponível em: <<http://www.nass.usda.gov/QuickStats/index2.jsp>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2011.
- VALERO, D.; MARTINEZ-ROMERO, D.; SERRANO, M. The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. *Trends in Food Science and Technology*, v.13, p. 228–234, 2002.
- VALE, S. R.; GLÓRIA, M. B. A. Determination of biogenic amines in cheese. *Journal of AOAC International*, v. 80, n. 5, p. 1006–1012, 1997.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VENDEMIALE G, GRATAGLIANO I, CARUSO ML, SERVIDDIO, G.; VALENTINI, A.M.; PIRRELLI, M.; ALTOMARE, E. Increased stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon alfa. *Toxicology and Applied pharmacology*, v.175, p.130– 139, 2001.
- VENTANAS, S.; ESTEVEZ, M.; TEJEDA, J. F.; RUIZ, J. Protein and lipid oxidation in Longissimus dorsi and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Science*, v. 72, p. 647-655, 2006.
- WHITE, P.J. Conjugated diene, anisidine value and carbonyl values analyses. In: WARNER, K.; ESKIN, N.A.M. (Ed.) *Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods*. Chicago: AOCS Press., 1995. p. 159-178.
- WANG, L. C. Polyamines in soybeans. *Plant Physiology*, v. 50, p. 152-156, 1972.
- WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENING, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. v.44, p. 381-386, 2004.

- WETTLAUFER, S.C.; WEINSTEIN, L.H. Quantitation of polyamines using thin-layer chromatography and image analysis. *Journal of Chromatography*, v. 441, n. 2, p. 361-366, 1988.
- YAMAMOTO, S.; ITANO, H.; KATAOKA, H.; MAKITA, M. Gas-liquid chromatographic method for analysis of di- and polyamines in foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 30, n. 3, 1982.
- 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.
- ZOTOV V I, MANKOVICH L, LEONID M, IVANOVICH Z V. Rectifying plant for tertiary amines purification. Patent assignee: NEDD MARKETING SA. Derwent Primary Accession Number: 2004-266596 [42], 2007.
- ZOUMAS-MORSE, C.; ROCK, C. L.; QUINTANA, E. L.; NEUHouser, M. L.; GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. Development of a polyamine database for assessing dietary intake. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 107, p. 1024–1027, 2007.

ANEXO A

Food Chemistry 131 (2012) 1355–1359



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Bioactive amines in fresh, canned and dried sweet corn, embryo and endosperm and germinated corn

Cecília Muller Bandeira, Warley Pinheiro Evangelista, Maria Beatriz Abreu Gloria*

LBqA – Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2011
Accepted 30 September 2011
Available online 7 October 2011

Keywords:

Polyamines
Corn
Embryo
Endosperm
Germination
HPLC

ABSTRACT

The types and levels of free bioactive amines in different corn products were determined. The amines were analyzed by ion pair-HPLC, post-column derivatization with *o*-phthalaldehyde and fluorimetric detection. Fresh sweet corn contained mainly spermidine followed by putrescine. Spermine, cadaverine, phenylethylamine, histamine and agmatine were also present at low levels. The profile and levels of amines changed significantly in canned and dried corn. Putrescine was the prevalent amine in canned corn whereas spermine was prevalent in dried corn. Germinated corn had significantly higher spermidine, spermine and putrescine levels. The embryo of the corn contained significantly higher spermine levels compared to the endosperm. These results indicate that corn is a good source of polyamines and that the different types of corn products available can be used to provide a profile of amines according to specific dietary need.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Maize (*Zea mays* L.), commonly known as corn, is a cereal widely used in human food and animal feed. The world production is 793 million tonne, whereas 52 million tonne is produced in Brazil. Of the total Brazilian production, 30% is used for human consumption with a large diversity of products available in the market. The most commonly used corn products in Brazil are sweet corn either fresh or canned and dried grain, available as different types of flour (IBGE, 2010; USDA, 2010).

Corn can supply several nutrients and energy in the diet. In addition, corn is considered to be a good source of polyamines, which are part of a larger group of biologically active substances, called bioactive amines (Gloria, 2005). The polyamines spermidine and spermine are essential for living cells, playing important roles in various physiological functions (Kalač & Krausová, 2005; Valero, Martínez-Romero, & Serrano, 2002). They modulate and promote growth (Bardócz, 1995). They are involved in the synthesis of DNA, RNA and protein and in the stabilization of cell membranes (Moinard, Cynober, & Bandt, 2005). They also promote the renewal and functionality of the digestive tract and maturation of the intestinal mucosa (Bardócz, 1995; Janicka-Russak, Kabala, Młodzinska, & KŁobus, 2010; Moinard et al., 2005). Furthermore, they have antioxidant and anti-inflammatory properties (Gaboriau, Vaultier, Moulinoux, & Delcros, 2005; LØvaas & Carlin, 1991).

Corn can also be a source of biogenic amines. Some biogenic amines can be naturally present in corn whereas others can be

introduced during production, processing and storage. They can be formed by thermal or microbial decarboxylation of amino acids and may be used as an index of quality or hygienic conditions of products. These amines, at low concentrations, can play important roles in growth and protection of plants against predators and environmental factors. In the diet of animals, these amines can act as vaso- and neuro-active substances; however, at high concentrations some amines can be hazardous to human health (Bardócz, 1995; Gloria, 2005).

Therefore, the presence of corn in the diet can be advantageous due to the several functional and health promoting properties associated with polyamines and other amines. However, little information is available regarding the types and levels of amines in the different corn products available in the market.

Recently, the consumption of germinated or sprouted corn (from seed germination) is becoming popular. Germinated corn and its flour have been widely used for breads, some types of pasta and also beer brewing (Arasaratnam, Mylvaganam, & Balasubramaniam, 1998; Frías et al., 2007). Germination is the practice of soaking and draining the seeds until they germinate. It is a very efficient way to increase the nutritive value and the digestibility of seeds (Modgil, Joshi, Gupta, Verma, & Anand, 2009). During germination, natural starches are converted into digestible and simple sugars. Therefore, breads, flours, and pastas produced with sprouted grains are more digestible. Furthermore, they contain higher levels of carotenes, B vitamins and enzymes. The germination process can also remove naturally occurring toxins (Prodanov, Sierra, & Vidal-Valverde, 1997).

According to Gloria, Tavares-Neto, Labanca, and Carvalho (2005), germinated vegetables can contain higher levels of

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34096926; fax: +55 31 3409 6911.
E-mail address: mbeatriz@ufmg.br (M.B.A. Gloria).

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 5/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da atividade antioxidante da espermina in vivo**", que tem como responsável(is) **Maria Beatriz Abreu Glória**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **24/ 03/2010**.

Este certificado expira-se em **24/ 03/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 5/2010**, related to the project entitled "**In vivo evaluation of the antioxidant activity of spermine**", under the supervisors of **Maria Beatriz Abreu Glória**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 24, 2010**.

This certificate expires in **March 24, 2015**.

Belo Horizonte, 31 de Março de 2010.

Luís A. M. Ferraz
pl **Prof. Humberto Pereira Oliveira**
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)