



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



ESTUDO DA ADIÇÃO DO URUCUM E ERITORBATO DE SÓDIO SOBRE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNE SUÍNA

BRUNO CHACON DE FIGUEIRÊDO

Químico industrial

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. NEURA BRAGAGNOLO

Orientadora

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP**

F469e Figueiredo, Bruno Chacon de
Estudo da adição do urucum e eritorbato de sódio sobre a oxidação
lipídica em carne suína / Bruno Chacon de Figueiredo . -- Campinas,
SP: [s.n], 2010.

Orientador: Neura Bragagnolo
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Oxidos de colesterol. 2. Oxidação lipídica. 3. Carne suína. 4.
Ácidos graxos - Composição. 5. Antioxidantes. I. Bragagnolo,
Neura. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Study of the addition of annatto and sodium erythorbate on lipid oxidation
In pork meat

Palavras-chave em inglês (Keywords): Cholesterol oxides, Lipid oxidation, Pork meat,
Fatty acid composition, Antioxidants

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Neura Bragagnolo
Lilian Regina Barros Mariutti
Monica Renata Mazalli

Data da Defesa: 27/08/2010

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimento

COMISSÃO EXAMINADORA

**Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por
Bruno Chacon de Figueiredo aprovado pela comissão julgadora em
27/08/2010**

**Profa. Dra Neura Bragagnolo
(Orientadora)**

**Dra. Lilian R. B. Mariutti
(LANAGRO/MAPA)**

**Prof. Dra. Mônica R. Mazalli
(USP-PIRASSUNUNGA)**

**Dra. Sueli R. Baggio
(ITAL)**

**Prof. Dr. Renato Grinaldi
(DTA - UNICAMP)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo por ter me conduzido para este caminho.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe Helena Cristina, que sempre me apoiou. Ao meu pai Lauro por sempre ter acreditado em mim, a minha avó Leni Chacon por todo carinho e conforto.

Aos meus irmãos Ythallo e Victor que fazem parte da minha vida.

Agradeço a minha orientadora, professora Neura pela paciência e confiança em minha capacidade. Meus profundos agradecimentos a comissão examinados por todas as sugestões e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho. A professora Adriana Mercadante pelos ensinamentos. A todo pessoal do laboratório, Renata, Fabíola, Gislaine, Lilian, Poliana, Fernanda, Elaine, Galega, Walkíria, Renan, Eliseu, Naira, Aline, Milena, Isabela, Adelia, Rosemar, Karla pelo aprendizado e ótimo ambiente de trabalho.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa e a Fapesp pelo apoio financeiro.

Aos amigos e familiares não citados, mas igualmente merecedores da minha gratidão.

Não é a força,
mas a constância dos bons resultados
que conduz os homens à felicidade.

“Friedrich Nietzsche”

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Lipídios	3
2.2. Oxidação lipídica	4
2.3. Efeitos biológicos dos óxidos de colesterol	8
2.4. Antioxidantes	10
2.5. Eritorbato de sódio	12
2.6. Urucum	13
2.7. Teores de lipídios, ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol em carne suína	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. MATERIAL	19
4.1.1. Preparo das amostras	19
4.1.2 Reagentes	20
4.2 MÉTODOS	21
4.2.1. Determinação simultânea de óxidos de colesterol e colesterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	21
4.2.2. Quantificação de bixina em carne suína adicionada de urucum	23
4.2.3. Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico	24
4.2.4. Determinação do teor de lipídios totais e umidade	24

4.2.5. Determinação dos ácidos graxos	25
4.2.6. Análise estatística	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Desenvolvimento de metodologia e validação para determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol	26
5.1.1. Validação da metodologia	32
5.2 Teores de bixina nas amostras.....	34
5.3. Teores de umidade e lipídios totais	36
5.4. Composição de ácidos graxos	39
5.5. Quantificação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol.....	44
5.6. Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico	49
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	53

LISTA DE ABREVIações

7-ceto: 7-cetocolesterol

20 α -OH: 20 α -hidroxicolesterol

22R-OH: 22R-hidroxicolesterol

22S-OH: 22S-hidroxicolesterol

25S-OH: 25S-hidroxicolesterol

25R-OH: 25R-hidroxicolesterol

α -EP: α -epoxicolesterol

β -EP: β -epoxicolesterol

7 β -OH: 7 β -hidroxicolesterol

7 α -OH: 7 α -hidroxicolesterol

ABPICS: associação brasileira dos produtores e importadores de carne suína

AG: ácido graxo

AGI: ácidos graxos insaturados

AGM: ácidos graxos monoinsaturados

AGP: ácidos graxos poli-insaturados

AGS: ácidos graxos saturados

BHA: butilhidroxianisol

BHT: butilhidroxitolueno

BS: base seca

BU: base úmida

CON: amostras controle

EMAG: éster metílico de ácido graxo

EPA: ácido eicosapentaenoico

ERI: amostras adicionadas de eritorbato de sódio

EU: amostras adicionadas de eritorbato de sódio e urucum

MDA: malonaldeído

TBARS: substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico

TBHQ: terc-butil hidroquinona

URU: amostras adicionadas de urucum

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do colesterol.....	4
Figura 2 - Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica.....	5
Figura 3 - Oxidação do colesterol via radical livre.....	7
Figura 4 - Estrutura do eritorbato de sódio.....	12
Figura 5 - Fruto do urucuzeiro (<i>Bixa orellana</i>).....	14
Figura 6 - Estrutura da bixina e norbixina.....	15
Figura 7 – Fluxograma de extração do colesterol e óxidos de colesterol.....	22
Figura 8 - Curva de contorno para o colesterol (a) e recuperação do 7-cetocolesterol (%) (b).....	31
Figura 9 – Superfície de resposta para o colesterol (a) e recuperação do 7-cetocolesterol (%) (b).....	31
Figura 10 – Teores de bixina em lombo suíno adicionado de urucum e urucum + eritorbato de sódio armazenadas a -18º C por 120 dias e submetidas a tratamento térmico.....	36
Figura 11 – Umidade (g/100g) em lombo suíno armazenadas a -18º C por 120 dias e submetidas a tratamento térmico.....	37
Figura 12 – Teores de colesterol (mg/100g) em lombo suíno cru com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenadas a -18º C por 120 dias.....	46
Figura 13 – Teores de colesterol (mg/100g) em lombo suíno com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenadas a -18º C por 120 dias e submetidas a tratamento térmico.....	46
Figura 14 – Teores de TBARS (µmol de malonaldeído/kg de carne, base seca) em lombo suíno com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenadas a -18º C por 120 dias e submetidas a tratamento térmico.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado 2^{6-2}	27
Tabela 2: Estimativa dos efeitos na recuperação de 7-cetocolesterol (%) no planejamento 2^{6-2}	27
Tabela 3: Estimativa dos efeitos no colesterol no planejamento 2^{6-2}	28
Tabela 4: Matriz do DCCR e resultados de recuperação 7-cetocolesterol (%) e colesterol.....	29
Tabela 5: Coeficientes de regressão para colesterol (mg/100g) para o planejamento DCCR.....	29
Tabela 6: Coeficientes de regressão para recuperação do 7-cetocolesterol (%) para o planejamento DCCR.....	30
Tabela 7: Valores otimizados do planejamento experimental.....	31
Tabela 8 Valores de recuperação ($\mu\text{g/mL}$).....	33
Tabela 9. Limites de detecção e quantificação para colesterol (mg/mL) e óxidos de colesterol ($\mu\text{g/mL}$).....	34
Tabela 10: Teores de bixina ($\mu\text{g/g}$) em carne suína adicionada de urucum e urucum + eritorbato de sódio estocadas sob congelamento por 120 dias e subsequente tratamento térmico.....	35
Tabela 11: Umidade (g/100g) em lombo suíno com adição e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio estocado ao longo 120 dias e submetido ao tratamento térmico.....	37
Tabela 12: Lipídios totais g/100g (base seca) em carne suína crua e submetida a tratamento térmico tempo zero.....	38
Tabela 13: Composição de ácidos graxos mg /100g em lombo suíno cru e grelhado no tempo zero.....	40
Tabela 14: Composição de ácidos graxos (mg /100g, base seca) em lombo suíno cru com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio e submetido a tratamento térmico no tempo zero.....	41

Tabela 15: Composição de ácidos graxos (mg /100g, base seca) em lombo suíno cru com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio no início e final de estocagem.....	42
Tabela 16: Teores de colesterol (mg/100g, base úmida) em lombo suíno cru com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenado a -18º C durante 120 dias.....	45
Tabela 17: Teores de colesterol (mg/100g, base úmida) em lombo suíno grelhado com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenado a -18º C durante 120 dias.....	45
Tabela 18: Teores de colesterol (mg/100g de carne, base seca) em lombo suíno com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenado a -18º C durante 120 dias e submetido a tratamento térmico.....	47
Tabela 19: Colesterol (base seca) em carne suína crua e submetida a tratamento térmico tempo zero de armazenamento.....	47
Tabela 20: Teores de 7-cetocolesterol (µg/g de carne, base úmida e base seca) em lombo suíno cru e grelhado, armazenados a -18º C durante 120 dias.....	48
Tabela 21: Resultados de TBARS (µmol de malonaldeído/ Kg de carne, base úmida) em lombo suíno com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenados a -18º C e posteriormente grelhado.....	50
Tabela 22: Resultados de TBARS (µmol de malonaldeído/ Kg de carne, base seca) em lombo suíno com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenados a -18º C e posteriormente grelhado.....	50

RESUMO

A carne suína é a carne mais consumida em todo o mundo e seu consumo continua crescendo. A carne suína possui maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados presentes tanto no tecido muscular como no adiposo se comparado à carne bovina e ovina. Considerando a importância de disponibilizar produtos derivados de carne suína com elevada qualidade organoléptica e nutricional o presente trabalho avaliou o efeito da adição do urucum e eritorbato de sódio sobre a oxidação lipídica em carne suína. Para tanto, a carne suína foi moída e dividida em quatro partes. Uma parte foi considerada controle sem adição de antioxidantes e as outras 3 foram adicionados de 0,05% de urucum, 0,1% de eritorbato de sódio e 0,05% de urucum + 0,1% de eritorbato de sódio. De cada parte foram moldados hambúrgueres que foram embalados em filme de polietileno de baixa densidade e estocados em freezer a -18 °C por 120 dias. Nos tempos zero, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento os hambúrgueres foram grelhados a 165 °C por aproximadamente 4 minutos de cada lado ou até que a temperatura interna atingisse 70° C. Para verificar a oxidação lipídica, foram realizadas as determinações de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), óxidos de colesterol e composição de ácidos graxos. Simultaneamente, foi avaliada a estabilidade da bixina nas amostras durante o tempo de estocagem. As avaliações de lipídios totais e composição de ácidos graxos foram realizadas após o preparo e ao término dos 120 dias de estocagem. A quantificação de bixina foi realizada nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 120 dias do armazenamento a -18° C apenas para as amostras que foram grelhadas. As amostras contendo urucum, eritorbato de sódio e urucum + eritorbato de sódio apresentaram baixos valores de TBARS ao longo do armazenamento, sendo significativamente menores que a amostra controle. Os teores de lipídios totais foram maiores nas amostras grelhadas comparado às amostras cruas devido à perda de umidade. Dentre os óxidos de colesterol que podem ser determinados pelo método que foi desenvolvido e validado, foram identificados apenas 5 óxidos de colesterol: 7-

7-cetocolesterol, α -epoxicolesterol, β -epoxicolesterol, 7 α -hidroxicolesterol e 7 β -hidroxicolesterol. Destes, apenas o 7-cetocolesterol e o 7 α -hidroxicolesterol foram quantificados nas amostras controle cru e grelhada durante a estocagem, por causa que os demais estavam abaixo do limite de detecção. Os ácidos graxos predominantes foram: ácido oleico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido esteárico, ácido palmitoleico, os quais representam cerca de 97% do total de ácidos graxos identificados. O tratamento térmico promoveu diminuição nos teores de ácidos graxos mono-insaturados e poli-insaturados. Houve perda significativa de ácidos graxos poli-insaturados durante o armazenamento para todos os tratamentos estudados. A maior porcentagem de perda foi observada para as amostras controle e com urucum, seguidas das amostras contendo eritorbato de sódio e eritorbato de sódio + urucum. Os resultados obtidos para óxidos de colesterol, TBARS e alteração na composição de ácidos graxos confirmam o efeito antioxidante do eritorbato de sódio na carne suína.

Palavras-chave: ácidos graxos, colesterol, óxidos de colesterol, carne suína, bixina, antioxidantes

SUMMARY

This study evaluated the effect of adding annatto and sodium erythorbate on lipid oxidation on pork meat. For this, pork loin was grounded and divided into four portions. One portion served as control without addition of antioxidants and the other three were added 0.05% annatto, 0.1% sodium erythorbate and 0.05% annatto + 0.1% sodium erythorbate. From each portion, patties were molded and packed in films of low density polyethylene and stored at -18 °C for 120 days. At zero, 30, 60, 90 and 120 days of storage, the patties were grilled at 165 °C for approximately 4 minutes each side. Measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the determination of cholesterol oxides and fatty acid composition were performed to verify the oxidation. Simultaneously, the stability of bixin was evaluated during storage. Assessments of total lipids and fatty acids composition were carried out at day zero and after 120 days of storage. Bixin quantification was carried out at 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 and 120 days of storage at -18 °C only in grilled meat. The samples containing annatto, sodium erythorbate and annatto + sodium erythorbate showed low TBARS values during storage, being significantly lower content than the control sample during the 120 days. The total lipids content was higher in the grilled than in the raw samples due to moisture loss. Five cholesterol oxides were identified: 7-ketocholesterol, α -epoxycholesterol, β -epoxycholesterol, α -hydroxycholesterol, β -hydroxycholesterol. Only 7-ketocholesterol and 7 α -hydroxycholesterol were quantified in control samples and increased with storage time and thermal treatment. The predominant fatty acids were 18:1n-9, 16:0, 18:2n-6, 18:0 and 16:1n-7, representing about 97% of the total fatty acids identified. The thermal treatment resulted in a significant decrease in the level of monounsaturated fatty acid and polyunsaturated fatty acid. There was significant loss of polyunsaturated fatty acid during storage for all treatments. The highest percentage of loss was observed for the control and with annatto samples, followed by samples containing sodium erythorbate and sodium erythorbate + annatto. The results obtained for oxides of cholesterol, TBARS and changes in

fatty acid composition confirm the antioxidant effect of sodium erythorbate in pork meat.

Key-words: fatty acids, cholesterol, cholesterol oxides, pork meat, bixin, antioxidants

1. INTRODUÇÃO GERAL

A carne suína é a carne mais consumida em todo o mundo e seu consumo continua crescendo. O Brasil está entre os 10 maiores produtores e ocupa o quarto lugar como exportador e consumidor. No período de janeiro a julho de 2009, o Brasil exportou 342,59 mil toneladas, que gerou uma receita de US\$ 638,58 milhões, representando um crescimento de 4,83 % em volume em relação ao mesmo período de 2008 (ABIEPCS, 2009). A suinocultura é uma importante atividade econômica principalmente no sul e sudeste do país. O plantel suíno brasileiro é de 30 milhões de cabeças gerando uma produção de 3 milhões de toneladas de carne, geração de 630 mil empregos diretos e indiretos, investimentos no campo e na indústria de R\$ 9 bilhões. Em adição, gera uma receita de R\$ 84 bilhões, sendo R\$ 30,4 bilhões no mercado interno, R\$ 2,6 bilhões no mercado externo, R\$ 51,6 bilhões na distribuição e no varejo, é uma importante atividade econômica, principalmente no Sul e Sudeste do país. A Rússia continua sendo o maior alvo das exportações de carne suína brasileira, seguida de Hong Kong e Ucrânia (USDA, 2009).

A suinocultura brasileira não se destaca apenas pelo grande volume de exportações de carcaça, mas também de produtos curados e prontos para o consumo, que vem ganhando cada vez mais espaço no mercado mundial. Estes produtos devem ser manufaturados de forma a assegurar uma vida de prateleira prolongada, sendo necessário o emprego de técnicas de conservação e o uso de aditivos com intuito de preservar suas características organolépticas.

A diminuição da temperatura como método de preservação de alimentos é um processo importante na indústria de alimentos, pois pode retardar as reações químicas e enzimáticas que promovem a degradação do produto. O congelamento de produtos processados visa períodos de estocagem prolongados, necessários para distribuição dos alimentos para as regiões distantes das áreas de produção (SILVA, 2000). Em produtos congelados, a oxidação lipídica é uma das maiores causas da deterioração, sendo responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis

tornando os alimentos impróprios para consumo. Além disso, pode provocar outras alterações que irão afetar a qualidade nutricional devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais e também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos e óxidos de colesterol, ambos prejudiciais a saúde humana (BERSET, 1996; RAMALHO, 2006).

A gordura presente no músculo ou no tecido adiposo contribui de forma importante para a qualidade da carne. A carne suína possui maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados presentes tanto no tecido muscular como no adiposo se comparado à carne bovina e ovina, mas a composição dos ácidos graxos presentes nos dois tecidos é extremamente dependente da dieta dos suínos (WOOD et al., 2008). Nos ruminantes, os ácidos graxos poli-insaturados são hidrogenizados a ácidos graxos mono-insaturados e a ácidos graxos saturados através da microbiota do rúmen e apenas uma pequena porção intacta resta disponível para ser incorporado no tecido (RAMIREZ et al., 2005).

Considerando que o colesterol contém uma insaturação em sua estrutura o que o torna muito susceptível à oxidação quando exposto ao ar, a temperaturas elevadas, luz, irradiação, ou a combinação de fatores, alguns desses como o processamento térmico e congelamento podem determinar alterações na composição química originando produtos de oxidação de colesterol, denominados óxidos de colesterol. O interesse sobre os óxidos de colesterol tem aumentado desde que foi sugerido que estão relacionados a efeitos adversos à saúde tais como: inflamações, artrite reumática, citotoxicidade, aterogênese, carcinogênese, alterações das propriedades das membranas celulares (GUARDIOLA et al., 1996) e doenças degenerativas como Parkinson e Alzheimer (IMAO et al., 1998; HINO et al., 1998).

Considerando a importância de disponibilizar produtos derivados de carne suína com elevada qualidade organoléptica e nutricional, o presente trabalho avaliou o efeito do antioxidante sintético eritorbato de sódio e o condimento urucum sobre o colesterol, ácidos graxos e valores de TBARS em carne suína frente à oxidação e consequente formação dos seus produtos da

oxidação provocada pelo armazenamento em freezer e subsequente tratamento térmico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lipídios

Não existe definição exata para o termo lipídio. No entanto, muitos autores referem-se a essas substâncias que se apresentam como ácidos graxos e seus derivados, esteróides, terpenos e ácidos biliares, com propriedades comuns de insolubilidade em água e solúveis em solventes não polares (O'KEEFE, 2002; COULTATE, 2004).

Os lipídios da dieta humana, por muitos anos, foram considerados apenas como fonte de energia e componentes estruturais das membranas celulares. Entretanto, o avanço das pesquisas tem demonstrado o enorme potencial biológico destas moléculas (FAHY et al, 2005).

Aproximadamente 99% dos lipídios encontrados em plantas e animais são compostos por ésteres de ácidos graxos com o glicerol (O'KEEFE, 2002; DEMAN, 1999). Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) reduzem alguns fatores de risco associados às doenças cardiovasculares (DCV) (ERKKILÄ, 2008; CALDER et al, 2004) e possuem efeitos anti-inflamatórios e antitrombolíticos (CONNOR, 2000). Também têm mostrado possuir vários efeitos favoráveis sobre a pressão arterial, ritmo cardíaco, perfil lipídico, agregação plaquetária e função endotelial, podendo ainda reduzir o risco de acidente vascular cerebral isquêmico (HE et al, 2004).

Além disso, os ácidos graxos poli-insaturados n-3 (AGPI n-3) e n-6 (AGPI n-6) são considerados essenciais, na medida em que não são sintetizados pelo organismo humano, devendo ser obtidos exclusivamente através da dieta. A estimativa da composição dos ácidos graxos não é importante apenas para definição dos componentes nutritivos do alimento, mas igualmente para uma determinação exata dos efeitos do processamento que

podem alterar a composição dos lipídios na carne (MURRIETA, HESS e RULE, 2003).

O colesterol é um lipídio-esteróide que apresenta inúmeras funções no organismo, servindo de matéria prima para hormônios, sais biliares e vitamina D₃. Ele também é o constituinte estrutural das membranas celulares, sendo necessário para o crescimento e viabilidade celular, e é o principal esterol dos animais sendo encontrado como traços em alguns vegetais (REISCHE, 2002).

A maior parte do colesterol do organismo, aproximadamente 75 %, origina-se da biossíntese (colesterol endógeno) e apenas 25 % fornecido pela dieta (MILES, 1989). O colesterol possui o esqueleto carbônico do 1,2-ciclopentano-peridrofenantreno, com uma cadeia lateral de 8 átomos de carbono, uma dupla ligação entre os carbonos 5 e 6, e uma hidroxila no carbono 3 (Figura 1).

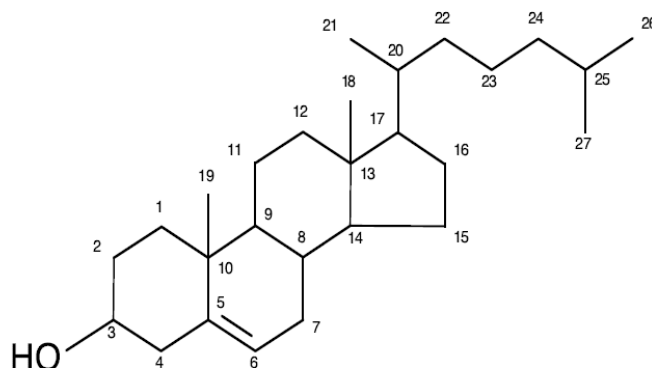


Figura 1 - Estrutura do colesterol

Geralmente, no organismo humano e animal a hidroxila está esterificada com um ácido graxo, principalmente o ácido palmítico (16:0) (NELSON e COX, 2002).

2.2. Oxidação lipídica

A auto-oxidação de lipídios e a geração de radicais livres são fenômenos naturais em sistemas biológicos e alimentos (BERSET, 1996). Existem vários

biomecanismos de defesa envolvendo enzimas e vitaminas antioxidantes protegendo a célula contra danos oxidativos. Embora as defesas antioxidantes endógenas sejam efetivas, não são infalíveis e constantemente existe a formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ROS/RNS) que interagem em diferentes níveis com o ambiente celular antes de serem eliminadas (CERQUIRA et al, 2007)

A sequência de reações de oxidação de lipídios tradicionalmente apresenta três estágios: iniciação, propagação e terminação, as quais estão representadas na Figura 2.

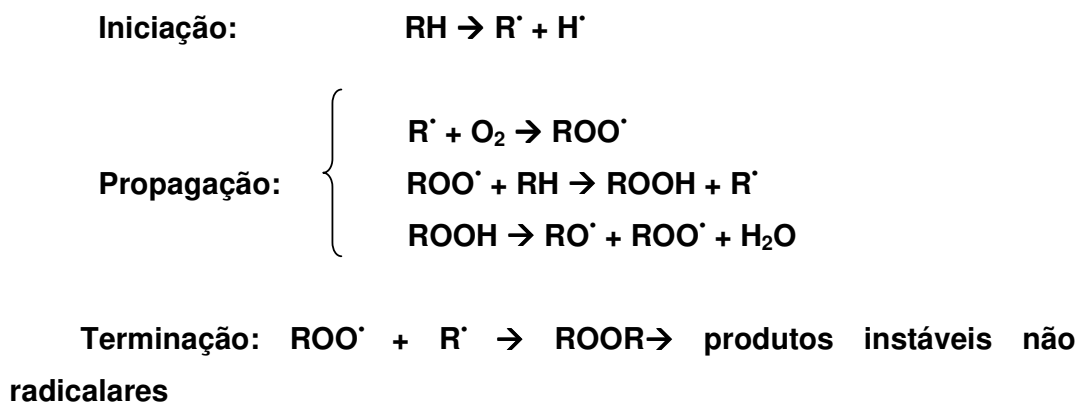


Figura 2 - Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica (adaptado de Ramalho e Jorge, 2006).

A fase de iniciação ocorre com a abstração de um átomo de hidrogênio alílico à dupla ligação na molécula de AGI, através de um iniciador como calor ou metais, gerando um radical livre ($R^{\bullet}$). Durante a propagação, os radicais livres reagem com o oxigênio molecular, formando os radicais peroxila ($ROO^{\bullet}$) e alcóxila ($RO^{\bullet}$), que reagirão posteriormente com outras moléculas de AGI formando hidroperóxidos ($ROOH$), moléculas instáveis que podem se decompor facilmente. Na etapa da terminação ocorrem reações entre os diferentes radicais, com produção de compostos não radiculares e estáveis.

Os hidroperóxidos podem se decompor por meio de diversos esquemas de reações que dependerão do tipo de ácido graxo e da localização do hidroperóxido no ácido graxo. Além disso, os produtos de decomposição

podem ser insaturados, apresentando estruturas pentadieno intactas, o que significa que os produtos de oxidação podem ser oxidados depois. Isso resulta na formação de centenas de produtos diferentes de oxidação de ácidos graxos (MCCLEMENTS e DECKER, 2010). Entre produtos secundários da oxidação, resultantes da decomposição dos hidroperóxidos incluem aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos e alcoóis. Apesar de suas limitações, o método mais usual na avaliação em carnes e produtos cárneos é o teste de TBARS. Este teste quantifica entre outros aldeídos o malonaldeído, um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados (OSAWA et al, 2005).

De acordo com SMITH (1987), a oxidação do colesterol ocorre similarmente à oxidação lipídica, com a abstração de um hidrogênio no C7 e adição de uma molécula de oxigênio, levando a formação do 7 β - ou 7 α -hidroperóxido. Durante o aquecimento e a estocagem, ocorre a redução dos 7-hidroperóxidos aos seus alcoóis correspondentes, 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH) ou 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OH), sendo que o 7 β -OH aparece em maior proporção, pois está na forma equatorial, mais estável em detrimento ao 7 α -OH, forma axial, menos estável (ECHARTE et al., 2003). Entretanto, o 7-hidroperóxido intermediário pode sofrer processo de desidratação, originando o 7-cetocolesterol (7-ceto) (Figura 3).

A epoxidação da dupla ligação do C₅ é uma reação bi-molecular entre o 7-hidroperóxido e outra molécula de colesterol, resultando nos isômeros 5,6 α - e 5,6 β -epoxicolesterol (α -EP; β -EP). Os epóxidos, através da reação de hidratação podem formar colestanoltriol (triol) (SMITH, 1987). A formação dos epóxidos pode também ocorrer por meio das espécies reativas de oxigênio como O₃, H₂O₂ e radicais hidroxilas (HO $\cdot$), peroxilas (ROO $\cdot$), alcóxilas (RO $\cdot$) (ROSE-SALLIN, et al., 1996; GUMULKA et al., 1982). Rose-Sallin et al. (1996), observaram que o 5,6 β -epoxicolesterol prevalece sobre o 5,6 α -epoxicolesterol, provavelmente, devido ao impedimento estérico do grupo OH no C3.

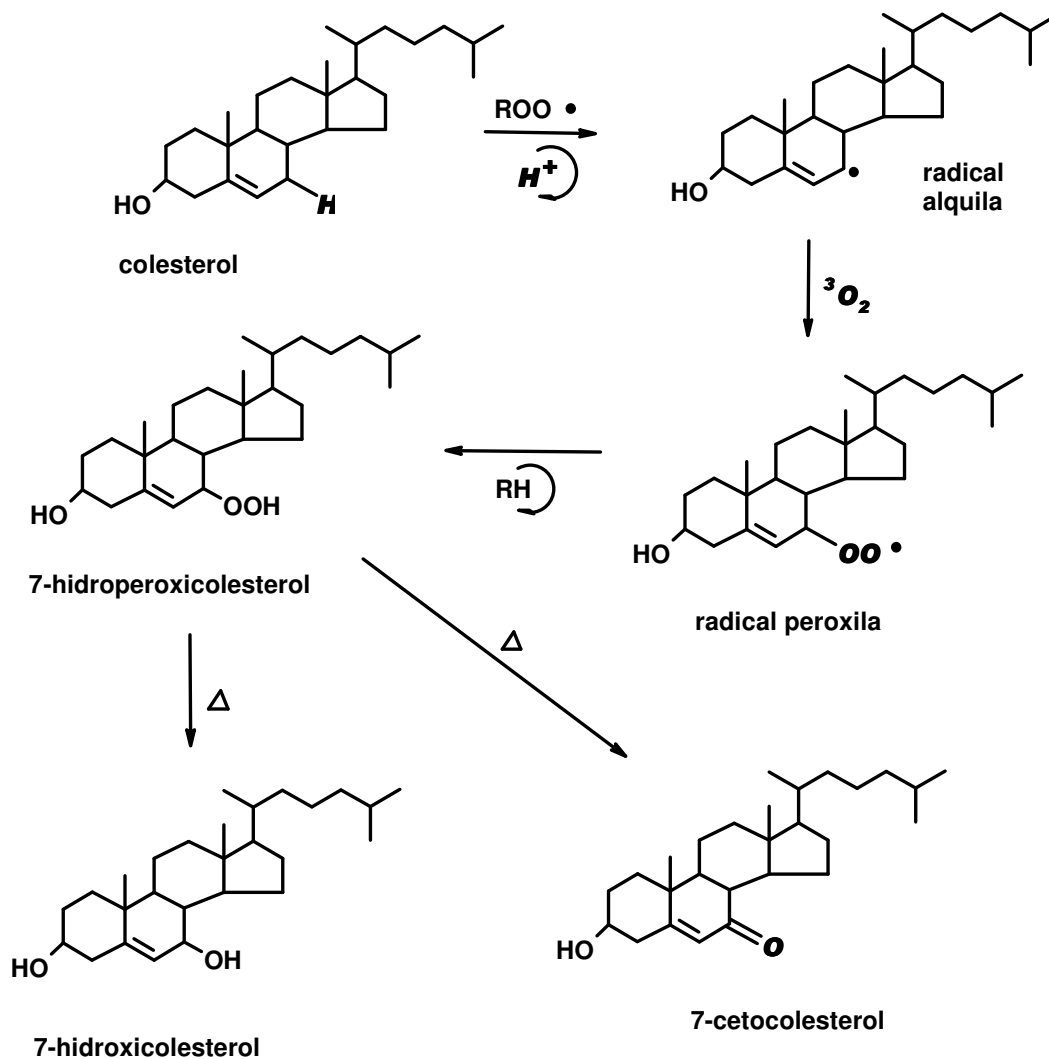


Figura 3 – Mecanismo de oxidação do colesterol via radical livre (adaptado de Smith, 1987).

Em relação à oxidação da cadeia lateral, os carbonos 20 e 25 são carbonos terciários estando desta forma mais suscetíveis ao ataque oxidativo do que os demais carbonos (SMITH, 1987). Entretanto, outros hidroperóxidos podem ser originados a partir da cadeia lateral, formando compostos como 22α e 22β , 24α e 24β , 26 e 26β hidroxicolesterol, que são produzidos quando o colesterol é fortemente oxidado pelo oxigênio, ou através de reações enzimáticas (BRAGAGNOLO, 2008; SMITH, 1987). Estes compostos, por sua vez, podem sofrer quebra das ligações β carbono-carbono da cadeia lateral,

decompondo-se e produzindo substâncias voláteis como acetona, ácido acético e outros esteróis.

Vários pesquisadores têm relatado que alguns métodos de cocção podem aumentar significativamente a oxidação do colesterol, elevando o conteúdo total dos óxidos de colesterol (PIE et al., 1991; LEE et al., 2001; ECHARTE et al., 2003), o tratamento térmico utilizado por alguns desses métodos são capazes de modificar o valor nutricional dos alimentos, em relação ao produto original, através da alteração da composição de ácidos graxos (ECHARTE et al., 2003).

Mais de 80 produtos da oxidação do colesterol foram identificados (TAI et al., 1999). Os mais freqüentemente encontrados em alimentos são o 7-cetocolesterol, 20-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 5,6 α -epóxicolesterol, 5,6 β -epóxicolesterol e colestanol. CHANG et al., 1993 têm apontado que os óxidos de colesterol relacionados ao carbono 7 da molécula do colesterol são predominantes em alimentos como carne, toucinho e leite em pó.

O 7-cetocolesterol ocorre em concentrações relativamente altas em muitos alimentos (PIE et al., 1995; OSADA et al., 1993; GUARDIOLA et al., 1993), variando o conteúdo de acordo com o tipo de matriz (RODRIGUES-ESTRADA, 2000). Em função disso, tem sido proposto seu uso como indicador de oxidação do colesterol (ZUNIN et al., 1995). Embora não estejam estabelecidos os níveis seguros de ingestão de óxidos de colesterol, estes compostos podem ser absorvidos a partir da dieta numa proporção de 6 a 90%, e a exposição crônica pode constituir um risco a saúde humana (BASCOUL et al., 1986), dados aos efeitos potencialmente aterogênicos (GARCIA-CRUISET et al., 2002), citotóxicos, mutagênicos e possivelmente carcinogênicos (SMITH e JOHNSON, 1989; OSADA, 2002; LEONARDUZZI et al., 2002).

2.3. Efeitos biológicos dos óxidos de colesterol

Óxidos de colesterol podem ser absorvidos pelos animais e pelo homem (LINSEISEN, WOLFRAM, 1998a), através do intestino, e incorporados aos

quilomícrons e demais lipoproteínas (PENG et al., 1991; OSADA et al., 1994; VINE et al., 1997a). Os óxidos de colesterol podem substituir o colesterol na membrana celular. Alguns efeitos desta substituição comprometem a fluidez, permeabilidade e estabilidade da membrana celular e provoca mudanças na morfologia da célula e na função da membrana. Óxidos de colesterol afetam a estrutura estereoquímica das proteínas e fosfolipídios, alterando as características da membrana celular (SEVANIAN, PETERSON, 1986; SMITH, JONHSON, 1989). No endotélio, a modificação da permeabilidade vascular permite a passagem de diferentes componentes do plasma, como quilomícrons remanescentes, plaquetas, íons de cálcio e outros íons (PENG et al., 1991).

Os óxidos de colesterol contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose. Os principais efeitos biológicos que relacionam alguns óxidos com a aterogênese são: a modificação da permeabilidade vascular seletiva do endotélio; a inibição da síntese prostaglandina I₂ (PGI₂); a modulação da esterificação, afluência e captação do colesterol, inibição da expressão do receptor de LDL; a formação das células espumosas e o acúmulo de éster de colesterol em células espumosas e macrófagos (SEVANIAN e PETERSON, 1986; GUARDIOLA et al., 1996; LINSEISEN e WOLFRAM, 1998b).

Vários óxidos de colesterol têm sido detectados em quantidades apreciáveis em tecidos e fluidos humanos, incluindo o plasma humano, lipoproteínas e placas ateroscleróticas (BROW; J ESSUP, 1999). Diversos autores têm investigado a relação entre os níveis de óxidos de colesterol no plasma e fatores de risco para doenças cardíacas. Óxidos de colesterol foram encontrados no LDL tornando-a LDL oxidada que exerce um potencial efeito aterogênico e está associada ao acréscimo do risco de doenças coronárias (BERLINER; HEINECKE, 1996). Alguns óxidos como o 26-OH, 7-ceto, 7 α -OH, 7 β -OH, 25-OH, 4 α -OH, 4 β -OH foram encontrados em lesões arteriais e 26-OH, 7-ceto, 7 α -OH, 7 β -OH, β -EP foram quantificados em abundância na LDL oxidada (PATEL et al., 1997).

A citotoxicidade dos óxidos de colesterol estimula o mecanismo de morte celular (apoptose) e a aterogênese. Pesquisas evidenciam que o 7-ceto induz a apoptose na via mitocondrial e em conjunto com o 7 β -OH são hábeis na

indução da apoptose nas células endoteliais, células da musculatura lisa e ocasionam a necrose de fibroblastos (YAO; TABAS, 2000). Ares et al. (2000) relatam que os óxidos produzidos pela oxidação da cadeia lateral como o 25-OH e 26-OH são mais potentes na indução da apoptose do que os epóxidos e o 7β-OH.

2.4. Antioxidantes

O mecanismo mais importante na defesa contra oxidação lipídica é a presença de antioxidantes. A dependência dos sistemas de proteção à oxidação esta altamente associada à integridade do tecido e a ruptura causada pelo processamento de alimentos que anula várias das defesas que estão presentes naturalmente no tecido (BRANER et al., 2002).

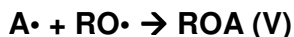
Os antioxidantes são compostos que inibem ou retardam os processos oxidativos, responsáveis pela deterioração dos lipídios, sendo, portanto amplamente utilizados na indústria de alimentos. Considerando que a oxidação lipídica ocorre através de um mecanismo de reação em cadeia de radicais livres, os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu modo de atuação em primários e secundários (REISCHE et al., 2002).

Os antioxidantes primários (AH) controlam a propagação da reação em cadeia, inativando os radicais livres tais como os radicais alquila ($R^\bullet$), alcóxila ($RO^\bullet$), peróxila ($ROO^\bullet$) e outras espécies reativas de oxigênio, como os radicais superóxido ($O_2^\bullet$) e hidroxila ($HO^\bullet$) (reações I, II e III).



A baixa reatividade do radical antioxidante ($A^\bullet$) formado reduz a velocidade das reações de propagação durante a oxidação lipídica. O radical antioxidante também é capaz de participar das reações de terminação reagindo

assim com outros radicais (RAMALHO e JORGE, 2006; REISCHE et al., 2002) (reações IV, V e VI).



Antioxidantes secundários ou preventivos são capazes de controlar a oxidação através de diferentes mecanismos: quelante de metais, inativador de oxigênio singlete, seqüestrador de oxigênio triplete e inativador de sensibilizadores no estado excitado. Os carotenóides são uma classe de compostos que possuem capacidade antioxidante, embora sejam considerados como excelentes inativadores de oxigênio singlete, eles podem atuar também na quebra da cadeia de reação durante a peroxidação lipídica (KOLAKOWSKA, 1991).

Os antioxidantes sintéticos mais amplamente utilizados são butil hidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), propilgalato (PG) e terc-butil hidroquinona (TBHQ), cuja ação consiste na rápida doação de um átomo de hidrogênio para o radical livre. No entanto, devido à tendência atual pela procura de produtos naturais pelos consumidores, causada pela crescente preocupação com a saúde, o uso de condimentos e ervas aromáticas em substituição aos convencionais antioxidantes sintéticos estão sendo estudados (RAMALHO e JORGE, 2006).

Antioxidantes naturais são primariamente extratos de ervas ou plantas com alta concentração de compostos fenólicos com boa capacidade de doação de elétrons e quebra de cadeia reacional (BRANEN et al., 2002). Os condimentos geralmente são adicionados aos alimentos ou como condimentos íntegros ou condimentos moídos ou extratos isolados dos condimentos. Cada uma destas formas pode apresentar diferentes compostos, em quantidades variadas e com diferente capacidade antioxidante. Quando empregados na forma de extratos, os compostos presentes dependem, principalmente, do método de extração e do solvente utilizado (MADSEN e BERTELSEN, 1995).

2.5. Eritorbato de sódio

O ácido eritórbito e o eritorbato de sódio (Figura 4) são estereoisômeros do ácido ascórbico e ascorbato de sódio, capazes de impedir a oxidação através do mecanismo de desativação de oxigênio singlete, doação de átomos de hidrogênio e como agente redutor (REISCHE, 2002). SEPE et al. (2004) avaliaram o efeito do eritorbato de sódio, ácido eritórbito, ascorbato de sódio, ácido ascórbico e ascorbil palmitato com o intuito de retardar a oxidação lipídica e o escurecimento em carne bovina estocada a 4° C (48 horas) e -18°C (14 dias) sendo a oxidação lipídica mensurada através dos valores de TBARS. Os autores verificaram que em geral o eritorbato de sódio e o ascorbato de sódio foram mais efetivos na manutenção da cor enquanto que os valores de TBARS semelhantes aos da amostra controle. O eritorbato de sódio, além de possuir baixo custo quando comparado aos seus isômeros, não interfere no pH natural do alimento após sua adição.

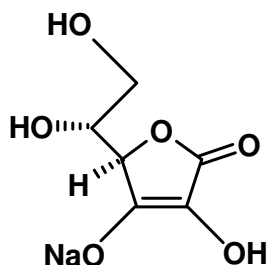


Figura 4 – Estrutura do eritorbato de sódio

Faustman et al. (2006) testaram uma mistura de extrato de alecrim e eritorbato de sódio em carne suína e de peru enriquecidas com ácido graxo poli-insaturado e concluíram, através dos valores de TBARS e determinação de peróxidos, que a combinação de antioxidantes conferiu efeito protetor ao ácido graxo adicionado. Mancini et al. (2007) ao investigar o efeito do eritorbato de sódio e do ácido ascórbico (0%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1,0% ou 1,5%) em *Longissimus lumborum* empacotada em atmosfera com alto teor de oxigênio, concluíram através da avaliação da cor ($L^*a^*b^*$) que o eritorbato de sódio pode ser um substituto eficaz para o ácido ascórbico.

Wilkinson et al. (2001) investigaram a capacidade antioxidante do eritorbato de sódio, tocoferol (uma mistura de α -, β -, γ -tocoferol) e TBHQ em carne de frango fresca e congelada. Os valores de TBARS obtidos indicaram que o eritorbato diminuiu a oxidação lipídica na carne fresca e retardou a oxidação na carne congelada.

Baggio e Bragagnolo (2006) não detectaram a presença de óxidos de colesterol em 7 produtos processados de carne de frango o que foi atribuído ao eritorbato de sódio, descrito na embalagem. Em outro trabalho, Baggio e Bragagnolo (2008) ao analisarem 126 amostras de produtos cárneos bovinos, suínos e mistos encontraram apenas 4 amostras contendo baixos teores de 7-cetocolesterol presumindo a baixa oxidação à presença do eritorbato de sódio presente na composição dos produtos.

2.6. Urucum

O urucum (*Bixa orellana*), também conhecido como 'orlean', 'aquiote', 'annatto', ou 'rocou' é cultivado em vários países tropicais incluindo a Jamaica, México, Filipinas, Brasil, Peru e Quênia (HENRY, 1996) (Figura 5). O extrato de urucum é muito usado como corante em farinhas, doces, produtos cárneos, refrigerantes e em massas (GALINDO-CUSPINERA et al., 2002) e tem sido utilizado na culinária misturado à carne suína, peixe, frango, milho, arroz, manteiga, queijos, produtos de panificação, óleos, sorvetes, cereais e embutidos para dar cor aos alimentos.



Figura 5 – Fruto do urucuzeiro (*Bixa orellana*)

Os principais carotenóides do urucum são a bixina e a norbixina (Figura 6). A bixina que apresenta na sua estrutura 25 carbonos, 9 ligações duplas conjugadas e dois grupos carboxila, sendo um deles esterificado, é o pigmento majoritário presente no extrato de urucum perfazendo 80% dos carotenóides encontrados no urucum. Os carotenóides com mais de nove ligações duplas conjugadas são capazes de desativar o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), sendo que esta capacidade torna-se maior com o aumento do sistema de ligações duplas conjugadas (DiMASCIO; KAISER e SIES, 1989). Os carotenóides também desativam os estados tripletes excitados de sensibilizadores (MONTENEGRO et al., 2004), os quais são responsáveis pela formação de $^1\text{O}_2$ e desativam radicais livres (BOHM et al., 2002).

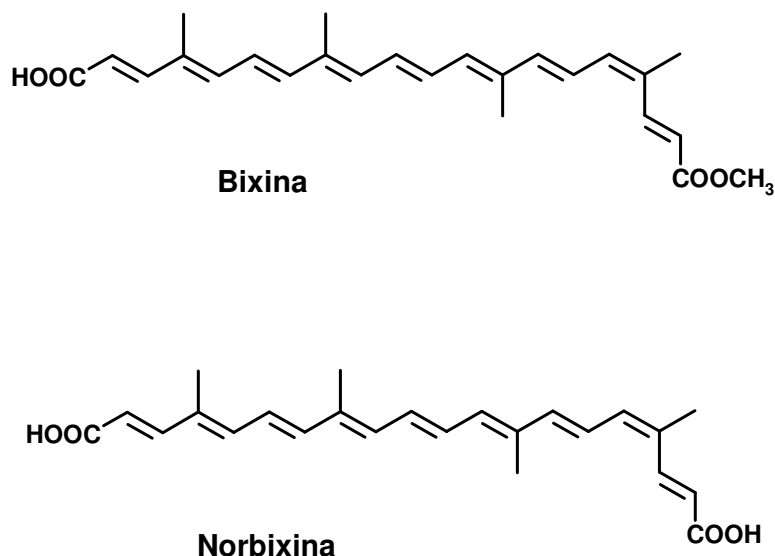


Figura 6 – Estrutura da bixina e norbixina

No estudo de Haila et al. (1996) verificaram que as propriedades antioxidantes da bixina em óleo de colza inibiu a autoxidação, embora outros carotenóides como a luteína e o licopeno não tenham apresentado o mesmo efeito antioxidante. No entanto, na avaliação das propriedades antioxidantes de extrato lipossolúvel de urucum (bixina), extrato hidrossolúvel de urucum (norbixina) e β -caroteno adicionados em óleo de oliva e em emulsão óleo em água armazenados a 60 °C, a norbixina foi o único carotenóide que inibiu a deterioração oxidativa em todas as amostras estudadas. A presença dos grupos carboxílicos na molécula de norbixina pode contribuir para o retardamento da autoxidação através da quelação de íons metálicos pró-oxidantes ou de outras espécies polares iniciadoras (KIOKIAS e GORDON, 2003).

De acordo com Martínez-Tome et al. (2001) extratos de urucum apresentaram boa capacidade antioxidante como sequestradores de diversas formas reativas de oxigênio, o estudo concluiu que em meio aquoso o extrato de urucum apresentou capacidade antioxidante maior que o extrato de alecrim, porém menor que orégano e cominho.

De acordo com Castro et al. (2010), a adição de 0,4% de colorífico (condimento composto de urucum e farinha de milho) em peito de frango foi

suficiente para reduzir a formação de TBARS nas amostras grelhadas (165° C por 4 minutos de cada lado) e durante a estocagem (-18° C por 120 dias) destas amostras, no entanto, não foi verificado o mesmo efeito nas amostras cruas. Além disso, a presença do colorífico foi capaz de manter o teor de vitamina E nas amostras submetidas a tratamento térmico, mas não durante a estocagem da carne grelhada. No entanto, o extrato etanólico de colorífico apresentou baixa capacidade de desativação do radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico) quando comparado aos extratos etanólicos de alecrim e sálvia (MARIUTTI et al., 2008).

2.7. Teores de lipídios, ácidos graxos, colesterol, óxidos de colesterol e alterações causadas pelo processamento e armazenamento em carne suína.

As carnes são constituídas, em geral, por 60 a 80% de água e 15 a 25% de proteína, sendo o restante formado principalmente por gorduras, sais, pigmentos e vitaminas e são alimentos preferidos pela maioria dos consumidores, no entanto, são apontados como alimentos com alto teor de colesterol, gordura e ácidos graxos saturados e baixos níveis de ácidos graxos insaturados (BRAGAGNOLO, 2001).

Os valores de colesterol em carne suína encontrados na literatura variam largamente entre 30 a 81 mg/100g para carne crua e 56 a 113 mg/100g para carne cozida (BRAGAGNOLO e RODRIGUEZ-AMAYA, 1995; SWIZE et al., 1992; HUTCHISON et al., 1987; PIIRONEN et al., 2002). Estas discrepâncias podem ser atribuídas a variação natural das amostras devido a uma série de fatores tais como idade, raça, sistema de alimentação, sexo, localização anatômica, nível de gordura externa e interna, local de criação, sistema de criação, estação do ano e métodos de cozimento (BRAGAGNOLO, 2001). Além disso, o método de análise também pode ser um fator de discrepância.

Csallany et al. (1989) encontraram teores de colesterol de 30 mg/100g para carne suína crua, utilizando um método por HPLC cujo preparo das

amostras consistiu apenas na extração de lipídios pelo método de Folch et al (1957). Echarte et al. (2001) obtiveram teores de 56 mg/100g de colesterol em lombo suíno cru, por cromatografia gasosa. Heymann et al. (1990) utilizando cromatografia gasosa, encontraram teores variando entre 94 a 104 mg/100g para carne suína assada em diferentes temperaturas. Verleyen et al. (2003), encontraram resultados semelhantes aos de Echarte et al. (2001) utilizando métodos enzimáticos de detecção de colesterol. A concentração de colesterol calculada em base úmida tem apresentado valores maiores para carne cozida comparado aos valores de carne crua (ECHARTE et al., 2001; KESAVA RAO et al., 1999; BAGGIO e BRAGAGNOLO, 2006). Como esperado, o tratamento térmico causa redução da umidade das amostras, enquanto aumenta de forma significativa os teores de colesterol. Estudos comparativos entre a carne bovina e a suína não encontraram diferença significativa entre os teores de colesterol (BRAGAGNOLO e RODRIGUEZ-AMAYA, 1995; BOHAC e RHEE, 1988).

De acordo com Monahan (1992), a concentração de óxidos de colesterol em produtos cárneos alcança 1% do total de colesterol, mas dependendo das condições de processamento este valor pode chegar a 10% do total. Vários autores têm avaliado o efeito do tratamento térmico e armazenamento na formação de óxidos de colesterol em carne suína (OSADA et al., 2002; PARK e ADDIS; 1987; PIE et al., 2000). Pie et al. (2000) detectaram um aumento de 150% na concentração de óxidos de colesterol em carne suína moída e frita a 135° C por 10 minutos comparadas com as amostras cruas. Park e Addis (1987) detectaram 7-ceto (259,8 µg/g), 7α-OH (90,9 µg/g), 7β-OH (68,4 µg/g), α-epoxi (12,5 µg/g) e colestanol (28,4 µg/g) em músculo suíno frito e congelado por 3 anos. Osada et al. (2002) encontraram apenas 3 óxidos em pernil suíno assado, sendo 7-ceto (12,04 µg/g), 7β-OH (2,43 µg/g) e α-epoxi (0,83 µg/g).

Os teores de lipídios totais em carne suína variam de acordo com o corte analisado. Segundo Bragagnolo (2001) o lombo apresenta $3,0 \pm 1$ g/100g, pernil $5,0 \pm 3$ g/100g, paleta $5,0 \pm 1$ g/100g e toucinho 83 ± 1 g/100g. O teor médio de ácidos graxos saturados é de 40 ± 2 %, 44 ± 2 % de monoinsaturados e 14 ± 2 % poli-insaturados.

Os suínos, sendo uma espécie monogástrica, são suscetíveis às mudanças na composição de ácidos graxos do tecido adiposo e muscular através da dieta. Em geral, a proporção de ácidos graxos no tecido aumenta linearmente com a sua ingestão dietética (WOOD et al., 2008).

Enser et al. (1996) demonstraram que o tecido adiposo possui uma maior concentração de ácidos graxos quando comparado com o tecido muscular, mas a composição de ácidos graxos nos dois tecidos é a mesma. Suínos possuem maiores concentrações de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA) como o linoleico (18:2n-6) em ambos tecidos do que ovinos. O ácido linoleico é derivado exclusivamente da dieta, ele passa através do estômago dos animais sem sofrer alterações sendo em seguida incorporado à corrente sanguínea pelo intestino. O segundo mais importante PUFA é o ácido linolênico (18:3n-3), que está presente na composição das rações administradas aos animais (WOOD et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar o efeito da adição de eritorbato de sódio e urucum como antioxidantes em lombo suíno, após o tratamento térmico e durante estocagem e quando submetidos ao tratamento térmico através da quantificação do colesterol, óxidos de colesterol e da composição de ácidos graxos.

3.2. Objetivos específicos:

- Otimizar a metodologia analítica para determinação de colesterol e óxidos de colesterol em carne suína através do delineamento experimental;
- Verificar a estabilidade do colesterol em carne suína armazenada a -18°C durante 120 dias e posteriormente grelhada a 165 °C por

aproximadamente 8 min através das análises de colesterol e óxidos de colesterol nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 dias;

- Acompanhar o efeito do urucum e eritorbato de sódio no processo oxidativo da carne suína durante armazenamento, monitorando a formação de óxidos de colesterol, degradação do colesterol e os teores de TBARS;
- Verificar a estabilidade da bixina durante a estocagem através da determinação de bixina;
- Determinar o teor de umidade;
- Determinar o teor de lipídios totais e perfil de ácidos graxos no início e final do tempo de estocagem.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Preparo das amostras

Foram adquiridos 11 kg de lombo suíno fresco no comércio local de Campinas, SP. Após a remoção manual de gordura externa e posterior homogeneização em processador doméstico, a massa foi pesada e dividida em quatro porções. Uma porção foi considerada controle sem adição de antioxidantes e às outras 3 foram adicionados 0,05% de urucum, 0,1% de eritorbato de sódio e 0,05% de urucum + 0,1% de eritorbato de sódio. De cada porção foram fabricados hambúrgueres de aproximadamente 60 ± 2 g que foram embalados em filmes de polietileno de baixa densidade (6 μ m de espessura), revestidos com papel de alumínio e estocados em freezer a -18 °C por 120 dias. Nos tempos zero, 30, 60, 90 e 120 dias os hambúrgueres foram grelhados a 165 °C por aproximadamente 8 minutos, sendo 4 min de cada lado, até que a temperatura interna atingisse 70 °C. O controle da temperatura foi realizado com termômetro de punção digital calibrado (Traceable Long-Stem, VWR). Todas as determinações foram realizadas em triplicata. As

amostras que receberam tratamento térmico foram grelhadas ainda congeladas e as amostras cruas foram descongeladas a temperatura ambiente para realização das análises. Os tratamentos receberam a seguinte codificação: CON - amostra controle, ERI - amostra com adição de 0,1% de eritorbato de sódio, URU - amostra com adição de 0,05% de urucum e EU - amostra com adição de 0,1% de eritorbato de sódio e 0,05% de urucum.

As sementes de urucum foram adquiridas do município de Monte Castelo, São Paulo. Para a obtenção do pó de urucum que foi adicionado à carne suína, 15 g de sementes foram trituradas em moedor de café elétrico (Eastern Eletric, CM 180) e passadas em uma peneira de 100 *mesh*. O eritorbato de sódio monohidratado foi adquirido da empresa SIGMA-ALDRICH (Ref. 496332-250G) 97% de pureza, pesado e adicionado diretamente a carne suína.

4.1.2. Reagentes

Uma mistura de padrões contendo ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG) de 4:0 a 24:0 (FAME Mix C4-C24, Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, EUA e FAME 22:4n-6, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram os padrões utilizados para identificação dos ácidos graxos.

Os padrões internos utilizados para a quantificação foram os ésteres metílicos do ácido tridecanóico (C13:0) e do ácido tricosanoico (C23:0) da marca Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Os solventes, sais, ácidos e reagentes utilizados nas diferentes análises foram de grau analítico das marcas Synth (Diadema, São Paulo) e Merck (Darmstadt, Alemanha). O hexano utilizado para a injeção da amostra no cromatógrafo foi de grau HPLC da Burdick e Jackson (Muskegon, USA).

Os padrões de colesterol (5-colesten-3-ol) e os óxidos de colesterol: 20 α -hidroxicoolesterol, 22S-hidroxicoolesterol, 25-hidroxicoolesterol, 5,6 α -epoxicoolesterol, 5,6 β -epoxicoolesterol e o 7-cetocolesterol foram adquiridos da Sigma (Milford, MA). Os padrões de óxidos de colesterol: 22R-hidroxicoolesterol, 24S-hidroxicoolesterol, 26-hidroxicoolesterol, 7 α -hidroxicoolesterol, 7 β -

hidroxicolesterol e $3\beta,5\alpha,6\beta$ -Colestanotriol foram comprados da Steraloids (Newport, RI). A pureza dos padrões variou de 95 a 98%. O isopropanol e o hexano foram utilizados como fase móvel para determinação do colesterol e óxidos de colesterol grau HPLC, enquanto os demais reagentes utilizados foram grau analítico.

Para análise de lipídios totais foram adquiridos clorofórmio e metanol da marca Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. A análise de TBARS foi realizada com ácido tricloroacético (TCA) e EDTA da marca Merck (Darmstadt, Alemanha), o galato de propila e TEP foram adquiridos Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. O ácido tiobrabitúrico utilizado foi fornecido pela Acros Organics (New Jersey, USA).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Determinação simultânea de óxidos de colesterol e colesterol por HPLC

A estratégia seqüencial de planejamentos adotada neste trabalho consistiu de 2 delineamentos, com o objetivo de encontrar as condições ótimas de extração do colesterol e óxidos de colesterol para a carne suína. Primeiramente foi realizado um delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} com 3 repetições no ponto central totalizando 19 ensaios iniciais. Após a análise dos efeitos das 6 variáveis foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis, com pontos axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 12 ensaios finais. A Figura 7 mostra o fluxograma de extração de colesterol e óxidos de colesterol.

As amostras foram homogeneizadas e submetidas à saponificação direta a frio segundo Mariuttiet al. (2008). Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão) com detectores UV-Visível (SPD-10 AV_{VP}) e índice de refração (RID-10 A). O detector de índice de refração foi utilizado na determinação dos α e β -epoxicoolesterol, uma vez que estes compostos, por não apresentarem ligação π , não absorvem luz na região do UV e os demais óxidos foram determinados pelo detector UV-Visível com

comprimento de onda fixado em 210 nm. A coluna analítica foi Nova Pack CN HP (300 mm x 3,9 mm x 4 µm, Waters, Massachusetts, USA) e a fase móvel foi n-hexano:isopropanol (97:3) na vazão de 1 mL/min, de acordo com SILDANHA et al. (2006). A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos padrões com os tempos de retenção da amostra e por co-cromatografia.

A quantificação foi feita por padronização externa construindo uma curva com seis pontos, com concentrações variando de 0,5 a 100 µg/mL para os óxidos de colesterol e de 0,05 a 4 mg/mL para o colesterol.

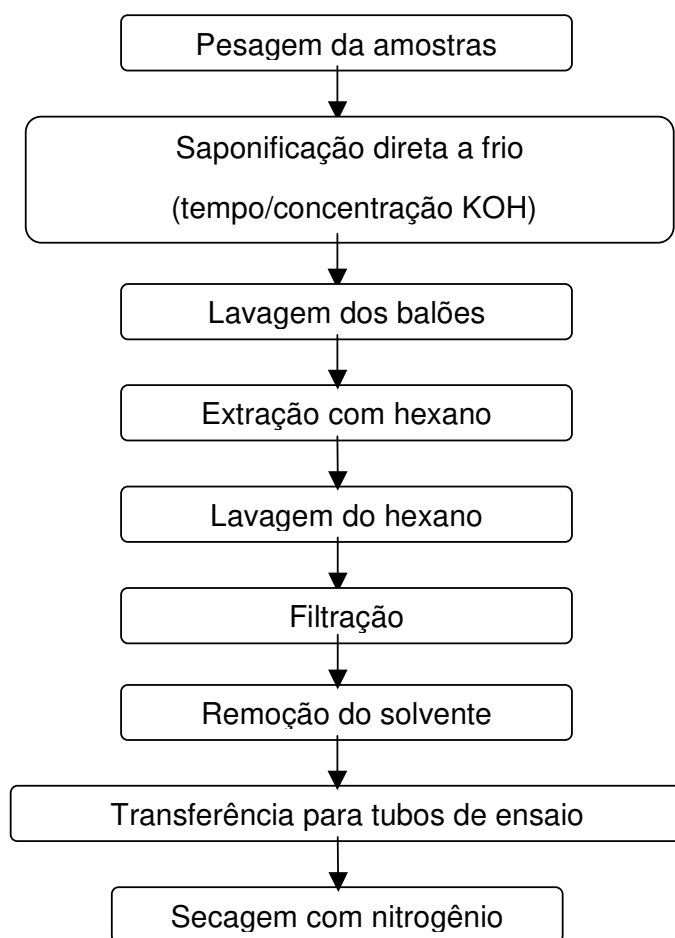


Figura 7 – Fluxograma de extração do colesterol e óxidos de colesterol

A confirmação de identidade dos óxidos de colesterol foi realizada por HPLC-APCI-MS. Foi utilizado um espectrômetro de massas (MS) Squire 4000 (Bremen, Germany) a 450 °C, acoplado a um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japan), bomba de solventes (LC-20AD), degaseificador (DGU 20A₅), detector por arranjo de diodos (SPD-M20A) e *software* (LC Solution). Os espectros de massas obtidos dos óxidos encontrados nas amostras foram comparados com os espectros de massas dos padrões de óxidos nos correspondentes tempos de retenção.

4.2.2. Quantificação de bixina em carne suína adicionada de urucum

A determinação de bixina foi realizada de acordo com Castro (2010) nas amostras adicionadas de urucum (URU) e eritorbato/urucum (EU) grelhadas nos tempo zero, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 120 dias. $2 \pm 0,1$ g de amostra adicionada de 10 mL de acetona foram homogeneizadas em agitador mecânico por 30 segundos e filtrados. O filtrado foi transferido aos poucos para funil de separação de 500 mL, contendo 0,5 mL de água destilada e 100 mL de acetato de etila/éter etílico, na proporção de 1:1. O extrato foi lavado aos poucos com água destilada até completa remoção da acetona. A fase apolar contendo a bixina foi filtrada com Na₂SO₄ anidro para balão de fundo redondo de 500 mL. O extrato foi seco em evaporador rotatório a 35 °C e transferido com diclorometano para balão volumétrico de 10 mL. A leitura da absorbância em espectrofotômetro (Agilent modelo 8453, Palo Alto, USA) foi realizada a 468 nm (LARA, 1984) e a concentração de bixina foi calculada em mg/g utilizando o coeficiente de absorção de 2826 (FAO/WHO, 1982). Todo o processo foi realizado sem a presença de luminosidade.

4.2.3 Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico foi realizada segundo Bragagnolo, Danielsen e Skibsted (2005). Foram pesadas $1,5 \pm 0,1$ g de amostra em béquer de 150 mL, adicionados 6 mL de solução contendo ácido tricloroacético 7,5% (TCA), ácido etilenodiaminotetracético 0,1% (EDTA) e galato de propila 0,1% (PG) e homogeneizado em agitador mecânico (Tecnal, Pirassicaba - Brasil) por 20 segundos. O homogeneizado foi filtrado para um frasco âmbar em filtro de acetato de celulose. Do filtrado foram pipetados 2,0 mL para um tubo de 30 mL com tampa rosqueada e adicionados 2,5 mL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,002 mol/L. Foi realizado um branco com 2,5 mL de solução de TBA e 2,0 mL de solução contendo TCA 7,5%, EDTA 0,1% e PG 0,1%. Juntamente com as amostras e o branco foram realizados seis pontos da curva padrão construída com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), em concentrações próximas às das amostras. A curva padrão foi construída com valores entre 0,0978 μ mol/L e 9,7839 μ mol/L. Os tubos foram homogeneizados em vortéx por 10 segundos, aquecidos em banho de água em ebulição por 45 minutos, resfriados em banho de gelo e a absorbância foi obtida em espectrofotômetro (Agilent modelo 8453, Palo Alto, USA) a 532nm e 600nm.

4.2.4. Determinação do teor de lipídios totais e umidade

O teor de lipídios totais e a umidade foram analisados nas amostras cruas e grelhadas controle e nas submetidas aos diferentes tratamentos. No tempo zero e tempo final (120 dias) as amostras cruas foram analisadas após descongelamento a temperatura ambiente (22 °C) e as grelhadas logo após resfriamento a temperatura ambiente. A determinação dos lipídios totais foi realizada por gravimetria segundo Folch et al. (1957). Após a obtenção dos lipídios, estes foram acondicionados em frascos âmbar, sob atmosfera de

nitrogênio e armazenados em freezer a -18°C, até o momento das análises da composição de ácidos graxos (4 dias após a extração).

Para medida do teor de umidade, alíquotas de $2,0 \pm 0,1$ g de amostra foram pesadas em placas de Petri previamente taradas. As amostras foram secas em estufa a 105°C até peso constante, de acordo com metodologia da AOAC (1997). Após terem sido retiradas da estufa, as placas foram colocadas em dessecador com sílica gel e posteriormente pesadas. A umidade foi determinada pela diferença entre as massas.

4.2.5. Determinação dos ácidos graxos

Uma alíquota dos lipídios obtidos segundo Folch et al. (1957), contendo aproximadamente 25 ± 1 mg de óleo foi saponificada e metilada (JOSEPH e ACKMAN, 1992). A saponificação foi realizada com 1,5 mL de NaOH metanólico 0,5 N e aquecimento a 100 °C por 5 minutos e a metilação com adição de 2 mL de BF₃ em metanol e aquecimento a 100 °C por 30 minutos. Aos ésteres metílicos dos ácidos graxos, extraídos com isooctano (2 extrações), foram adicionados 0,075 mg de éster metílico do ácido tridecanoico (C13:0) e 0,5 mg de éster metílico do ácido tricosanóico (C23:0) para posterior quantificação.

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Shimadzu, GC 2010, Kyoto, Japão) equipado com um injetor split (1/100) a 260°C, detector de ionização em chama, coluna CP-SIL 88 (Chromopack Middleburg, Netherlands) 100 m x 0,25 mm x 0,20 µm). O volume de injeção foi de 1 µL através da técnica de *hot needle* por 5 seg. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com velocidade linear de 20 cm/s e o gás *make up*, nitrogênio a 30 mL/min. A temperatura da coluna foi programada iniciando-se a 120 °C, mantendo-se nesta temperatura por 8 minutos, aumentando para 160° C, com taxa de 20° C/min, mantendo-se essa temperatura por 4 minutos, aumentando novamente em seguida 3 °C por minuto até 195 °C, mantendo-se nesta temperatura por 10 minutos, aumentando 35° C por minuto até 220 °C mantendo-se nesta temperatura por

3 minutos e finalmente aumentando 20 °C por minuto até 240 °C e mantendo-se nesta temperatura por 5 minutos, totalizando 46 minutos.

A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos dos padrões com os tempos de retenção da amostra e co-cromatografia. A quantificação dos AG foi realizada por comparação da área de cada EMAG com a área do padrão interno, utilizando os fatores de conversão de ésteres metílicos para AG e os fatores de correção de resposta do FID teórico em relação ao C16:0 (JOSEPH; ACKMAN,1992).

4.2.6. Análise estatística

Os dados obtidos e o planejamento experimental foram analisados através de análise de variância pelo STATISTICA (2000), versão 5.5 (StatSoft Inc., Oklahoma, USA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento de metodologia e validação para determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol

O delineamento fatorial foi realizado para avaliar o efeito de 6 variáveis: peso da amostra (g), concentração de KOH (%), tempo de saponificação (h), volume de água de lavagem (mL), número de extrações com hexano, número de lavagens, em relação às variáveis de repostas que foram: concentração de colesterol (mg/100g) e recuperação de 7-cetocolesterol (%). A Tabela 1 apresenta os valores usados em cada nível das variáveis

Os 19 ensaios iniciais referentes ao planejamento fracionado foram realizados ao longo de 3 dias de análises, sendo a ordem dos ensaios escolhida por sorteio. A recuperação de 7-cetocolesterol foi medida através da

adição de 50 µg/g do padrão de 7-cetocolesterol as amostras(adição realizada no estágio inicial de saponificação)

Tabela 1: Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado 2⁶⁻²

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Peso da amostra (g)	0,5	1,0	1,5
Concentração de KOH (%)	10	20	30
Tempo de saponificação(h)	20	22	24
Volume de água de lavagem (ml)	10	15	20
Número de extrações	3	4	5
Número de lavagens	2	3	4

As Tabelas 2 e 3 apresentam os efeitos das variáveis sobre as repostas analisadas. Dentre as 6 variáveis estudadas, o peso da amostra e o número de extrações foram estatisticamente significativas ($p < 0,10$) para recuperação de 7-cetocolesterol (%) e apenas o número de extrações apresentou diferença para o peso da amostra.

Tabela 2: Estimativa dos efeitos na recuperação de 7-cetocolesterol (%) no planejamento 2⁶⁻²

	Recuperação de 7-cetocolesterol (%)			
	Efeito	Erro padrão	t(12)	p-valor
Média	71,63	2,53	8,55	0,000002
Peso da amostras	26,86	5,51	4,87	0,000384
KOH	-3,67	5,51	-0,67	0,517758
Tempo de saponificação	4,14	5,51	0,75	0,467529
Volume de lavagem	-0,40	5,51	-0,07	0,943176
Número de extrações	17,67	5,51	3,21	0,007555
Número de lavagens	5,18	5,51	0,94	0,366045

Tabela 3: Estimativa dos efeitos no colesterol no planejamento 2⁶⁻²

	Colesterol (mg/100g)			
	Efeito	Erro padrão	t(12)	p-valor
Média	42,51	2,53	8,55	0,000002
Peso da amostras	26,86	5,51	4,87	0,000384
KOH	-3,67	5,51	-0,67	0,517758
Tempo de saponificação	4,14	5,51	0,75	0,467529
Volume de lavagem	-0,40	5,51	-0,07	0,943176
Número de extrações	17,67	5,51	3,21	0,007555
Número de lavagens	5,18	5,51	0,94	0,366045

A variável, número de extrações, apresentou efeito positivo para ambas variáveis de resposta, por isso os níveis de estudo foram deslocado para 6 extrações no DCCR. O peso da amostra apresentou efeito positivo para a variável recuperação de 7-cetocolesterol (%) indicando que ao passar de 0,5 g para 1,5 g ocorreu um aumento nesta resposta e por isso seu nível também foi deslocado para valores superiores (2,5 g). Para as outras variáveis não foi encontrada diferença significativa ($p < 0,10$) sendo fixadas em: tempo de saponificação de 20 horas, 20% concentração de KOH, volume de água de lavagem 15 mL, com 3 lavagens. A Tabela 4 mostra a matriz do DCCR e resultados de recuperação do 7-cetocolesterol (%) e do colesterol.

Pelos resultados obtidos no DCCR (Tabela 9) observa-se que no ensaio 6 os maiores valores foram obtidos para a recuperação de 7-cetocolesterol e o ensaio 4 para o colesterol. Além disso, a pequena variação no ponto central assegura a repetibilidade dos ensaios. Os coeficientes de determinação foram 95,77% para o colesterol e 86,56% para recuperação do 7-cetocolesterol este último considerado razoável para o processo. As tabelas 5 e 6 mostram os coeficientes de regressão para as 2 variáveis estudadas.

Tabela 4: Matriz do DCCR e resultados de recuperação 7-cetocolesterol (%) e colesterol

Ensaio	Peso da amostra (g)	Nº de extrações	Recuperação 7-cetocolesterol (%)	Colesterol (mg/100g)
1	-1,00	-1,00	15,41	32,76
2	-1,00	1,00	40,01	32,40
3	1,00	-1,00	54,97	41,45
4	1,00	1,00	70,24	67,54
5	-1,41	0,00	40,17	29,72
6	1,41	0,00	91,24	49,85
7	0,00	-1,41	44,01	39,48
8	0,00	1,41	73,59	51,15
9	0,00	0,00	64,83	52,01
10	0,00	0,00	64,43	52,11
11	0,00	0,00	65,65	49,67
12	0,00	0,00	66,62	55,23

Tabela 5: Coeficientes de regressão para colesterol (mg/100g) para o planejamento DCCR

	Colesterol			
	Efeito	Erro padrão	t(12)	p-valor
Média	52,25	1,55	33,68	0,000000
1 Peso da amostra (L)	18,08	2,19	8,24	0,000173
Peso da amostra (Q)	-11,97	2,45	-4,88	0,002761
2 Número de extrações (L)	10,55	2,19	4,81	0,002971
Número de extrações (Q)	-6,45	2,45	-2,63	0,039188
L1 x L2	13,22	3,10	4,26	0,005308

Tabela 6: Coeficientes de regressão para recuperação do 7-cetocolesterol (%) para o planejamento DCCR

	Recuperação do 7-cetocolesterol (%)			
	Efeito	Erro padrão	t(12)	p-valor
Média	65,38	4,95	13,21	0,000012
1 Peso da amostra (L)	35,51	7,00	5,07	0,002286
Peso da amostra (Q)	-8,22	7,83	-1,05	0,333943
2 Número de extrações (L)	20,43	7,00	2,92	0,026726
Número de extrações (Q)	-15,13	7,83	-1,93	0,101482
L1 x L2	-4,66	9,90	-0,47	0,654303

O teste F foi significativo para ambos os casos, sendo adequado descrever o modelo através da curva de contorno (Figura 8) e das superfícies de respostas (Figura 9). Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de segunda ordem para o colesterol (equação VII) e de primeira ordem para recuperação de 7-cetocolesterol (equação VIII).

$$\text{Colesterol} = 52,25 + 18,08 \times \text{Peso} - 11,97 \times \text{Peso}^2 + 10,55 \times \text{Extrações} - 6,45 \times \text{Extrações}^2 + 13,22 \times \text{Peso} \times \text{Extrações}$$

(equação VII)

$$\text{Recuperação de 7-cetocolesterol (\%)} = 65,38 + 35,51 \times \text{Peso} + 20,43 \times \text{Extrações}$$

(equação VIII)

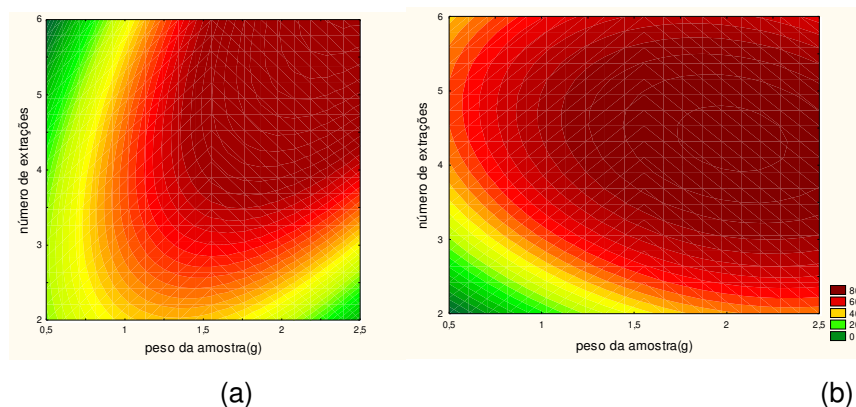


Figura 8 – Curva de contorno para o colesterol (a) e %recuperação do 7-cetocolesterol (b)

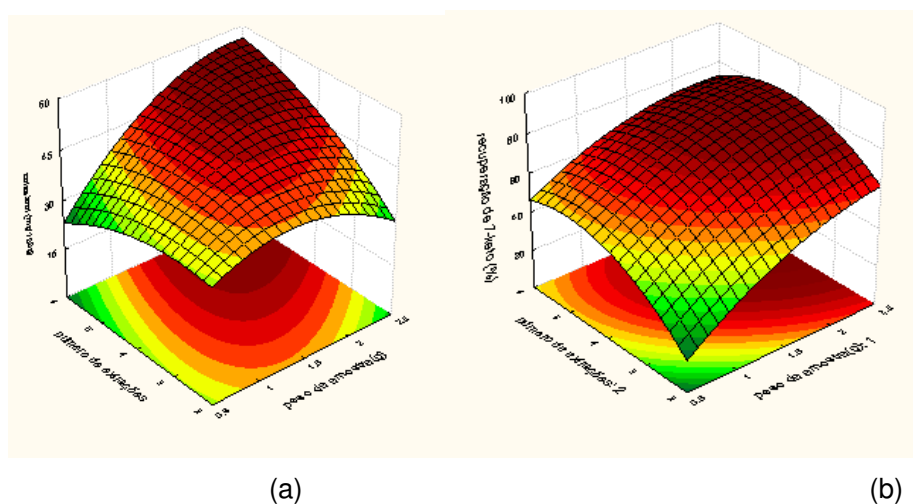


Figura 9 – Superfície de resposta para o colesterol (a) e %recuperação do 7-cetocolesterol (b)

Através da sobreposição das curvas de contorno foi possível encontrar os valores ótimos das condições de saponificação e extração, estabelecendo: 2 gramas de amostra e 4 extrações, a Tabela 7 mostra os valores ótimos do planejamento.

Tabela 7: Valores otimizados do planejamento experimental

Variáveis	Valores Otimizados
Peso da amostra (g)	2
Concentração de KOH (%)	20
Tempo de saponificação (h)	20
Volume de água de lavagem (mL)	15
Número de extrações	4
Número de lavagens	3

5.1.1. Validação da metodologia

A validação da metodologia utilizada foi realizada considerando os parâmetros de linearidade, recuperação, repetibilidade e limites de detecção. A linearidade foi observada através dos coeficientes de correlação (r^2) das curvas de calibração construídas com 6 pontos através de soluções padrão.

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e levam em consideração a variação da faixa de concentração. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços.

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) (Tabela 13) foram calculados pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004) através das fórmulas:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \text{ e } LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde **s** é o coeficiente linear da equação e **S** é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

As curvas de calibração para o colesterol e óxidos de colesterol apresentaram linearidade com coeficiente de correlação variando entre 0,997 e 0,999. Os testes de recuperação foram realizados com 10 repetições em dois níveis com adição de 20 a 40 mg de colesterol/g de carne suína e 20 a 40 µg de óxidos de colesterol/g de carne suína (Tabela 8). Os resultados obtidos (Tabela 9) mostram que os limites de detecção variaram de 0,13 a 5,52 µg/mL para os óxidos de colesterol, sendo 0,02 mg/mL para o colesterol (detector de índice de refração). O limite de quantificação encontrado para o colesterol foi de 0,06 mg/mL e entre 0,39 a 16,36 µg/mL para os óxidos de colesterol. MARIUTTI, NOGUEIRA e BRAGAGNOLO, (2008) encontraram menores valores de LD e LQ para o colesterol e óxidos de colesterol em seu experimento de otimização das condições de extração de colesterol e óxidos de colesterol na carne de frango, essa variação se deve á diferença nas metodologias utilizadas para o cálculo desses parâmetros (LD e LQ).

Tabela 8: Valores de recuperação (µg/mL)

Composto	Nível de adição (µg)	Recuperação (%)	*CV (%)
Colesterol	40	95	5
	80	92	5
20α-OH	20	86	5
	40	84	4
22R-OH	20	90	5
	40	87	5
22S-OH	20	96	4
	40	92	4
25S-OH	20	96	5
	40	86	4
25R-OH	20	92	3
	40	90	3
α-EP	20	87	7
	40	85	7
β-EP	20	88	6
	40	84	7

7-ceto	20	89	4
	40	91	5
7 β -OH	20	88	4
	40	85	4
7 α -OH	20	90	4
	40	88	5

*CV = Coeficiente de variação

Tabela 9. Limites de detecção e quantificação para colesterol (mg/mL) e óxidos de colesterol (μ g/mL)

Composto	Detector	LD	LQ
Colesterol	IR	0,02	0,06
20 α -OH	UV	1,01	3,07
22R-OH	UV	1,63	4,95
22S-OH	UV	1,15	3,48
25S-OH	UV	1,03	3,13
25R-OH	UV	0,98	2,98
α -EP	IR	1,97	5,97
β -EP	IR	5,52	16,36
7-ceto	UV	0,13	0,39
7 β -OH	UV	0,69	2,10
7 α -OH	UV	0,52	1,57

5.2 Teores de bixina nas amostras

Os teores de bixina encontrados nas amostras de carne suína adicionadas de urucum e urucum + eritorbato de sódio armazenadas sob congelamento por 120 dias e posteriormente submetidas a tratamento térmico, em base seca, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Teores de bixina ($\mu\text{g/g}$) em carne suína adicionada de urucum e urucum + eritorbato de sódio estocadas sob congelamento por 120 dias e subsequente tratamento térmico.

Dias	Urucum (0,05%) + Eritorbato (0,1%)	Urucum (0,05%)
0	$127,21 \pm 4,10^{a,A}$	$129,69 \pm 3,26^{a,A}$
15	$123,68 \pm 0,38^{a,A}$	$124,51 \pm 2,40^{a,b,A}$
30	$135,32 \pm 5,50^{a,A}$	$124,05 \pm 0,62^{a,b,B}$
45	$134,74 \pm 5,13^{a,A}$	$103,23 \pm 0,92^{b,B}$
60	$108,03 \pm 2,42^{a,b,A}$	$88,49 \pm 0,88^{b,c,B}$
75	$88,34 \pm 2,06^{b,c,A}$	$67,54 \pm 4,14^{c,B}$
90	$88,13 \pm 1,49^{b,c,A}$	$60,95 \pm 2,65^{c,B}$
120	$64,89 \pm 2,41^{c,A}$	$59,98 \pm 4,43^{c,A}$

Valores expressos como a média $\pm$ desvio padrão de análises em triplicatas.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) e letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

As comparações das amostras demonstraram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos teores de bixina entre amostras estudadas durante o armazenamento exceto para os tempos zero, 15 e 120 dias. Os resultados de bixina obtidos nas amostras de carne suína adicionadas de urucum e urucum + eritorbato de sódio apresentaram o mesmo comportamento ao longo dos 120 dias de estocagem (figura 10), contudo as amostras contendo urucum + eritorbato de sódio obtiveram teores maiores de bixina comparados com as amostras de urucum. O eritorbato de sódio pode atuar como sinergista (RAMALHO; JORGE, 2006) recuperando radical formado a partir da oxidação dos carotenoides do urucum. De acordo com Bittencourt et al. (2005), a bixina sofre decomposição térmica a partir dos 70° C, levando em consideração que a temperatura do grill foi ajustada para 165° C e que os hambúrgueres foram

grelhados até que a temperatura interna atingisse 70° C, a perda de bixina por termolabilidade já era esperada.

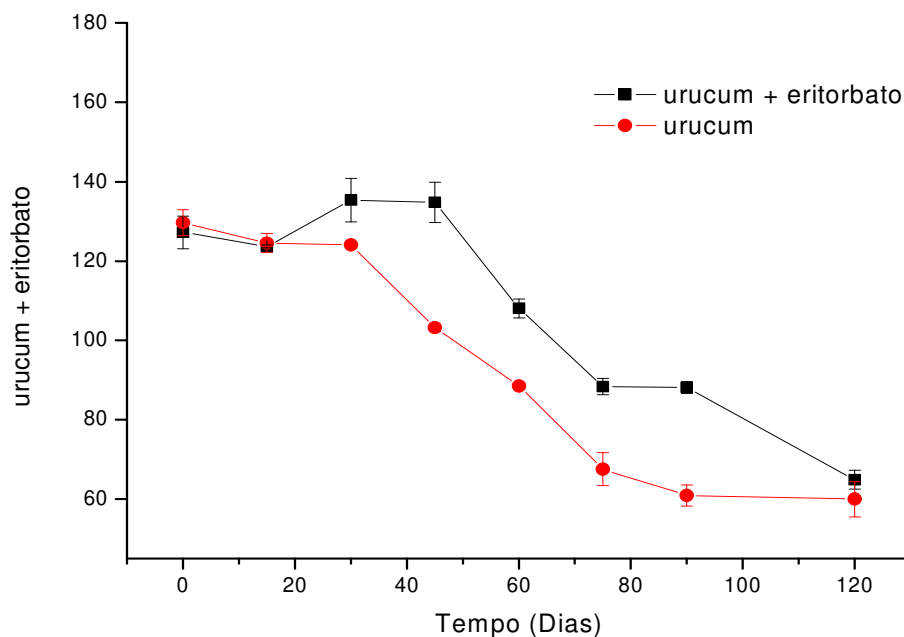


Figura 10 - Teores de bixina em lombo suíno adicionado de urucum e urucum + eritorbato armazenadas a -18° C por 120 dias e submetidas a tratamento térmico

5.3. Teores de umidade e de lipídios totais

Os teores de umidade e de lipídios totais (em base seca) das amostras cruas e grelhadas no tempo zero e 120 estão apresentados nas Tabelas 11 e 12. A amostra crua controle no tempo zero apresentou $73,28 \pm 0,01$ g/100g de umidade não apresentando diferença ($p < 0,05$) com o controle no tempo 120 que apresentou $74,05 \pm 0,02$ g/100g.

O tratamento térmico resultou em perda de água das amostras grelhadas variando de 7 % a 11,49 % quando comparadas com as amostras cruas. Os teores de umidade das amostras grelhadas variaram de $64,86 \pm 0,01$ a $68,89 \pm 0,01$ g/100g em todas as amostras analisadas (Figura 11).

Tabela 11: Umidade (g/100g) em lombo suíno com adição e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio estocado ao longo 120 dias e submetido ao tratamento térmico.

Dia	Controle	Urucum	Urucum +	
			Eritorbato	Eritorbato
0	66,50 ± 0,00 ^a	65,86 ± 0,01 ^a	66,76 ± 0,00 ^a	67,99 ± 0,00 ^a
15	64,86 ± 0,01 ^a	65,35 ± 0,00 ^a	66,51 ± 0,01 ^a	65,93 ± 0,00 ^a
30	66,19 ± 0,00 ^a	66,67 ± 0,01 ^a	67,01 ± 0,00 ^a	65,47 ± 0,01 ^a
45	68,06 ± 0,00 ^a	68,89 ± 0,01 ^a	68,53 ± 0,01 ^a	68,86 ± 0,00 ^a
60	65,68 ± 0,01 ^a	63,96 ± 0,00 ^a	65,29 ± 0,00 ^a	65,03 ± 0,01 ^a
75	66,93 ± 0,01 ^a	67,45 ± 0,01 ^a	68,38 ± 0,00 ^a	67,78 ± 0,01 ^a
90	67,67 ± 0,00 ^a	65,6 ± 0,00 ^a	65,30 ± 0,01 ^a	66,45 ± 0,01 ^a
120	65,55 ± 0,00 ^a	66,34 ± 0,00 ^a	68,13 ± 0,00 ^a	65,62 ± 0,01 ^a

Valores expressos como a média ± desvio padrão de análises em triplicatas. Amostras seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

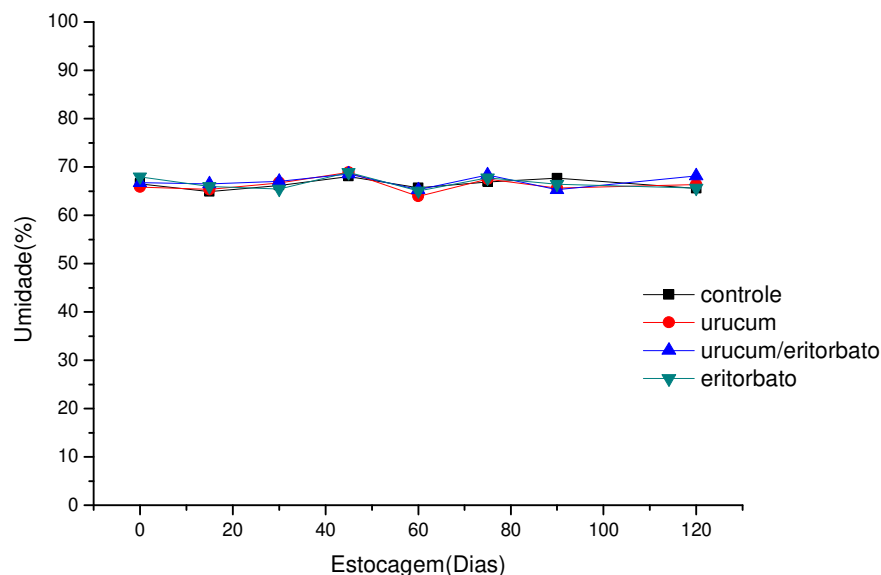


Figura 11 – Umidade (g/100g) em lombo suíno com ou sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenadas a -18° C por 120 dias e submetidas a tratamento térmico

Os teores de lipídios totais (base seca) em lombo suíno fresco foram de $6,73 \pm 0,27$ g/100g e $10,31 \pm 0,31$ g/100g para a amostra urucum grelhada. Não houve diferença significativa nos teores de lipídios totais entre as amostras grelhadas, no entanto apresentaram valores maiores que a amostra crua, isso pode ser explicado devido a perda de água pelo tratamento térmico e conseqüente concentração dos lipídios na amostras.

Tabela 12: Lipídios totais g/100g (base seca) em carne suína crua e submetida a tratamento térmico tempo zero

Amostras	Crua		Grelhada		
	CON	CON	URU	ERI	EU
Lipídios totais g/100g	$6,73 \pm 0,27^a$	$8,72 \pm 0,33^b$	$10,31 \pm 0,31^b$	$9,94 \pm 0,42^b$	$8,26 \pm 0,29^b$

Valores expressos como a média $\pm$ desvio padrão de análises em triplicatas. Amostras seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

CON: controle, URU: urucum, ERI: eritorbato, EU: eritorbato/urucum

Hutchison et al. (1987) demonstraram que os cortes de suínos reduziram de 20 a 40% no teor de gordura e retirando a gordura externa são 40% mais magros. A retirada da gordura externa representa uma grande diminuição no teor de gordura, segundo BRAGAGNOLO (2001) os valores de lipídios totais foram maiores para o lombo suíno com gordura externa (13g/100, base úmida) comparado com do lombo retirando-se toda gordura externa (3g/100g, base úmida), representando uma diminuição de 76,92% no teor de gordura. De acordo com BUEGE et al. (1998) o grau de gordura externa da carcaça de suínos diminuiu de 1989 a 1996 de 2,4mm para 1,4 mm.

5.4. Composição dos ácidos graxos

A análise por cromatografia gasosa permitiu a separação de 31 ésteres metílicos de ácidos graxos. Dentre eles, 20 foram identificados e quantificados, sendo os principais 18:1n-9, 16:0, 18:2n-6, 18:0 e 16:1n-7, os quais representam cerca de 97% do total de ácidos graxos identificados (Tabela 13). Resultados semelhantes foram encontrados por RAMIREZ et al. (2005) e WOOD et al., (2008) para lombo suíno. BRAGAGNOLO e RODRIGUEZ-AMAYA (2002) detectaram 36 ácidos graxos, sendo os principais 18:1n-9, 16:0, 18:2n-6, 18:0, 18:1n-7 e 16:1n-7, os quais representaram de 91 a 96% do total de ácidos graxos. A composição dos AG, em base úmida (BU), do lombo suíno cru e submetido ao tratamento térmico está apresentada na Tabela 13.

Para as amostras cruas a maior porcentagem de AG foi de AGM (51,5%) seguido de AGS (37,5%) e AGPI (11%). Os teores de AG encontrados no presente trabalho foram semelhantes aos descritos por PEREIRA et al. (2000) que analisando lingüiça suína tipo comum encontraram valores de ácidos graxos mono-insaturados (50,2%) maiores que os saturados (34,1%) e poli-insaturados (15,7%). O tratamento térmico não alterou o teor de ácidos graxos saturados (Tabela 14), os quais apresentam alta estabilidade oxidativa devido à ausência de duplas ligações. Houve perda significativa de AGM e AGP, principalmente devido à degradação do ácido oléico e ácido linoleico (majoritários). Rodriguez-Estrada et al. (1997) não encontraram diferenças significativas para as porcentagens de ácidos graxos saturados e mono-insaturados entre as amostras de hambúrgueres bovinos cruas e cozidas, enquanto que os ácidos graxos poli-insaturados apresentaram diminuição significativa.

Tabela 13: Composição de ácidos graxos mg /100g em lombo suíno cru e grelhado no tempo zero

AG (mg/100g) BU	Abreviação	Cru	Grelhado
Ác. Cáprico	10:0	1,4±0,1	1,8±0,5
Ác. Láurico	12:0	3,1±0,7	3,1±0,3
Ác. Mirístico	14:0	28,2±0,3	29,3±1,6
Ác. Pentadecílico	15:0	0,7±0,0	0,9±0,0
Ác. Palmítico	16:0	670,6±21,85	785,5±34,75
Ác. Margárico	17:0	3,7±0,2	18,4±0,1
Ác. Esteárico	18:0	326,35±6,15	398,15±11,5
Ác. Araquídico	20:0	2,1±0,0	2,8±0,6
ΣAGS		1036,15±12,5	1139,45±10,25
Ác. Fisetérico	14:1n-9	1,2±0,1	0,3±0,0
Ác. Palmitoléico	16:1n-7	41,8±1,7	34,5±3,1
Ác. 10-heptadecenoico	17:1n-7	7,4±0,3	9,2±1,5
Ác. Elaídico	18:1n-9t	3,7±0,2	4,2±0,2
Ác. Oleico	18:1n-9c	1245,5±50,35	1122,8±31,4
Ác. Gondoico	20:1n-9	4,7±0,1	6,3±1,2
ΣAGMI		1304,3±27,5	1177,1±23,1
Ác. Linoleico	18:2n-6c	265,9±8,6	248,45±12,5
Ác. α-Linolênico	18:3n-3	6,5±0,3	5,0±0,1
Ác. di-homo-gama-linolênico	20:2n-6	2,2±0,0	2,3±0,3
Ác. di-homo-alfa-linolênico	20:3n-6	2,1±0,2	2,2±0,5
Ác. Araquidônico	20:4n-6	10,8±0,7	10,6±1,1
Ác. Eicosapentaenoico	20:5n-3	0,8±0,1	0,9±0,3
ΣAGPI		287,9±2,6	269,45±5,9
Σn-3/n-6		1:39	1:45

Valores expressos como a média ± desvio padrão de análises em triplicata. BU= base úmida

Tabela 14: Composição de ácidos graxos (mg /100g, base seca) em lombo suíno cru com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio e submetido a tratamento térmico no tempo zero.

Ác. Graxo	Cru		Grelhado		
	CON	CON	ERI	URU	EU
10:0	5,19 ± 0,38 ^a	5,37 ± 0,59 ^a	5,15 ± 0,13 ^a	5,22 ± 0,27 ^a	5,56 ± 0,36 ^a
12:0	11,43 ± 2,61 ^a	11,31 ± 0,89 ^a	11,51 ± 0,27 ^a	11,93 ± 1,14 ^a	11,09 ± 0,79 ^a
14:0	105,40 ± 1,11 ^a	99,38 ± 3,91 ^a	102,88 ± 0,62 ^a	107,48 ± 9,19 ^a	100,27 ± 0,94 ^b
15:0	2,65 ± 0,03 ^a	2,52 ± 0,09 ^a	2,52 ± 0,03 ^a	2,67 ± 0,01 ^a	2,65 ± 0,06 ^a
16:0	2343,69 ± 81,04 ^b	2509,73 ± 59,34 ^a	2427,99 ± 88,09 ^b	2455,60 ± 115,94 ^{a,b}	2399,48 ± 64,07 ^b
17:0	13,77 ± 0,71 ^a	14,01 ± 0,38 ^a	14,63 ± 0,44 ^a	14,20 ± 0,41 ^a	14,91 ± 0,24 ^a
18:0	1221,36 ± 55,84 ^b	1188,06 ± 61,72 ^b	1191,4 ± 82,47 ^b	1260,54 ± 47,37 ^a	1204,77 ± 48,65 ^b
20:0	7,82 ± 0,13 ^a	8,33 ± 0,89 ^a	8,82 ± 0,88 ^a	8,08 ± 0,87 ^a	7,45 ± 0,33 ^a
ΣAGS	3711,31 ± 200,52 ^a	3838,21 ± 244,82 ^a	3765,3 ± 209,79 ^a	3863,72 ± 292,83 ^a	3756,22 ± 153,27 ^a
14:1n-9	4,46 ± 0,41 ^a	0,80 ± 0,10 ^c	1,17 ± 0,19 ^{b,c}	1,34 ± 0,04 ^b	0,86 ± 0,06 ^c
16:1n-7	156,47 ± 6,30 ^{b,c}	143,70 ± 9,37 ^c	165,16 ± 24,29 ^b	162,53 ± 1,75 ^{a,b}	142,86 ± 4,23 ^c
17:1n-7	27,87 ± 1,12 ^a	27,34 ± 4,52 ^a	24,12 ± 3,09 ^a	25,63 ± 2,27 ^a	14,72 ± 0,49 ^b
18:1n-9t	13,74 ± 0,60 ^a	13,00 ± 0,67 ^a	13,43 ± 0,39 ^a	13,38 ± 0,40 ^a	13,01 ± 1,58 ^a
18:1n-9c	4880,2 ± 94,15 ^a	3817,91 ± 64,16 ^b	3826,75 ± 108,92 ^b	3817,36 ± 53,41 ^b	3888,38 ± 86,48 ^b
20:1n-9	17,65 ± 0,26 ^a	17,86 ± 0,99 ^a	17,65 ± 1,06 ^a	17,78 ± 0,71 ^a	17,71 ± 0,35 ^a
ΣAGMI	5100,39 ± 87,47 ^a	4019,91 ± 156,01 ^b	4071,28 ± 137,16 ^b	4038,02 ± 63,50 ^b	4077,54 ± 87,35 ^b
18:2n-6c	995,13 ± 32,01 ^a	890,89 ± 15,02 ^b	722,54 ± 25,13 ^c	760,94 ± 21,62 ^c	727,82 ± 21,70 ^c
18:3n-3	24,18 ± 1,20 ^a	15,01 ± 0,17 ^b	17,72 ± 0,50 ^b	15,62 ± 0,98 ^b	13,33 ± 1,66 ^b
20:2n-6	8,29 ± 0,07 ^a	8,72 ± 0,75 ^a	8,47 ± 0,25 ^a	8,86 ± 0,40 ^b	8,52 ± 0,26 ^a
20:3n-6	6,87 ± 0,67 ^a	6,95 ± 0,65 ^a	7,32 ± 0,13 ^a	6,99 ± 1,42 ^a	6,04 ± 0,89 ^a
20:4n-6	40,43 ± 2,44 ^a	33,44 ± 3,34 ^c	34,85 ± 2,47 ^{b,c}	41,09 ± 1,75 ^a	38,29 ± 3,22 ^{a,b}
20:5n-3	2,98 ± 0,05 ^a	2,89 ± 0,12 ^a	2,78 ± 0,15 ^a	2,39 ± 0,18 ^b	2,40 ± 0,19 ^b
ΣAGPI	1077,43 ± 27,68 ^a	810,30 ± 17,01 ^b	793,68 ± 52,99 ^b	835,89 ± 43,27 ^b	796,90 ± 43,41 ^b

Valores expressos como a média ± desvio padrão de análises em triplicatas

Amostras seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

CON: controle, URU: urucum, ERI: eritorbato, EU: eritorbato/urucum

Tabela 15: Composição de ácidos graxos (mg /100g, base seca) em lombo suíno cru com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio no início e final de armazenamento.

Ác. Graxo	Início do Armazenamento (0 dia)		Final do Armazenamento (120 dias)		
	CON	CON	ERI	URU	EU
10:0	5,19 ± 0,38 ^a	4,96 ± 0,31 ^a	4,90 ± 0,31 ^a	4,49 ± 0,29 ^a	5,00 ± 0,36 ^a
12:0	11,43 ± 2,61 ^a	11,44 ± 0,77 ^a	12,04 ± 0,72 ^a	12,06 ± 1,41 ^a	11,30 ± 0,79 ^a
14:0	105,40 ± 1,11 ^a	105,31 ± 2,97 ^a	104,14 ± 0,68 ^a	104,52 ± 0,91 ^a	107,61 ± 0,94 ^a
15:0	2,65 ± 0,03 ^a	2,52 ± 0,25 ^a	2,64 ± 0,08 ^a	2,55 ± 0,11 ^a	2,50 ± 0,06 ^a
16:0	2343,69 ± 81,04 ^a	2329,17 ± 59,34 ^a	2371,09 ± 90,88 ^a	2346,74 ± 95,04 ^a	2357,58 ± 64,07 ^a
17:0	13,77 ± 0,71 ^a	13,80 ± 0,31 ^a	14,07 ± 0,54 ^a	13,72 ± 0,41 ^a	13,83 ± 0,24 ^a
18:0	1221,36 ± 55,84 ^a	1236,93 ± 72,61 ^a	1223,12 ± 47,82 ^a	1265,51 ± 37,47 ^a	1229,12 ± 48,65 ^a
20:0	7,82 ± 0,13 ^a	7,74 ± 0,38 ^a	7,95 ± 0,48 ^a	7,98 ± 0,78 ^a	7,40 ± 0,33 ^a
ΣAGS	3711,31 ± 200,52 ^a	3711,66 ± 150,3 ^a	3739,95 ± 120,5 ^a	3757,57 ± 89,2 ^a	3734,24 ± 75,9 ^a
14:1n-9	4,46 ± 0,41 ^a	1,05 ± 0,10 ^c	2,33 ± 0,19 ^b	2,43 ± 0,27 ^b	1,87 ± 0,06 ^b
16:1n-7	156,47 ± 6,30 ^b	148,28 ± 8,73 ^b	158,71 ± 24,29 ^a	148,93 ± 1,75 ^b	158,91 ± 4,23 ^a
17:1n-7	27,87 ± 1,12 ^a	22,00 ± 5,96 ^b	27,66 ± 3,09 ^a	22,97 ± 2,27 ^b	26,66 ± 0,49 ^a
18:1n-9t	13,74 ± 0,60 ^a	13,84 ± 0,45 ^a	11,95 ± 0,39 ^a	12,28 ± 0,30 ^a	12,32 ± 1,58 ^a
18:1n-9c	4880,2 ± 94,15 ^a	3609,67 ± 45,16 ^b	4754,07 ± 68,2 ^a	3681,34 ± 53,41 ^b	4723,21 ± 86,48 ^a
20:1n-9	17,65 ± 0,26 ^a	14,71 ± 1,09 ^b	17,07 ± 1,06 ^a	17,05 ± 0,71 ^a	16,97 ± 0,35 ^a
ΣAGMI	5100,39 ± 87,47 ^a	3809,55 ± 68,3 ^b	4972,43 ± 95,9 ^a	3885,01 ± 66,9 ^b	4939,94 ± 88,8 ^a
18:2n-6c	995,13 ± 32,01 ^a	805,64 ± 10,03 ^b	896,18 ± 25,13 ^b	786,51 ± 62,26 ^b	893,31 ± 21,70 ^c
18:3n-3	24,18 ± 1,20 ^a	16,33 ± 0,17 ^b	23,88 ± 0,50 ^b	18,45 ± 0,89 ^b	22,63 ± 1,66 ^b
20:2n-6	8,29 ± 0,07 ^a	12,90 ± 0,57 ^a	10,11 ± 0,25 ^a	7,68 ± 0,50 ^b	10,22 ± 0,26 ^a
20:3n-6	6,87 ± 0,67 ^a	8,93 ± 0,56 ^a	6,96 ± 0,13 ^a	6,65 ± 1,24 ^a	7,07 ± 0,89 ^a
20:4n-6	40,43 ± 2,44 ^a	38,73 ± 3,34 ^a	38,66 ± 2,47 ^a	39,30 ± 1,57 ^a	43,04 ± 3,22 ^a
20:5n-3	2,98 ± 0,05 ^a	2,41 ± 0,12 ^b	2,89 ± 0,15 ^a	2,45 ± 0,21 ^b	2,95 ± 0,19 ^a
ΣAGPI	1077,43 ± 27,68 ^a	884,30 ± 15,8 ^c	978,5 ± 21,3 ^b	861,04 ± 36,7 ^c	979,22 ± 17,89 ^b

Valores expressos como a média ± desvio padrão de análises em triplicatas

Amostras seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

CON: controle, URU: urucum, ERI: eritorbato, EU: eritorbato/urucum

A tabela 15 mostra os valores de composição dos ácidos graxos (base seca) no início e término do armazenamento. Não houve alteração no conteúdo de ácidos graxos saturados ao longo de 120 de estocagem, para os 4 tratamentos estudados. O conteúdo de ácidos graxos mono-insaturados nas amostras adicionadas de eritorbato de sódio e eritorbato de sódio + urucum também não alteraram, no entanto as amostras controle e urucum (após 120 dias de armazenamento) apresentaram uma redução de 25% e 24%, respectivamente, quando comparadas à amostra controle no início da estocagem. . Por outro lado, houve perda significativa de ácidos graxos poli-insaturados durante o armazenamento para todos os tratamentos estudados. A maior porcentagem de perda foi observada para as amostras controle (18%) e com urucum (20%), seguidas das amostras contendo eritorbato de sódio e eritorbato de sódio + urucum que apresentaram uma redução de 9%.

A relação AGP n-3/n-6 é conhecida por sua importância dietética, pois representa um fator determinante no equilíbrio da síntese de eicosanóides (SIMOPOULOS 2002, 2008; STEFFENS, 1997). No presente estudo, esta relação ficou próxima de 1: 39. Segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), a relação diária AGP n-3/n-6 na dieta humana deve ser próxima de 1:5 (FAO, 1994). Os valores encontrados neste estudo estão evidentemente abaixo dos recomendados, porém deve-se levar em consideração que a maioria dos demais alimentos possui uma relação das famílias n-3/n-6 consideravelmente inferior à indicada. Porém, a carne suína é uma boa fonte ácidos graxos oléico (n-9), contendo uma elevada concentração de ácido oléico e pequenas quantidades de ácido fisetérico e ácido gondoico. O ácido oléico (18:1n-9) está associado com a redução de tumores mamários (MENEZES et al., 2005), é fundamental para o processo de mielinização do sistema nervoso em crianças (UAUY e HOFFMAN, 1991) e possui ação bactericida (SCHLESINGER e UAUY, 1991).

Embora exista um grande número de dados referentes à composição de ácidos graxos (AG) em carne suína é importante enfatizar que a composição de AG esta intimamente dependente da alimentação do animal, isto porque seus ácidos graxos não sofrem modificações pelas bactérias do rúmen. De acordo com ABPICS, os alimentos básicos das fórmulas de ração para suínos são: milho em grão triturado bem fino, farelo de soja, farelo de trigo, açúcar,

óleo de soja, vitaminas e minerais, ingredientes que são fontes importantes de ácidos graxos n-6. O tecido muscular contém proporções significativas de ácido graxos poli-insaturados de cadeia longa (20:0 – 22:0) que são formados a partir do 18:2n-6 e 18:3n-3 pela ação das enzimas $\Delta 5$ e $\Delta 6$ dessaturase e elongase. Produtos importantes são o ácido araquidônico (20:4n-6) e o eicosapentaenoico (20:5-n3) que participam de várias rotas metabólicas incluindo a síntese de eicosanóides. A grande incorporação de 18:2n-6 no tecido muscular dos suínos produz grandes proporções de 20:4n-6 através da biossíntese resultando numa alta relação de AGPI n-3/n-6 (WOOD et al., 2005)

5.5. Quantificação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) no teor de colesterol entre os tempos analisados durante a estocagem para as amostras cruas independente do tratamento utilizado (Figuras 12 e 13). Os teores encontrados de colesterol para as amostras cruas variaram de $32,94 \pm 0,33$ no lombo adicionado de urucum + eritorbato de sódio a $38,81 \pm 0,69$ no lombo adicionado de eritorbato.

As amostras grelhadas apresentaram maior concentração de colesterol (base úmida) o que pode ser justificado pela perda de umidade e concentração dos analíticos na amostra (Tabelas 16 e 17). Os valores de colesterol em base seca estão dispostos na tabela 18. Os teores encontrados de colesterol para amostras cruas variaram de $38,16 \pm 0,72$ no lombo adicionado de urucum + eritorbato de sódio a $38,81 \pm 0,69$ no lombo adicionado de eritorbato. Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os resultados encontrados por BRAGAGNOLO (2002) que obtiveram 42 mg/100g em lombo suíno. Valores menores (30 mg/100g) foram encontrados por CSALLANY et al. (1989), valores maiores foram apresentado pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2006) (55 mg/100g).

Tabela 16: Teores de colesterol (mg/100g, base úmida) em lombo suíno cru com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenado a -18° C durante 120 dias.

Tempo de Estocagem (Dias)	CON	URU	ERI	EU
	M ± DP*	M ± DP*	M ± DP*	M ± DP*
0	36,51 ± 0,87 ^a	36,51 ± 0,87 ^a	36,51 ± 0,87 ^a	36,51 ± 0,87 ^a
30	35,34 ± 1,22 ^a	35,30 ± 0,23 ^a	33,96 ± 0,57 ^a	32,94 ± 0,33 ^a
60	34,38 ± 1,07 ^a	36,83 ± 0,11 ^a	34,33 ± 0,12 ^a	35,88 ± 0,52 ^a
90	37,04 ± 0,84 ^a	36,52 ± 0,92 ^a	38,81 ± 0,69 ^a	37,18 ± 1,94 ^a
120	37,50 ± 0,18 ^a	38,80 ± 0,47 ^a	39,26 ± 0,46 ^a	38,37 ± 0,17 ^a

*Média ± desvio padrão de triplicatas

Amostras seguidas por mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). CON: controle, URU: urucum, ERI: eritorbato, EU: eritorbato/urucum

Tabela 17: Teores de colesterol (mg/100g, base úmida) em lombo suíno grelhado com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenado a -18° C durante 120 dias

Tempo de Estocagem (Dias)	CON	URU	ERI	EU
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
0	40,43 ± 1,62 ^a	38,72 ± 3,38 ^a	39,55 ± 0,94 ^a	38,95 ± 0,40 ^a
30	40,81 ± 1,15 ^a	38,85 ± 3,5 ^a	40,47 ± 2,06 ^a	37,98 ± 0,75 ^a
60	42,89 ± 3,16 ^a	38,16 ± 0,72 ^a	37,25 ± 1,24 ^a	40,14 ± 2,90 ^a
90	39,96 ± 0,76 ^a	43,15 ± 0,06 ^a	42,28 ± 0,55 ^a	41,71 ± 0,34 ^a
120	40,14 ± 0,49 ^a	42,45 ± 0,27 ^a	41,90 ± 0,62 ^a	41,73 ± 0,66 ^a

Valores expressos como a média ± desvio padrão de análises em triplicatas

Amostras seguidas por mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

CON: controle, URU: urucum, ERI: eritorbato, EU: eritorbato/urucum

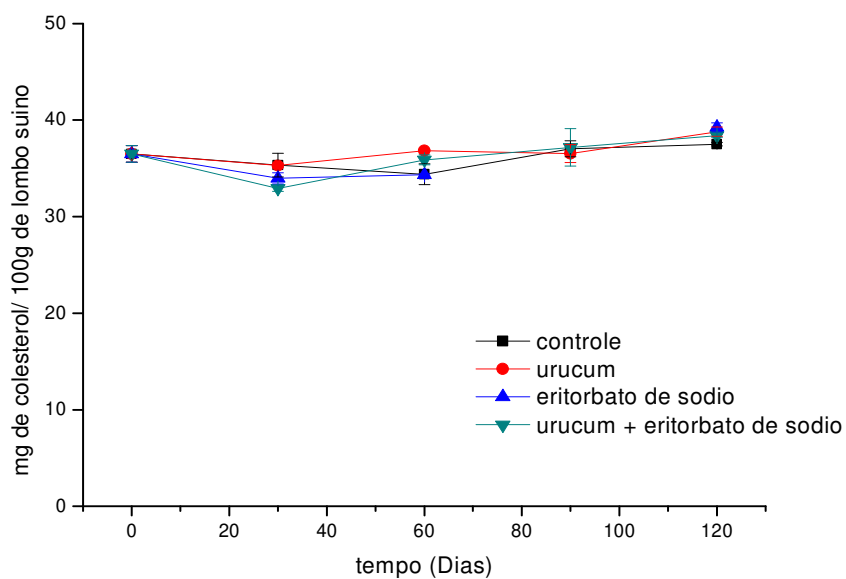


Figura 12 – Colesterol (mg/100g) em lombo suíno cru com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenadas a -18° C por 120 dias

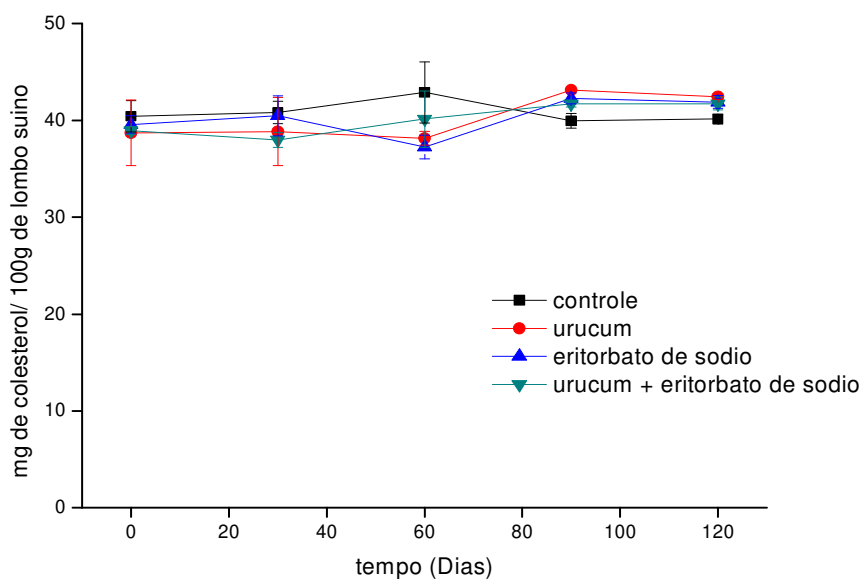


Figura 13 – Colesterol (mg/100g) em lombo suíno com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenadas a -18° C por 120 dias e submetidas a tratamento térmico

Tabela 18: Teores de colesterol (mg/100g de carne, base seca) em lombo suíno com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenado a -18° C durante 120 dias e submetido a tratamento térmico.

Tempo de Estocagem (Dias)	CON	URU	ERI	EU
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
0	120,68 ± 4,28 ^b	112,89 ± 9,85 ^a	116,71 ± 2,80 ^a	116,27 ± 1,19 ^a
30	121,17 ± 3,41 ^a	113,27 ± 10,45 ^a	119,44 ± 3,38 ^a	113,37 ± 2,23 ^a
60	127,35 ± 9,37 ^a	111,25 ± 2,12 ^a	109,93 ± 9,31 ^a	119,82 ± 8,66 ^a
90	118,65 ± 2,24 ^a	125,79 ± 0,18 ^a	124,74 ± 1,24 ^a	124,51 ± 1,03 ^a
120	119,19 ± 1,46 ^a	123,76 ± 0,78 ^a	123,63 ± 1,84 ^a	124,58 ± 1,96 ^a

Valores expressos como a média ± desvio padrão de análises em triplicatas. Números seguidos da mesma letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Para avaliar a possibilidade de perda durante o tratamento térmico, foram calculados os teores de colesterol em base seca no tempo zero para as amostras cruas e grelhadas (Tabela 19). Verificou-se uma perda significativa de 15%, devido ao tratamento térmico. Valores semelhantes foram encontrados por BRAGAGNOLO (2001) quando foram encontradas perdas de 19% devido ao cozimento.

Tabela 19: Colesterol (base seca) em carne suína crua e submetida a tratamento térmico tempo zero de armazenamento

Tratamento	Cru		Grelhado		
	CON	CON	ERI	URU	EU
Colesterol mg/100g	136,64 ± 3,27 ^a	120,68 ± 4,28 ^b	112,89 ± 9,85 ^b	116,71 ± 2,80 ^b	116,27 ± 1,19 ^b

Números seguidos De letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (p<0,05).

Valores expressos como a média ± desvio padrão de análises em triplicatas

Foram identificados 5 óxidos de colesterol os quais foram: 7-ceto, α-epóxi, β-epóxi, 7α-OH e 7β-OH. O α-epoxicolesterol, β-epoxicolesterol e o 7β-hidroxicolesterol ficaram abaixo dos LD do HPLC-UV-IR e foram detectados apenas por HPLC-MS/MS e por isso não foram quantificados. Os produtos de

oxidação da cadeia lateral, como o 20 α -OH, 22R-OH, 22S-OH, 24S-OH, 25R-OH e o colestanoetriol não foram detectados em nenhuma das amostras. Foram quantificados apenas o 7-cetocolesterol e o 7 α -hidroxicoolesterol ao longo de 120 dias de armazenamento e após o tratamento térmico.

O 7-ceto é o principal óxido de colesterol encontrado em alimentos depois de submetidos ao tratamento térmico (MARIUTTI, 2008; SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2007). No tempo zero e 30 dias não houve a formação de óxidos de colesterol tanto para as amostras cruas como nas amostras grelhadas. A partir de 60 dias verificou-se a formação do 7-ceto, aumentando aos 90 dias e diminuindo aos 120 dias tanto para as amostras controle cruas e grelhadas (Tabela 20). Não foi detectado 7-ceto nos tratamentos contendo urucum, eritorbato e urucum + eritorbato.

Tabela 20: Teores de 7-cetocolesterol ($\mu\text{g/g}$ de carne, base úmida e base seca) em lombo suíno cru e grelhado, armazenados a -18°C durante 120 dias.

Hambúrguer de lombo suíno cru (Base úmida)				
Tempo*	Controle	Urucum	Eritorbato	Ururum + Eritorbato
60	$0,84 \pm 0,02^d$	nd	nd	nd
90	$1,49 \pm 0,01^c$	nd	nd	nd
120	$0,79 \pm 0,03^d$	nd	nd	nd
Hambúrguer de lombo suíno grelhado (base úmida)				
Tempo*	Controle	Urucum	Eritorbato	Ururum + Eritorbato
60	$0,87 \pm 0,02^d$	nd	nd	nd
90	$1,49 \pm 0,03^c$	nd	nd	nd
120	$0,85 \pm 0,03^d$	nd	nd	nd
Hambúrguer de lombo suíno grelhado (base seca)				
Tempo*	Controle	Urucum	Eritorbato	Ururum + Eritorbato
60	$2,54 \pm 0,04^b$	nd	nd	nd
90	$4,60 \pm 0,10^a$	nd	nd	nd
120	$2,47 \pm 0,19^b$	nd	nd	nd

* Não foram detectados óxidos de colesterol nos tempos 0 e 30 dias de estocagem.

Números seguidos de letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Valores expressos como a média $\pm$ desvio padrão de análises em triplicatas. Nd = não detectado

Durante os 120 dias de armazenamento houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) no teor de 7-ceto, ocorrendo variações para a amostra controle em 60 a 120 dias de armazenamento. O lombo grelhado (base úmida e base seca) apresentou comportamento semelhante às amostras cruas, o tratamento térmico não alterou os teores de 7-ceto das amostras estudadas.

O 7α -OH foi detectado nas amostras controle grelhada no tempo 60 dias de armazenamento ($2,00 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$, base úmida). A predominância do 7α -hidroxicolesterol sobre seu isômero β já foi reportada anteriormente em carne suína (PARK e ADDIS, 1987; RUDZINSKA et al., 2007), em outras matrizes como carne de frango (ECHARTE et al., 2003) e ovo desidratado (MAZALLI e BRAGAGNOLO, 2007).

De acordo com Tai et al. (1999) o uso apropriado de antioxidantes em combinação com o material de embalagem usados nos produtos representam uma barreira contra o ar e a luz, impedindo a formação de óxidos de colesterol. Além disso, durante o procedimento analítico utilizado neste trabalho, varias medidas foram tomadas para evitar a formação de artefatos, evitando a incidência de luz durante a extração e saponificação e o uso de baixas temperaturas e atmosfera inerte (N_2).

5.6. Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A quantificação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico foi usada para medir o índice de oxidação dos lipídios. A análise de TBARS foi realizada para os quatro tratamentos nas amostras grelhadas cujos resultados calculados em base úmida e base seca estão apresentados nas Tabelas 21 e 22.

A formação de TBARS na carne suína grelhada adicionada de urucum + eritorbato de sódio e eritorbato de sódio se manteve constante durante os 120 dias e não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Os valores de TBARS na amostra controle se diferenciaram dos demais tratamentos e apresentaram um aumento até o 45º dia de estocagem, diminuindo após 75 dias e se estabilizando (Figura 15). A amostra contendo apenas urucum apresentou o

mesmo comportamento da amostra controle, mas seus valores não se diferenciaram das amostras que apresentavam eritorbato de sódio em sua formulação.

Tabela 21: Resultados de TBARS (μmol de malonaldeído/ Kg de carne, base úmida) em lombo suíno com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenados a -18°C e posteriormente grelhado.

Dia	Controle	Urucum	Urucum + Eritorbato	Eritorbato
0	$87,70 \pm 1,91^a$	$23,64 \pm 2,45^a$	$11,14 \pm 0,30^{a,b}$	$10,94 \pm 0,34^{a,b}$
15	$75,38 \pm 6,39^a$	$19,07 \pm 4,18^a$	$11,52 \pm 0,74^a$	$10,21 \pm 0,20^b$
45	$126,86 \pm 16,80^b$	$32,04 \pm 1,11^b$	$12,57 \pm 0,15^a$	$13,31 \pm 0,34^a$
60	$46,42 \pm 5,62^c$	$16,49 \pm 0,81^{c,a}$	$10,72 \pm 1,12^{a,b}$	$10,36 \pm 0,02^b$
75	$14,04 \pm 0,10^d$	$12,62 \pm 0,09^c$	$10,80 \pm 0,61^{a,b}$	$10,16 \pm 1,73^a$
90	$16,45 \pm 0,24^d$	$12,11 \pm 0,65^c$	$9,21 \pm 0,04^{b,c}$	$9,31 \pm 0,51^b$
120	$14,31 \pm 0,32^d$	$10,55 \pm 0,01^c$	$8,20 \pm 0,19^c$	$10,18 \pm 0,12^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Valores expressos como a média $\pm$ desvio padrão de análises em triplicatas

Tabela 22: Resultados de TBARS (μmol de malonaldeído/ Kg de carne, base seca) em lombo suíno com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenados a -18°C e posteriormente grelhado.

Dia	Controle	Urucum	Urucum + Eritorbato	Eritorbato
0	$261,79 \pm 5,71^a$	$69,23 \pm 7,18^a$	$33,53 \pm 0,90^{a,b}$	$34,18 \pm 1,06^{a,b}$
15	$225,00 \pm 19,08^a$	$55,85 \pm 12,25^a$	$34,67 \pm 2,23^a$	$31,89 \pm 0,61^a$
45	$376,30 \pm 24,23^b$	$93,84 \pm 3,26^b$	$37,82 \pm 0,45^a$	$41,58 \pm 1,05^a$
60	$138,58 \pm 16,76^c$	$48,31 \pm 2,37^{c,a}$	$32,26 \pm 3,37^{a,b}$	$32,35 \pm 0,06^b$
75	$41,90 \pm 0,30^d$	$36,98 \pm 0,27^c$	$32,50 \pm 1,82^{a,b}$	$31,73 \pm 5,41^b$
90	$49,12 \pm 0,73^d$	$35,48 \pm 1,90^c$	$27,70 \pm 0,11^{b,c}$	$29,09 \pm 1,60^b$
120	$42,73 \pm 0,96^d$	$30,90 \pm 0,90^c$	$24,66 \pm 0,47^c$	$31,79 \pm 0,37^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Valores expressos como a média $\pm$ desvio padrão de análises em triplicatas

A homogeneização das amostras favorece a incorporação de oxigênio à carne, além de romper a estrutura do tecido fazendo com que o átomo de Fe^{2+} ,

da molécula de mioglobina, entre em contato com as moléculas de ácido graxo insaturado, atuando assim como agente iniciador e catalisador da reação acelerado pelo tratamento térmico. A presença de oxigênio afeta a taxa de oxidação, principalmente nas amostras grelhadas, já que o processamento térmico fornece a energia necessária para a geração de radicais livres que em presença de oxigênio dão origem aos hidroperóxidos, os quais irão se decompor gerando diversos produtos incluindo aldeídos, sendo o malonaldeído a principal substância a reagir com o ácido tiobarbitúrico (HOYLAND e TAYLOR, 1991).

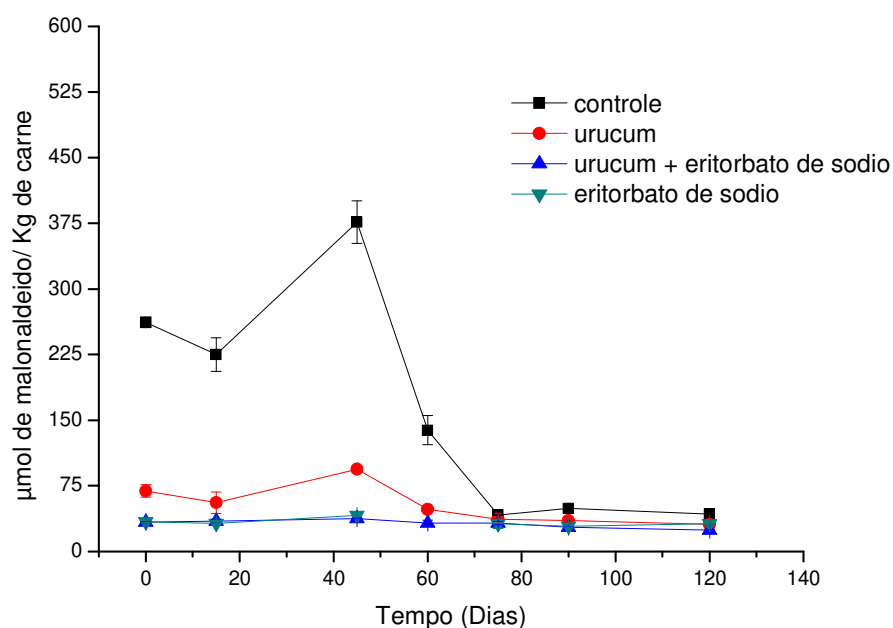


Figura 14 – Teores de TBARS (μmol de malonaldeído/ Kg de carne, Base seca) em lombo suíno com e sem adição de urucum e/ou eritorbato de sódio armazenadas a -18°C por 120 dias e submetidas a tratamento térmico

6. CONCLUSÃO

A adição de eritorbato de sódio e/ou urucum aos hambúrgueres de carne suína foi suficiente para reduzir a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico durante o tratamento térmico. Foram identificados 5 óxidos de colesterol sendo, 7-ceto, 7 α -OH, 7 β -OH, α -epóxi e o β -epóxi dos quais apenas o 7-ceto e 7 α -OH foram quantificados nas amostras controle. O teor de 7-ceto aumentou até 90 dias e diminuiu aos 120 dias e o 7 α -OH foi quantificado apenas no tempo 120 dias. O teor de colesterol foi reduzido em média 15% após o tratamento térmico. Os ácidos graxos predominantes foram 18:1n-9, 16:0, 18:2n-6, 18:0 e 16:1n-7, os quais representam cerca 97% do total de ácidos graxos identificados. Os teores de AGM e AGP diminuíram significativamente devido ao tratamento térmico independente da adição de urucum e/ou eritorbato de sódio. Ao término do armazenamento os AGM reduziram apenas nas amostras controle e urucum. Houve perda significativa de AGP durante o armazenamento para todos os tratamentos estudados. A maior porcentagem de perda foi observada para as amostras controle e com urucum, seguidas das amostras contendo eritorbato de sódio e eritorbato de sódio + urucum. Os resultados obtidos para óxidos de colesterol, TBARS e alteração na composição de ácidos graxos confirmam o efeito antioxidante do eritorbato de sódio na carne suína.

7. REFERÊNCIAS

ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Carne Suína Brasileira**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/materia53.html>. Acesso em 7/10/2009.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official methods of the analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16. ed. Washington: **AOAC**, 1997.

ARES, M. P., PORN-ARES, M. I., MOSES, S., THYBERG, J., JUNTTI-BERGGREN, L., BERGGREN, P., HULTGARTH-NILSSON, A., KALLIN, B., NILSSON, J.; 7 β -hydroxycholesterol induces Ca²⁺ oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, 153, 23-23, 2000.

BAGGIO, S. R., BRAGAGNOLO, N.; Fatty acids, cholesterol oxides and cholesterol in Brazilian processed chicken products. **J. Food Sci.**, 2, 799-208, 2006.

BAGGIO, S. R., BRAGAGNOLO, N.; Cholesterol oxide, cholesterol, total lipid and fatty acid content in processed meat products during storage. **Lebensm. Wiss. Technol.**, 25, 412, 1992.

BAGGIO, S. R., BRAGAGNOLO, N.; Lipid Fraction Quality Evaluation of Brazilian Meat-based Products. **J. Braz. Chem. Soc.**, 19, 463-470, 2008.

BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 5th ed., John Wiley: New York, 1996, vol. 3.

BASCOUL, J., DOMERGUE, N., MOUROT, J., DERBY, G., CRASTES DE PAULET, A. Intestinal absorption and fecal excretion of 5,6 α -epoxy-5 α -cholesta-3 β -ol by the male Wistar rat. **Lipids**, 21, 744-747, 1986.

BERLINER, J. A.; HEINECKE, J. W.; The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Rad. Biol. Med.**, 20 (5), 707-725, 1996.

BERSET, C., CUVELIER, M.E. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 16, 1007-1012, 1996.

BOHAC, C. E., RHEE, K. S.; Influence of animal diet and muscle location on cholesterol content of beef and pork muscle, **Meat Sci.**, 23, 71, 1998.

BOHM, V., PUSPITASARI-NIENABER, N.L., FERRUZZI, M.G., SCHWARTZ, S. J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different

geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene and zeaxanthin. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 221-226, 2002.

BÖSINGER, S., LUF, W., BRANDL, E. Oxysterols: their occurrence and biological effects. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.3, p.1-33, 1993.

BRAGAGNOLO, N., DANIELSEN, B., SKIBSTED, L. H. Effect of rosemary on lipid oxidation in pressure-processed, minced chicken breast during refrigerated storage and subsequent heat treatment. **Eur. Food Res. Technol.**, 221, 610-615. 2005.

BRAGAGNOLO, N., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; Teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em cortes de carne suína, **Ciênc. Tecnol; Aliment.**, 22, 98, 2002.

BRAGAGNOLO, N., RODRIGUEZ-AMAYA, D. R.; Teores de colesterol em carne suína e bovina e efeito do cozimento, **Ciênc. Tecnol; Aliment.**, 15, 11, 1995.

BRANER. A. L.; DAVIDSON, P. M.; SALMINEN, S. THORNGATE III, J.H.; **Food additives**, 2 edition, New York, 2002.

BROWN, O., JESSUP, W.; Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, Shannon, 142, p 1-28, 1999.

BUEGE, D. R., INGHAM, B. H., HENDERSON, D. W., WATTERS, E. J., BORCHERT, L. L., CRUMP, P. M., HENTGES, E. J.; A nationwide audit of the composition of pork and chicken cuts at retail. **J Food Compos. Anal.**, 11, p 249-261, 1998.

CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and cardiovascular disease: further evidence and insights. **Nutr. Res.**, 24: 761-772, 2004.

CASTRO, W. F. ; MARIUTTI, L.R.B. ; BRAGAGNOLO, N. . The effects of colorífico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. **Food Chem.**, 2010.

CERQUEIRA, F. M., MEDEIROS, M. H. G., AUGUSTO, O.; Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectiva. **Quím. Nova**, 30, 441 – 449, 2007.

CHANG, S. H., GRAY, J. I., GOMAA, E. A., HARTE, B. R., KELLY, P. M., BUCLEY, D. J. Cholesterol oxidation in whole milk powders as influenced by processing and packing. **Food Chem.**, Amsterdam, v.47, p. 321-328, 1993

CHEN, Q.; SHI, H.; HO, C. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, Champaign, 69, 999-1002, 1992.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, 71: 1715-1755, 2000.

CORONADO, S. A., TROUT, G. R., DUNSHEA, F. R., SHAH, N. P.; Antioxidants effects of Rosemary extract and whey poder on the oxidative stability of wiener sausages during 10 months frozen storage. **Meat Sci**, 62, 217 – 224, 2002.

COULTATE, T. P.; **Alimentos: a química de seus componentes**. Artmed, 3 ed, Porto Alegre, 63-100p, 2004.

CSALLANY, A. S., KINDOM. S. E., ADDIS, P. B., LEE, J.;HPLC method for quantification of cholestero9l and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Lipids**, 24, 645-651, 1989.

DEMAN, J. M.; **Principles of food chemistry**. Springer, Verlag.1999.

DI MASCIO, P.D., KAISER, S., SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.**, 274, 532-538, 1989.

ECHARTE, M., ANSORENA, D., ASTIASARÁN, I. Consequences of microwave heating and frying on the lipid fraction of chicken and beef patties. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 5941-5945, 2003.

ECHARTE, M., ANSORENA, D., ASTIASARÁN, I. Fatty acids modifications and cholesterol oxidation in pork loin during frying at different temperatures, **J. Food Prot.**, 64, 1062, 2001.

UNSER, M., HALLETT, K., HEWITT, B., FURSEY, G. A. J., WOOD, J. D.; Fatty acid content and composition of English beef, lamb and pork at retail. **Meat Sci.**, 42, 443-456, 1996.

ERICKSON, M. C.; Lipids Oxidation of Muscle Foods, In **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology** (AKOH, C. C; DAVID, M. B.) Marcel Dekker, New York, 365-412, 2002.

ERKKILÄ, A.; MELLO V. D. F.; RISÉRUS, U.; LAAKSONEN, D. E. Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach. **Progr. Lipid Res.**, 47: 172-187, 2008.

FAHY E, SUBRAMANNIAM S, BROWN HA, GLASS CK, MERRIL AH, MURPHY RC et al. A comprehensive classification system for lipids. **J Lipid Res** 2005; 46:840-861.

FAUSTMAN, S. L., DJORDJEVIC, D., DECKER, E.A. Effect of antioxidants on stabilization of meat products fortified with *n* – 3 fatty acids. **Meat Sci.**, 72, 18-24, 2006.

FINOCCHIARO E.T., RICHARDSON T. Sterol oxides in foodstuffs: A Review. **J Food Prot.**, 46, 917-29. 1983.

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, 226, 497-509, 1957.

GALINDO-CUSPINERA, V., LUBRAN, M.B., RANKUN, S. Comparison of Volatile Compounds in Water- and Oil-Soluble Annatto (*Bixa orellana* L.) Extracts. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 2010-2015. 2002.

GARCIA-CRUSET, S., CARPENTER, K.L.H., CODONY, R., GUARDIOLA, F. Cholesterol oxidation products and atherosclerosis. In **Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence, and biological effects**, F. Guardiola, P.C.Dutta, R. Codony, G.P. Savage, Ed. Springer: Champaign, pp 241-277, 2002.

GUARDIOLA, F., CODONY, R., ADDIS, P. B., & RAFECAS, M. Biological effects of oxysterols:current status. **Food Chem. Toxic.** 34, 2, 193-211, 1996.

GUMULKA, J.; PYREK, J.S.; SMITH, L.L. Interception of discrete oxygen species in aqueous media by cholesterol: formation of cholesterol epoxides and secosterols. **Lipids**, 17, 197-203, 1982.

HAILA, K., LIEVONEN, S.M., HEINONEN, M.I. Effects of lutein, lycopene, annatto and γ -tocopherol on autoxidation of triglycerides. **J. Agric. Food Chem.**, 44, 2096-2100, 1996.

HE, K.; DAVIGLUS, M. L.; LIU, K.; HORN, L. V. H.; DYER, A. R.; GOLDBOURT, U.; GREENLAND, P. Fish consumption and incidence of stroke – a meta-analysis of cohort studies. **Stroke**, 35: 1538-1542, 2004.

HENRY, B. Natural food colours. In **Natural Food Colorants**; Hendry, G., Houghton, J., Eds.; Blackie Academic and Professional: Glasgow, U.K., 1996, p 40-79.

HEYMANN, H. et al.; Sensory and chemical characteristics of fresh pork roast cooked to different endpoint temperatures. **J Food Sci.**, 55, 613, 1990.

HINO, T., KAWANISHI, S., YASUI, H., OKA, S., & SAKURAI, H. Antilipid-peroxidative compound: its chemical and biochemical characterizations. **Biochim. Biophys. Acta.** 1425, 1, 47-60, 1998.

HUTCHISON, G. I., THOMAS, D. E., TRUSWELL, A. S.; Nutrient composition of Australian beef, **Food Technol Aust.**, 39, 199, 1987.

IMAI, H., WERTHESSEN, N. T., SUBRAMANYAM, V., LEQUESNE, P. W., SOLOWAY, A. H., KANISAWA, M. Angiotoxicity of oxygenated sterols and possible precursors. **Science**, London, v.207, p.651-653, 1980.

IMAO, K., WANG, H., KOMATSU, M., & HIRAMATSU, M. Free radical scavenging activity of fermented papaya preparation and its effect on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in iron- induced epileptic foci of rats. **Mol. Biol. Int.** 1998, 45, 1, 11-23, 1998.

JOSEPH, J.D.; ACKMAN, R.G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **J. AOAC Int.**, 75: 488-506, 1992.

KESAVA RAO, V. et al.; Lipid oxidation and development of cholesterol oxidation in pork during cooking and storage, **J. Food Sci. Technol.**, 36, 24, 1999.

KIOKIAS, S., GORDON, M.H.; Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chem.**, 83, 523-529, 2003.

KOLAKOWSKA, A.; The oxidability of krill lipids, **Pol. Polar Res.**, 12(1), 89, 1991.

KUMAR, N., SINGHAL, O. P.; Effect of processing condition on the oxidation of cholesterol in ghee, **J. Sci. Food Agric.**, 58, 267, 1992.

LEE, J. I., KANG, S., AHN, D.U., LEE, M. Formation of cholesterol oxides in irradiated raw and cooked chicken meat during storage. **Poult. Sci.**, 80, 105-108, 2001.

LEONARDUZZI, G., SOTTERO, B., POLI, G. Oxidized products of cholesterol: Dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). **J. Nut. Biochem.**, 13, 700-710, 2002.

LINSEISEN, J., WOLFRAM, G. Origin, metabolism, and adverse health effects of cholesterol oxidation products. **Fett/Lipid**, Weinheim, v. 100, n.6, p.211-218, 1998b.

LINSEISEN, J., WOLFRAM, G. Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans. **Ann. Nutr. Metab.**, Basel, v.42, p.221-230, 1998a.

MADSEN, H. L., BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends Food Sci. Techol.**, 6, 271-277, 1995.

MANCINI, R.A., SEYFERT, M.C., HUNT, M., KROPF, D.H., HACHMEISTER, K.A., HERALD, T.J., JOHNSON, D.E. Comparison of ascorbic acid and sodium erythorbate: Effects on the 24 h display colour of beef lumbar vertebrae and longissimus lumborum packaged in high-oxygen modified atmospheres. **Meat Sci.**, 75, 39-43, 2007.

MARIUTTI, L.R.B., NOGUEIRA, G C., BRAGAGNOLO, N. Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides

extraction in chicken meat using response surface methodology. **J. Agric. Food Chem.**, 56, 2913-2918, 2008.

MARTÍNEZ-TOMÉ, M., JIMÉNEZ, A. M.; RUGGIERI, S., FREGA, N., STRABBIOLI, R., MURCIA, M. A. Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. **J. Food Protec.**, 64(9): 1412-1419, 2001.

MAZALLI, M. R. ; Bragagnolo, N. . Effect of storage on cholesterol oxide formation and fatty acid alterations in egg powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 55, p. 2743-2748, 2007.

MC CARTHY, T. L. KERRY, P., KERRY, J., LYNCH, FP. B., BUCKLEY, D. J. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. **Meat Sci.**, 57. 177-184, 2001.

MCCLEMETS, D. J., DECKER, E. A.; Lipideos, em **Química de alimentos de Fennema** (DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R.) Artmed, porto Alegre, 131-178, 2010

MENENDEZ, J. A., VELLON, L., COLOMER, R., LUPU, R.; Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin TM) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. **Annals of Onc.**, 16, 359-371, 2005.

MILES, R. D.; Eggs important in diet, unfairly criticized as heart disease risk. **Freedstuffs**, p.26-51, 1989.

MONAHAN, F. J.; Influence of dietary treatment on lipid and cholesterol oxidation in pork, **J. Agric. Food Chem.**, 40, 1310, 1992.

MONTENEGRO, M.A., RIOS, A. DE O., MERCADANTE, A.Z., NAZARENO, M. A.; BORSARELLI, C.D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **J. Agric. Food Chem.** 52, 367-373, 2004.

MURRIETA, C. M., HESS, B. W., RULE, D. C. Comparison of acidic and alkaline catalysts for preparation of fatty acids methyl esters from ovine muscle with emphasis on conjugated linoleic acid. **Meat Sci.**, 65, 523 – 529. 2003.

NELSON, D. L., COX, M. M.; **Lehninger Principípios de Bioquímica**. 3ª Edição, New York, p. 608-609, 2002.

O'KEEFE, S. F., Nomenclature and Classification of Lipids, In **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology** (AKOH, C. C; DAVID, M. B.) Marcel Dekker, New York, 1-40, 2002.

OSADA, K., KODAMA, T., CUI, L., YAMADA, K., SUGANO, M. Levels and formation of oxidized cholesterol in processed marine. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.41, p.1893-1998, 1993.

OSADA, K. Cholesterol oxidation products: other biological effects. In **Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence, and biological effects**, F. Guardiola, P.C. Dutta, R. Codony, G.P. Savage, Ed. Springer, Champaign, pp 278-318, 2002.

PATEL, R. P., DICZFALUSY, U., DZELETOVIC, S., WILSON, M. T., DARLEY-USMAR, V. M.; Formation of oxysterols during oxidation of low density lipoprotein by peroxynitrite, myoglobin, and copper, **J. Lipid Res.**, 37, 2361-2371, 1997.

PARK, S. W., ADDIS, P. B.; Cholesterol oxidation products in some muscle foods. **J. Food Sci.**, 52, 1500, 1987.

PENG, S., HU, B., MORIN, R. J. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.5, p.144-152, 1991.

PEREIRA, N. R.; TARLEY, C. R. T., MATSUSHITA, M., SOUZA, N. E.; Proximate composition and fatty acid profile in Brazilian poultry sausages. **J. Food Comp. Anal.**, 13, 915-920, 2000.

PIE, J. E., SPAHIS, K., SEILLAN, C. Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. **J. Agric. Food Chem.**, 39, 250-254, 1991.

PIIROMEN, V., TOIVO, J., LAMPI, A. M.; New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs and their products consumed in Finland, **J. Food Comp. Anal.**, 15, 705, 2002.

RAMALHO, V. C., JORGE, N.; Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quím. Nova**, 29, 755 – 760, 2006.

RANIREZ, M. R., MORCUENDE, D., ESTÉVEZ, M., LÓPEZ, R. C.; Fatty acid profiles of intramuscular fat from pork loin chops fried in different culinary fats following refrigerated storage. **Food Chem.**, 92, 159-167, 2005.

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, p. 489-516, 2002.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C.; Validação em metodologia cromatográfica e eletroforéticos. **Quim. Nova**, 27, 771-780, 2004.

RODRIGUES-ESTRADA, M. T., PENAZZI, G., CABONI, M. F., BERTACCO, G., LERCKER, G.; Effect of different cooking methods on

some lipids and protein components of hamburgers. **Meat Sci.**, 45, 365-375, 1997.

ROSE-SALLIN, C., SIEBER, R., BOSSET, J. O. & TABACCHI, R. (1996). **Cholesterol oxidation mechanisms**. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides*, 3(3), 227-235.

SALDANHA, T., SAWAYA, A. C.H.F., EBERLIN, M.N., BRAGAGNOLO, N. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV and APCI-MS detectors. **J. Agric. Food Chem.**, 54, 4107-4113, 2006.

SEPE, H. A., FAUSTMAN, C., LEE, S., TANG, J., SUMAN, S. P., VENKITANARAYANAN, K. S.; Effects of reducing agents on premature browning in ground beef. **Food Chem.** 93, 571 – 576, 2004.

SEVANIAN, A., PETERSON, A. R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.24, n.10/11, p.1103-1110, 1986.

SILVA, J. A.; **Tópicos da tecnologia dos alimentos**. São Paulo, Ed. Varela, 2000, 227p.

SCHLESINGER, L., UAUY, R.. Nutrition and neonatal immune function. **Seminar in Perinatology**, 15, 469-477, 1991.

SMITH, L. L. Cholesterol Autoxidation. **Chem. Physis. Lipids**, 44, 87, 1987.

SMITH, L. L., JOHNSON, B. H. Biological activities of oxysterols. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.7, p.285-332, 1989.

SWIZE, J. B. et al.; Cholesterol content of lean and fat from beef, pork, and lamb cuts. **J. Food Comp. Anal.**, 5, 160, 1992.

TAI, C.-Y., CHEN, Y. C., CHEN, B. H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in food: An overview (Part I). **J. Food Drug Anal.**, Nankang, v.7, n. 4, p. 243-257, 1999.

TERRA, N. N. **Apontamentos sobre tecnologia de carnes**, São Leopoldo, Ed. UNISINOS, 1998, 216p.

UAUY, R., HOFFMAN, D. R.; Essential fatty acid requirements for normal eye and brain development. **Seminar in Perinatology**, 15, 449-455, 1991.

USDA - United States Department of Agriculture; Livestock and poultry: world markets and trade. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline> acessado em: 15/03/2010.

VERLEYEN, T. et al.; Cholesterol oxidation in tallow during processing, **Food Chem.**, 83, 185, 2003.

VINE, D. F., CROFT, K. D., BEILIN, L. J., MAMO, J. C. L. Absorption of dietary cholesterol oxidation products and incorporation into rat lymph chylomicrons. **Lipids**, Champaign, v.32, n.8, p.887-893, 1997.

WILKINSON, A. L., SUN, Q., SENEAL. A., FAUSTMAN, C.; Antioxidante effect on TBARS and fluorescence measurements in freeze dried meats. **J. Food Sci**, 66, 20 – 24, 2001.

WOOD, J. D.; ENSER, M.; FISHER, A. V.; NUTE, G. R.; SHEARD, P. R.; RICHARDSON, R. I.; HUGHES, S. I.; WHITTINGTON, F. M.; Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. **Meat Sci.**, 78, 343 – 358, 2008.

YAO, P., TABAS, I.; Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fats pathway. **J. Biolog. Chem.**, 275, 23807-23813, 2000.

ZUNIN, P., EVANGELISTI, F., CABONI, M. F., PENAZZI, G., LERCKER, G. TIOSCORNIA, E. Cholesterol oxidation in baked foods containing fresh and powdered eggs. **J. Food Sci.**, 60, 5, 913-916, 1995.