

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

EFEITO DA ADIÇÃO DE SÁLVIA E ALHO NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA
EM CARNE DE FRANGO

LILIAN REGINA BARROS MARIUTTI

Engenheira de Alimentos / Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. NEURA BRAGAGNOLO

Orientadora

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

Campinas 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M339e Mariutti, Lilian Regina Barros
Efeito da adição de sálvia e alho na oxidação lipídica em carne de frango. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Neura Bragagnolo
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Antioxidantes naturais. 2. Tratamento térmico. 3. Alta pressão. 4. Óxidos de colesterol. 5. Armazenamento. I. Bragagnolo, Neura. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Effect of sage and garlic addition on lipid oxidation in chicken meat
Palavras-chave em inglês (Keywords): Natural antioxidants, Thermal treatment, High pressure, Cholesterol oxides, Storage

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Neura Bragagnolo
Adriana Zerlotti Mercadante
Aline Mondini Calil Racanicci
Mônica Roberta Mazalli
Sueli Regina Baggio

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Neura Bragagnolo
(orientadora)

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
FEA-UNICAMP

Profa. Dra. Aline Mondini Calil Racanicci
ESALQ-USP

Profa. Dra. Mônica Roberta Mazalli
FZEA-USP

Profa. Dra. Sueli Regina Baggio
ITAL

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, em especial ao Laboratório de Química de Alimentos, e ao Departamento de Ciência de Alimentos da Royal Veterinary and Agricultural University (KVL), por proporcionarem a realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Neura Bragagnolo pela orientação, pelas oportunidades de intercâmbio e aprendizado e pela sua inestimável amizade e companheirismo.

Aos professores Leif Skbisted e Vibeke Orlien pela orientação no período de estágio na Dinamarca.

À Banca Examinadora pelas preciosas contribuições.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos, em particular ao Dr. Marcelo Antonio Morgado, pela realização das análises de metais e a Poli-Nutri Alimentos pela criação dos frangos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos e apoio financeiro ao projeto.

À Gislaine Nogueira por sua amizade sincera e verdadeira, pelo seu apoio durante toda a execução dos experimentos, por sua companhia em todos os momentos, pelas infundáveis discussões técnicas e por se divertir com minhas “teorias de conspiração”.

Ao meu marido Eduardo e meus “filhotes” pelo amor e carinho, pela compreensão e incentivo.

Às professoras Adriana Zerlotti Mercadante e Florinda Orsatti Bobbio pela amizade e contribuição ao meu desenvolvimento científico.

Aos meus colegas de laboratório Renata Cury, Adélia, Gisela, Mônica, Leila, Veridiana, Wellington, Daniela, Fernanda, Fabíola, Renata Sancho, Poliana, Renan, Mery, Michele, Liliane, Marcela, Gabriel, às técnicas Rosemar e Karla e a todos os outros que por lá passaram neste período, prometo continuar sempre rindo como vocês gostam.

Aos meus pais e familiares pela minha ausência e pela compreensão.

A todos muito obrigada.

Lilian Mariutti

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	xi
GENERAL SUMMARY	xv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1.....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: A OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNE DE FRANGO E O USO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS	5
Resumo	7
1. Introdução.....	8
2. Colesterol e óxidos de colesterol	8
3. Ácidos graxos	12
4. Espectroscopia de ressonância elétron-spin (ESR)	17
5. Efeitos do processamento e do armazenamento sobre a oxidação lipídica em carne de frango	22
5.1. Tratamento térmico	23
5.2. Alta pressão	29
6. O uso de sálvia (<i>Salvia officinalis</i>) e alho (<i>Allium sativum</i>) como antioxidantes.....	31
6.1. Sálvia (<i>Salvia officinalis</i>).....	33
6.2. Alho (<i>Allium sativum</i>)	34
7. Conclusão.....	37
Referências	38
CAPÍTULO 2.....	55
OPTIMIZATION AND VALIDATION OF ANALYTICAL CONDITIONS FOR CHOLESTEROL AND CHOLESTEROL OXIDES EXTRACTION IN CHICKEN MEAT USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY	55
ABSTRACT	57
INTRODUCTION	58
MATERIAL AND METHODS.....	59
Chemicals and Reagents	59

Chicken Samples.....	60
Experimental Design.....	60
Method Validation	61
HPLC Analysis.....	62
HPLC-APCI-MS Analysis	65
Moisture Content.....	65
Total Lipid Content.....	65
Statistical Analysis	66
RESULTS AND DISCUSSION.....	66
Optimization of Saponification and Extraction Conditions.....	66
Validation of the Analytical Methodology	70
Incidence of COP and Alterations in Cholesterol Content in Chicken Breast Cooked under Different Conditions	72
LITERATURE CITED.....	76
SUPPORTING INFORMATION	80
 CAPÍTULO 3.....	 85
SOLID PHASE MICROEXTRACTION – GAS CHROMATOGRAPHY FOR THE EVALUATION OF SECONDARY LIPID OXIDATION PRODUCTS IN CHICKEN PATTIES DURING LONG-TERM STORAGE	 85
Resumo	87
Abstract	88
Introduction.....	89
Experimental.....	90
Chemicals and Reagents	90
Preparation of Chicken Patties.....	91
Optimization of Secondary Lipid Oxidation Volatiles Extraction by SPME	91
GC Analysis	92
Analysis of thiobarbituric acid reactive substances.....	92
Moisture Content.....	93
Statistical Analysis	93
Results and Discussion.....	93
Optimization of SPME Conditions	93

Formation of Secondary Lipid Oxidation Products in Chicken Meat During Storage.....	99
Conclusions	102
References	102
 CAPÍTULO 4.....	 105
AÇÃO DA SÁLVA E DO ALHO NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNE DE FRANGO DURANTE O TRATAMENTO TÉRMICO E ARMAZENAMENTO	 105
Resumo	107
1. Introdução.....	108
2. Material e Métodos	111
2.1. Material	111
2.1.1. Criação das Aves	111
2.1.2. Preparo da Amostra	112
2.2.2.Composição de Ácidos Graxos	114
2.2.3. Análise das Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	115
2.2.4. Determinação Pentanal, Hexanal e Malonaldeído	115
2.2.5. Determinação da Vitamina E.....	115
2.2.6. Determinação do Teor de Lipídios Totais e Umidade	116
2.2.7. Determinação de Minerais	116
2.2.8. Análise Estatística.....	117
3. Resultados e Discussão.....	117
3.1. Teor de Lipídios e de Umidade	117
3.2. Composição de Ácidos Graxos	118
3.3. Formação de Produtos Secundários da Oxidação Lipídica	123
3.4. Colesterol e Formação de Óxidos de Colesterol	132
3.5. Degradação da Vitamina E	138
3.6. Influência do Cloreto de Sódio	139
3.7. Correlação Entre os Métodos Utilizados Para Determinar a Atividade Antioxidante da Sálvia e do Alho em Carne de Frango.....	 141
4. Conclusão.....	142
5. Referências.....	146
MATERIAL SUPLEMENTAR	155

CAPÍTULO 5.....	159
EFFECT OF SAGE AND GARLIC ON LIPID OXIDATION IN HIGH-PRESSURE PROCESSED CHICKEN MEAT	159
Abstract	161
Introduction.....	162
Materials and methods.....	163
Preparation of chicken meat samples	163
High-pressure processing	164
Packaging and storage	165
Analysis of thiobarbituric acid reactive substances.....	165
Color measurements.....	165
Vitamin E determination	166
Preparation of lipid and aqueous phase systems	166
High-pressure processing	167
ESR spectroscopy	167
Free radical scavenging capacity of the spices extracts	168
Total phenolic analysis.....	169
Statistical analysis.....	170
Results and discussion	170
References	182
CONCLUSÃO GERAL	185

RESUMO GERAL

A carne de frango é um alimento altamente suscetível à oxidação lipídica em função do alto teor de ácidos graxos insaturados na sua composição. A formação de óxidos de colesterol e as alterações na composição de ácidos graxos, e a consequente formação de compostos voláteis provenientes da oxidação lipídica, possuem um papel de destaque dentre os fatores que causam perda de qualidade e das características nutricionais durante o processamento e o armazenamento da carne de frango. A adição de antioxidantes é uma das alternativas utilizadas para minimizar a formação destes compostos indesejados.

A otimização dos parâmetros utilizados para extração e saponificação de carne de frango para determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol foi realizada através de planejamentos experimentais sequenciais, visando obter resultados confiáveis e reprodutíveis, além de minimizar o consumo de reagentes e o tempo de análise. A metodologia foi validada para linearidade, recuperação, repetibilidade e limites de detecção e de quantificação. Amostras de peito de frango cru, frito, cozido e assado em forno comum e elétrico giratório foram analisadas para aplicação da metodologia validada.

A formação de hexanal, pentanal e malonaldeído em hambúrgueres de frango cru e grelhado durante o armazenamento a -18 °C por 90 dias foi avaliada por microextração em fase sólida (SPME) no *headspace*, utilizando fibras DVB/CAR/PDMS, e cromatografia gasosa. As condições de extração foram

otimizadas para obtenção de resultados reprodutíveis e evitar a saturação da fibra, mesmo para as amostras mais oxidadas. O desempenho de diferentes fibras de DVB/CAR/PDMS foi verificado durante a estocagem e o coeficiente de variação (CV) foi calculado para 60 determinações em duplicata. Não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre os CV das sete fibras utilizadas no experimento, independentemente do número de vezes que foram usadas. As amostras cruas apresentaram correlações de Pearson significativas ($p < 0,05$) entre todos os parâmetros analisados, variando entre 0,93 e 0,99. Entretanto, para as amostras grelhadas, apenas a correlação de 0,98 entre hexanal e pentanal foi significativa.

Foram criados 51 frangos da raça Cobb em uma granja experimental com alimentação controlada especificamente para o desenvolvimento da pesquisa. Os filés de frango foram triturados em multiprocessador após a retirada da pele e da gordura externa aparente e foram adicionados sal, sálvia desidratada ou alho desidratado. Após a mistura de sal e/ou dos condimentos, hambúrgueres pesando 60 ± 1 g foram moldados e a metade destes foi grelhada a 170°C , por 4 minutos, de cada lado, até que a temperatura interna atingisse 70°C . Os hambúrgueres crus e grelhados foram embalados em sacos de polietileno permeáveis ao oxigênio e estocados no escuro a -18°C durante 90 dias. A adição de sálvia à carne de frango mostrou ser um método eficaz para minimizar e retardar a oxidação dos lipídios e do colesterol, sendo também capaz de parcialmente contrapor os efeitos pró-oxidantes da adição de sal. Por outro lado, os resultados obtidos para a adição de alho apresentaram um comportamento variável de acordo com a metodologia utilizada para monitorar a oxidação, confirmando os

resultados controversos encontrados na literatura, sugerindo que o alho não atua como antioxidante nesta matriz.

Filés de frango congelados foram adquiridos diretamente da indústria (Rose Poultry, Dinamarca). Após o descongelamento e a retirada da pele e da gordura externa aparente, a carne foi triturada em multiprocessador. Sálvia desidratada, alho desidratado e a mistura dos dois condimentos foram adicionados ao peito moído e almôndegas pesando 30 g foram moldadas, embaladas a vácuo em sacos de polietileno e submetidas imediatamente à alta pressão. A sálvia foi capaz de conter a oxidação lipídica em peito de frango moído processado sob alta pressão, durante o armazenamento a 4°C por 2 semanas, enquanto o alho teve efeito pró-oxidante, o qual foi parcialmente minimizado pela adição simultânea de sálvia. Através da análise da taxa de oxidação lipídica, medida como TBARS, o volume de ativação aparente foi estimado para a oxidação induzida pela pressão, durante o armazenamento, mostrando que o efeito pró-oxidante do alho e da pressão foram aditivos. Os mecanismos envolvidos na ação da sálvia e do alho na oxidação lipídica foram verificados através da avaliação do efeito da pressão na formação de radicais livres em um sistema modelo de carne de frango com o uso de espectroscopia de ressonância paramagnética (ESR), indicando que a alta capacidade da sálvia de desativar os radicais livres na fase lipídica é o principal mecanismo do seu efeito protetor.

GENERAL SUMMARY

Chicken meat has a high content of polyunsaturated fatty acids so becoming quite prone to lipid oxidation. The cholesterol oxidation, the changes in fatty acids profile, and the formation of volatile aldehydes derived from lipid oxidation could be considered as the main factors that are responsible for the quality and nutritional losses during processing and storage. The addition of antioxidants to the meat is one of the ways that can be used to minimize the formation of these undesirable compounds.

The extraction and saponification parameters were optimized for the simultaneous detection of cholesterol and cholesterol oxides by response surface methodology. The optimized method was validated for linearity, recovery, repeatability, and detection and quantification limits. Samples of chicken breast, raw, deep fried, boiled in water, and oven cooked, were successfully analysed by the new method.

The formation of hexanal, pentanal, and malonaldehyde in raw and grilled chicken patties stored at -18 °C during 90 days was evaluated by solid phase microextraction (SPME) using DVB/CAR/PDMS fibers. The extracting conditions were optimized to obtain reproducible results and to avoid fiber saturation, even for the more oxidized samples. The performance of different single DVB/CAR/PDMS fibers was verified during the storage, and seven single fibers were necessary to monitor the development of the lipid oxidation. The relative standard deviation

(RSD) were calculated for 60 duplicate determinations and no significant differences ($p>0.05$) were observed among the RSD of the fibers regardless the number of times they were used. The raw samples presented significant ($p<0.05$) Pearson correlations between all analysed parameters, varying from 0.93 to 0.99; however, for the grilled samples, only the a correlation of 0.98 hexanal and pentanal was significant.

Fifty one Cobb chicken were raised and controled fed specially for the development of this research project. The chicken filets were minced after the remotion of skin and apparent fat tissue, and dried sage, dried garlic and salt were added to the meat. Sixty grams patties were molded and half was grilled at 170°C , for 4 minutes each side, untill core tempertaure reached 70°C . Raw and grilled patties were packed in polyethylene bags permeable to oxygen, and stored in the dark at -18°C during 90 days. The addition of sage to the chicken meat proved to be an efficient way to minimize and delay lipid and cholesterol oxidation, sage was also able to partially counteract the pro oxidative effects of salt addition. On the other hand, garlic addition presented variable results according to the applied methodology, confirming the controversial results found in literature for garlic action in meat, and suggesting that garlic has no antioxidant effect this matrix.

Frozen chicken filets were acquired from industry (Rose Poultry, Denmark). After thawing and removing the connective and adipose tissues, the meat was minced. Dried sage, dried garlic and the mixture of both spices were added to the minced meat and 30 g meat balls were formed, vacuum packed in polyethylene bags, and immediately submmited to high pressure treatment. Sage was able to

control lipid oxidation in minced chicken meat submitted to high pressure during subsequent storage at 4°C for 2 weeks, while garlic showed pro oxidative effect, which was minimized by the simultaneous addition of sage. From the analysis of the rate of development of lipid oxidation, measured as TBARS, the apparent volume of activation for pressure-induced lipid oxidation was estimated, showing that the pro oxidative effect of garlic and pressure were additive. The mechanisms involved in sage and garlic action on lipid oxidation were studied by the evaluation of pressure effect on free radical formation in a chicken meat model system by electron spin resonance spectroscopy (ESR), indicating that the high capacity of sage to scavenge free radicals in the lipid phase is the main mechanism behind the protective effect of sage.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango e o principal exportador, sendo a região sul responsável por 52% da produção nacional e por 75% das exportações. Em um período de apenas seis anos, de 2000 a 2006, as exportações brasileiras alcançaram uma evolução de 199% e a avicultura já é o segundo item na pauta de exportações do agronegócio brasileiro, perdendo apenas para o complexo soja e é o quinto item mais importante da balança comercial do país. Estimativas do Departamento de Agricultura dos EUA para 2008 mostram que o Brasil permanece como o quarto maior consumidor de carne de frango do mundo, atrás apenas de EUA, China e da União Européia. Apesar do aumento de 161% no preço da ave nos últimos 14 anos, o consumo *per capita* do produto dobrou no país no mesmo período. Cada brasileiro consome 38 quilos de frango por ano. De acordo com a Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango (ABEF) o Brasil exportou 3,6 milhões de toneladas de carne de frango em 2008, registrando um crescimento de 11% na comparação com 2007; enquanto a produção foi estimada em 10 milhões de toneladas, representando um crescimento de 8,65% em relação a 2006.

A avicultura brasileira destaca-se também pelo aumento da exportação de produtos com maior valor agregado, ou seja, produtos embalados e prontos para o consumo, um conceito de alimentos saudáveis com rápido preparo cada vez mais procurado no exterior. Tais produtos devem possuir uma vida de prateleira

prolongada, sendo necessário o uso de aditivos e outros métodos de conservação para a manutenção de suas características organolépticas.

O armazenamento sob temperatura de congelamento é reconhecidamente uma tecnologia capaz de prolongar a vida de prateleira de produtos cárneos causando alterações mínimas na suas características sensoriais. O principal processo degenerativo que ocorre neste tipo de armazenamento em produtos cárneos é a oxidação lipídica, através da formação de compostos, geralmente associados à formação de sabores e odores desagradáveis, que reduzem a aceitação destes produtos pelo consumidor e que também podem comprometer a sua segurança nutricional. Dentre estas alterações, a oxidação do colesterol é de suma importância e ocorre por um mecanismo semelhante à autooxidação dos ácidos graxos, sendo em geral acelerada pelos mesmos fatores, além de estar correlacionada ao grau de insaturação dos ácidos graxos presentes no alimento. Desta forma, é bastante razoável supor que os mesmos antioxidantes que são eficientes na minimização da oxidação de ácidos graxos tenham algum impacto na inibição da oxidação do colesterol. A adição de condimentos à carne de frango, além de conferir as características organolépticas desejadas, também pode auxiliar na sua preservação, prevenindo ou retardando sua deterioração durante o processamento ou armazenamento.

De acordo com o exposto, os objetivos deste estudo foram: (1) otimizar e validar metodologia para a determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol, por cromatografia líquida de alta eficiência, em carne de frango; (2) otimizar metodologia para determinação de malonaldeído, pentanal e hexanal por

microextração em fase sólida e cromatografia gasosa; (3) investigar o efeito da sálvia e do alho como antioxidantes naturais e o efeito do cloreto de sódio como fator pró-oxidante em carne de frango crua e grelhada durante o armazenamento a -18°C por 90 dias, através da alteração na composição de ácidos graxos, da oxidação do colesterol e da formação de aldeídos voláteis; (4) avaliar o efeito da adição de sálvia e de alho sobre a oxidação lipídica em carne de frango submetida à alta pressão durante o armazenamento a 4°C por 15 dias; (5) propor os mecanismos envolvidos na ação antioxidante da sálvia e do alho, através da avaliação do efeito da pressão na formação de radicais livres em um sistema modelo de carne de frango, com o uso de espectroscopia de ressonância paramagnética (ESR).

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: A OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNE DE FRANGO E O USO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS

Resumo

A manutenção da qualidade de um alimento por um período prolongado requer o uso de antioxidantes e em virtude da crescente preocupação com a dieta e a ingestão de produtos alimentícios sem aditivos sintéticos, torna-se necessária a busca por antioxidantes naturais, como a sálvia e o alho, para minimizar a oxidação lipídica. A carne de frango é um alimento altamente suscetível à oxidação lipídica em função do alto teor de ácidos graxos insaturados na sua composição. A formação de óxidos de colesterol e as alterações na composição de ácidos graxos, principalmente a degradação dos poliinsaturados, ao lado da formação de compostos voláteis secundários oriundos da oxidação lipídica, possuem um papel de destaque dentre os fatores que causam perda de qualidade e das características nutricionais decorrentes do processamento térmico ou sob alta pressão e do armazenamento da carne de frango. Além disso, o consumo de lipídios, principalmente de lipídios oxidados, tem sido alvo de constante investigação pela área médica haja vista a alta correlação entre a ingestão destes compostos e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e outras doenças degenerativas.

1. Introdução

O consumo de alimentos processados e congelados tem aumentado muito devido às necessidades impostas pela vida moderna, onde o tempo de preparo dos alimentos é um fator limitante. A temperatura e o tempo necessários para processar os alimentos, além das condições de transporte e armazenamento, são alguns dos fatores que podem contribuir para alterações químicas, muitas delas relacionadas à oxidação lipídica, causando não apenas perdas nutricionais, mas também gerando produtos que podem levar à formação de vários compostos indesejáveis e até mesmo potencialmente prejudiciais à saúde humana (CUVELIER et al., 1994; WONG et al., 1995). Soma-se ao fato de que a carne de frango é rica em ácidos graxos poliinsaturados, compostos extremamente suscetíveis à oxidação, originando principalmente radicais livres que aceleram o processo oxidativo com a formação de óxidos de colesterol e alteração da composição de ácidos graxos. Além disso, as modificações organolépticas que ocorrem durante o processo de oxidação podem alterar o produto final de tal forma, tornando-o inaceitável pelo consumidor.

2. Colesterol e óxidos de colesterol

O colesterol (colest-5-en-3 β -ol) é um componente essencial das membranas celulares e é precursor dos ácidos biliares sintetizados no fígado, que posteriormente são secretados no intestino, onde são essenciais para a digestão

normal e para a absorção de gordura e das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K (ANDRES, 1987).

Os produtos de oxidação do colesterol formam um grupo com mais de 80 compostos conhecidos que são formados a partir do colesterol durante o processamento e armazenamento dos alimentos, podendo também ser formados enzimaticamente (PANIANGVAIT et al., 1995; LERCKER e RODRIGUEZ-ESTRADA, 2002). A formação dos óxidos de colesterol é influenciada pela presença de ácidos graxos insaturados, teor de colesterol, atividade de água, aquecimento, presença de oxigênio, de radicais livres e de íons metálicos, além da exposição à luz e à irradiação, dentre outros fatores (PANIANGVAIT et al., 1995; HUR et al., 2007).

Os alimentos de origem animal contendo teores significativos de colesterol são fontes potenciais de óxidos de colesterol na dieta. Embora os níveis seguros de ingestão de óxidos de colesterol ainda não estejam estabelecidos, estes compostos podem ser absorvidos a partir da dieta numa proporção de 6 a 90% (VINE et al., 1997) e a exposição crônica pode constituir um risco à saúde humana (BASCOUL et al., 1986) devido aos efeitos potencialmente aterogênicos (PENG et al., 1985; HODIS et al., 1991; BROWN e JESSUP, 1999; GARCIA-CRUISET et al., 2002), citotóxicos (SEVANI e PETERSON, 1986; OHTANI et al., 1996; 1997; LIZARD et al., 1997; LEMAIRE-EWING et al., 2005), mutagênicos e possivelmente carcinogênicos (SEVANI e PETERSON, 1986; SMITH e JOHNSON, 1989; OSADA, 2002; LEONARDUZZI et al., 2002). Estudos epidemiológicos indicam a existência de correlação entre a presença de óxidos de colesterol nos tecidos e o

desenvolvimento de doenças degenerativas como o mal de Alzheimer (KOLSCH et al., 1999; LUTJOHANN et al., 2000) e a catarata (GIRAO et al., 1998). Alguns óxidos de colesterol, como o 7-cetocolesterol, 7 β - e 7 α -hidroxicolesterol e 5,6 α - e 5,6 β -epoxicolesterol, atualmente estão sendo usados como indicadores biológicos de danos oxidativos em pacientes com diabetes (FERDERBAR et al., 2007; ENDO et al., 2008).

A complexa mistura de óxidos de colesterol, resultante da oxidação do colesterol mediada por radicais livres, dificulta a determinação do exato mecanismo de formação de cada óxido, principalmente devido ao caráter aleatório da oxidação por radicais livres e ao subsequente rearranjo dos produtos intermediários. O foco da oxidação do colesterol por radicais livres é o C7 devido à fraca energia de ligação C-H nesta posição, sendo necessários 88 kcal/mol para a dissociação (GARDNER, 1989) e portanto, os radicais peroxila ou alcoxila derivados dos lipídios prontamente abstraem este átomo de hidrogênio, caracterizando um mecanismo de reação em cadeia de radicais livres, de modo semelhante à autooxidação dos ácidos graxos insaturados (SMITH, 1987). O radical do colesterol centrado no C7 tem meia vida suficientemente longa para encontrar uma molécula de oxigênio no estado fundamental, formando 7 β - ou 7 α -hidroperóxido (SEVILLA et al., 1986). Durante o aquecimento e o armazenamento do alimento, ocorre a redução dos 7-hidroperóxidos aos seus álcoois correspondentes, 7 β -hidroxicolesterol ou 7 α -hidroxicolesterol, sendo o isômero na posição β formado preferencialmente e em maior proporção por estar na forma

equatorial e portanto, mais estável (LERCKER e RODRIGUEZ-ESTRADA, 2002). Entretanto, o 7-hidroperóxido também pode sofrer um processo de desidratação, originando o 7-cetocolesterol (**Figura 1**).

Os 5,6 α - e 5,6 β -epoxicolesterol apresentam um mecanismo de reação mais complexo, sendo formados principalmente pela reação do colesterol com diferentes espécies de oxigênio reativas (ROS), tais como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radicais hidroxilas (OH[•]), peroxilas (ROO[•]), alcoxilas (RO[•]) e ozônio (O₃) (GUMULKA et al., 1982; SMITH, 1996). Diversos pesquisadores observaram que o 5,6 β -epoxicolesterol prevalece sobre o 5,6 α -epoxicolesterol, provavelmente, devido ao impedimento estérico do grupo OH no C3 (LERCKER e RODRIGUEZ-ESTRADA, 2002). A hidratação dos epoxicolesterolis em meio ácido gera o colestanoltriol.

A oxidação da cadeia lateral pode originar hidroperóxidos nas posições 20, 22, 24, 25 e 26, formando os respectivos derivados hidroxilados 20 α -, 22R- ou 22S-, 24S-, 25-, e 25R-hidroxicolesterol (SMITH, 1987).

Os óxidos de colesterol mais encontrados nos alimentos são os derivados do anel B da cadeia principal do colesterol, como o 5,6 α - e 5,6 β -epoxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7 β - e 7 α -hidroxicolesterol, e o colestanoltriol e em menores concentrações, os derivados da cadeia lateral, como o 20 α - e 25-hidroxicolesterol (FINOCCHIARO e RICHARDSON, 1983; HUR et al., 2007; BRAGAGNOLO, 2009).

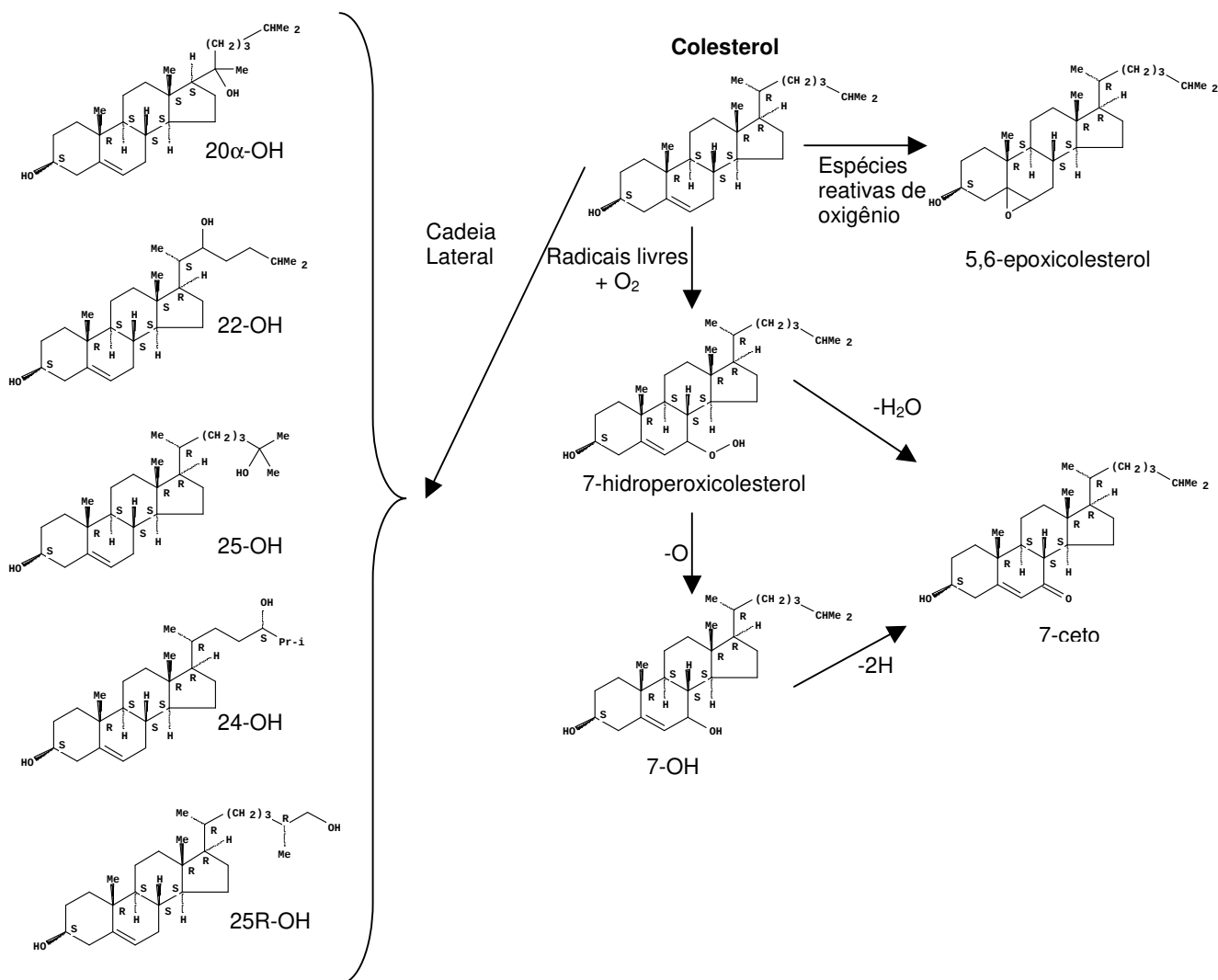


Figura 1. Mecanismo de formação de óxidos de colesterol

3. Ácidos graxos

Os ácidos graxos possuem uma grande variedade de funções metabólicas importantes para todas as formas de vida, sendo uma fonte rica em energia. Entretanto, a importância dos ácidos graxos na nutrição humana vai além de seu papel como fonte de calorias. Sua estrutura e hidrofobicidade são cruciais para a

modulação da estrutura da membrana celular, além de serem precursores da ativação de moléculas sinalizadoras como os eicosanóides (SCHMITZ e ECKER, 2008). Os ácidos graxos essenciais, que não são sintetizados pelo organismo a partir de outros ácidos graxos e devem ser adquiridos através da dieta, possuem diversas funções no organismo, dependendo da relação entre a ingestão de PUFA n-6 e PUFA n-3 (SIMOPOULOS, 1999; 2002). Os ácidos graxos provenientes da dieta também têm sido correlacionados a diversas alterações metabólicas e fisiológicas como resistência à insulina, diabetes tipo 2, obesidade, aumento da taxa de colesterol no sangue, trombose, doenças cardiovasculares, inflamatórias e autoimunes, câncer, entre outros (KEYS e PARLIN, 1966; KNAPP, 1997; SIMOPOULOS, 1999; 2002; SALMERÓN et al., 2001; VESSBY et al., 2001; SUMMERS et al., 2002; DEFILIPPIS e SPERLING, 2006).

Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e os poliinsaturados (PUFA) são capazes de diminuir os níveis de LDL-colesterol no sangue. No entanto, os ácidos graxos saturados (SFA) com menos de 18 carbonos na cadeia causam o aumento dos níveis de LDL-colesterol no sangue, elevando o risco de aterosclerose e de doenças cardiovasculares no homem (JUDD et al., 1994; 2002). Desta forma, foram preconizados alguns guias dietéticos para a orientação da composição de ácidos graxos na dieta humana visando à manutenção de uma vida saudável. A Organização Mundial de Saúde (2003) recomenda que a gordura total não deve exceder em 15 a 30% a energia total da dieta, cuja composição de ácidos graxos deve ser aproximadamente de 10% de SFA, 5 a 8% de PUFA n-6 e 1 a 2% de PUFA n-3. O Departamento de Saúde do Reino Unido (1994)

recomenda que as razões entre os grupos de ácidos graxos devam ser maiores que 0,4 para PUFA/SFA e menores que 4 para PUFA n-6/PUFA n-3.

Os ácidos graxos n-6 mais consumidos na dieta humana são o ácido araquidônico (AA), encontrado em carnes, e o ácido linoleico, encontrado em óleos vegetais, sementes e nozes, o qual pode ser convertido a AA pela enzima dessaturase. As principais fontes de ácidos graxos n-3 são os peixes, que contém os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), além de nozes, sementes e óleos vegetais, que contém o ácido α -linolênico, que pode ser convertido a EPA e depois a DHA pela mesma enzima dessaturase que converte o ácido linoleico a AA (DEFILIPPIS e SPERLING, 2006). Como a conversão dos ácidos graxos n-3 e n-6 depende da mesma série de enzimas, ocorre uma competição entre as famílias n-6 e n-3 pelas enzimas para seu metabolismo onde o excesso de uma família causa um decréscimo significativo na conversão da outra (SCHMITZ e ECKER, 2008). Os eicosanóides derivados dos ácidos graxos n-6 são geralmente pró-inflamatórios e pró-agregatórios, enquanto os derivados de n-3 são predominantemente anti-inflamatórios e inibidores da agregação de plaquetas (SIMOPOULOS, 1999; SCHMITZ e ECKER, 2008).

Os níveis de PUFA n-3 na dieta ocidental são muito baixos. A relação da ingestão de ácidos graxos n-6/n-3 é estimada em 15-20/1 (SIMOPOULOS, 1999; 2002), porém, estes ácidos graxos reduzem os riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (JUDD et al., 1994; 2002), além de serem necessários para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso e visual em fetos e

crianças (INNIS, 2007). Estudos epidemiológicos ainda sugerem que o consumo de altos teores de DHA estejam correlacionados à prevenção de doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer (FLORENT-BÉCHARD et al., 2007).

Os ácidos graxos *trans* são geralmente encontrados em pequenas concentrações em carnes, porém, quando consumidos em grandes quantidades são responsáveis por um aumento do teor de LDL-colesterol e pela diminuição do teor de HDL-colesterol (MENSINK e KATAN, 1990; JUDD et al., 1994; 2002), além de interferir na dessaturação e na elongação dos ácidos graxos n-6 e n-3, causando um decréscimo no teor de AA, EPA e DHA disponíveis para o metabolismo humano (SIMOPOULOS, 2002). Os ácidos graxos *trans* ainda estão associados ao aumento de abortos espontâneos (MORRISON et al., 2008) e ao desenvolvimento de câncer (VINIKOOR et al., 2008). Por outro lado, o ácido *trans*-vacênico (18:1 *trans*-11) é o precursor do principal isômero do ácido graxo linoleico conjugado (CLA), o *cis*-9,*trans*-11, que é reconhecido por possuir diversos efeitos benéficos à saúde, incluindo a inibição da carcinogênese e da aterosclerose (CORL et al., 2003; MILLER et al., 2003; MOSLEY et al., 2006).

O processo de autoxidação dos ácidos graxos nos alimentos ocorre de acordo com um mecanismo de reação em cadeia de radicais livres e divide-se em três fases: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação, o ácido graxo insaturado forma um radical livre na presença de luz e calor, através da abstração de um átomo de hidrogênio de sua molécula e reage rapidamente com oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) formando um radical peroxila. A fase de propagação envolve a continuação e a aceleração da reação em cadeia que começou na iniciação.

Desta forma, os radicais produzidos na fase de iniciação poderão reagir com outros ácidos graxos insaturados. A terminação é o estágio onde os radicais livres começam a reagir entre si formando espécies não-radicais.

A abstração de hidrogênio na fase de propagação da autooxidação ocorre preferencialmente nos átomos de carbono, onde a energia de dissociação da ligação é baixa. Os ácidos graxos saturados são bastante estáveis e não se oxidam a uma velocidade significativa, enquanto a energia de dissociação da ligação C-H é reduzida pela proximidade de um grupo alceno e a abstração de hidrogênio ocorre mais rapidamente no grupo metileno entre dois grupos alcenos em um ácido graxo poliinsaturado. Consequentemente, a velocidade de oxidação é muito maior quando ácidos graxos poliinsaturados estão presentes no alimento (GORDON, 2004).

Os hidroperóxidos ainda podem se decompor para produzir álcoois, aldeídos, ácidos, cetonas ou outras substâncias menos reativas. Os aldeídos voláteis são particularmente importantes por contribuírem com o aroma de oxidado. Os tipos de produtos de decomposição, formados durante a oxidação, estão relacionados à composição de ácidos graxos, por exemplo, o hexanal e o pentanal são derivados da oxidação de ácidos graxos n-6, como o ácido linoleico, e o propanal, da oxidação de ácidos graxos n-3, como o ácido linolênico. O hexanal é normalmente formado em grandes quantidades durante a oxidação dos lipídios via o 13-hidroperóxido de ácido linoleico e embora não seja um dos aldeídos ao qual o paladar seja mais sensível, ele é comumente monitorado para verificar a formação de produtos secundários (GORDON, 2004). Embora os compostos

voláteis representem apenas uma pequena porção dos produtos de oxidação dos lipídios, estes produtos são os responsáveis pela percepção de *off-flavor* pelos consumidores.

4. Espectroscopia de ressonância elétron-spin (ESR)

A ESR, também conhecida como espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), tem sido esporadicamente usada para análise de alimentos desde a década de 60, porém, somente durante os anos 80 esta técnica começou a ser mais aplicada para o estudo da química de alimentos. Trata-se de uma técnica capaz de detectar e caracterizar as propriedades paramagnéticas associadas aos elétron-spins de elétrons desemparelhados. As espécies paramagnéticas relevantes em química de alimentos incluem os radicais alquila ($R^\bullet$), superóxido ($O_2^\bullet$), hidroxila ($HO^\bullet$), alcóxila ($RO^\bullet$), alquilperóxila ($ROO^\bullet$), fenóxila ($C_6H_5O^\bullet$), semiquinona e semidiona e o monóxido de nitrogênio (NO), os quais possuem um elétron desemparelhado. Além disso, o oxigênio (O_2) que possui dois elétrons desemparelhados e os íons dos metais de transição das metaloproteínas podem conter vários elétrons desemparelhados (FINKELSTEIN et al., 1980; JANZEN et al., 1990; MILE, 2000).

A ESR é uma técnica de microondas que pode detectar pequenas concentrações de elétrons desemparelhados em materiais gasosos, líquidos e sólidos. Nos experimentos com ESR, microondas em uma potência e frequência fixas incidem sobre a amostra na cavidade enquanto o campo magnético é variado.

Usualmente, as transições são monitoradas entre os níveis de Zeeman, sendo os experimentos geralmente realizados entre 9,0 e 9,5 GHz de microondas (banda X), onde a ressonância de um elétron livre ocorre ao redor de 3200 a 3400 G (EATON e EATON, 1990).

Um elétron tem um momento magnético associado igual ao magneton de Bohr, μ_B . Quando colocado num campo magnético externo de intensidade B_0 , esse momento magnético pode tomar duas orientações: paralela e antiparalela ao sentido do campo magnético. A orientação paralela encontra-se num estado de menor energia que a antiparalela (o chamado efeito de Zeeman), sendo a diferença de energia entre os dois estados, ΔE , dada por

$$\Delta E = g_e \mu_B B_0,$$

em que g_e é a razão giromagnética do elétron (a razão entre o seu momento magnético dipolar e o seu momento magnético angular). Para passar do nível mais baixo de energia para o mais elevado, o elétron tem que absorver radiação eletromagnética cuja energia é igual a ΔE :

$$\Delta E = h\nu = g_e \mu_B B_0,$$

sendo esta a equação fundamental na espectroscopia de ESR (EATON e EATON, 1990; MILE, 2000).

O centro paramagnético é colocado num campo magnético, provocando a ressonância do elétron entre os dois estados; a energia absorvida é monitorada e convertida num espectro de ESR. Se o átomo contendo o elétron desemparelhado tiver um *spin* nuclear diferente de zero, o átomo possui um pequeno campo magnético associado que também influencia o elétron. Acontece então o

fenômeno de acoplamento hiperfino, que causa a divisão (*splitting*) do sinal em dubletes, tripletes, etc., ou seja, uma ressonância divide-se em duas, três, etc. (EATON e EATON, 1990; MILE, 2000).

O espectro de ESR é convencionalmente plotado como a primeira derivada do espectro de absorção de microondas versus o campo magnético aplicado. A forma e posição do espectro são características do tipo de composto, e a intensidade do sinal do ESR é proporcional à quantidade de composto presente. O espectro ESR pode ser interpretado para obter informações sobre a estrutura das espécies paramagnéticas, sua mobilidade e sua interação com os spins dos elétrons e núcleos vizinhos (ANDERSEN et al., 2005).

O uso da espectroscopia ESR na oxidação lipídica é relativamente recente. Sua aplicação no controle de qualidade de indústrias de alimentos e rações tem sido estimulada devido à possibilidade do uso de medidas diretas para uma série de produtos, sem a necessidade de etapas de extração e procedimentos de purificação (ANDERSEN et al., 2005). Entretanto, muitos dos radicais formados nos alimentos não podem ser observados diretamente pela espectroscopia ESR quando estes estão na fase fluida, por estarem presentes em concentrações abaixo do limite de detecção ou por possuírem um tempo de relaxamento muito curto (JANZEN et al., 1990). No entanto, podem ser determinados indiretamente através da técnica de *spin-trapping*, na qual os radicais reagem com os compostos diamagnéticos (*spin trap*) adicionados ao sistema formando radicais mais estáveis (*spin adducts*), que se acumulam até concentrações detectáveis (maiores que 10^{-7} M) (FINKELSTEIN et al., 1980; JANZEN et al., 1990; ANDERSEN et al., 2005).

As aplicações mais conhecidas da técnica de *spin trapping* são a identificação e a quantificação de espécies radicais à temperatura ambiente, a determinação rápida da estabilidade oxidativa e a avaliação da capacidade redutora de radicais livres de antioxidantes em óleos e em uma grande variedade de alimentos como carnes, leite, maionese e cream cheese (ANDERSEN et al., 2000; THOMSEN et al., 2000; CARLSEN et al., 2001; PAZOS et al., 2006; BRAGAGNOLO et al., 2006; 2007; MARIUTTI et al., 2008).

Os compostos nitrosos e as nitronas são os *spin traps* mais amplamente usados, ambos levam à formação de nitróxidos nos quais o elétron desemparelhado está localizado primariamente na função nitróxido (FINKELSTEIN et al., 1980; ANDERSEN et al., 2005).

Os compostos nitrosos com um grupo terciário alquila, como o 2-metil-2-nitrosopropano (MNP), ou um grupo fenila, como o nitrobenzeno (NB) e seus derivados, e as nitronas como 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido (DMPO), α -fenil-*N*-*terc*-butil-nitrona (PBN) e α -4-(4-piridil-1-óxido)-*N*-*terc*-butil-nitrona (POBN) com um grupo alquila terciário ligado ao nitrogênio e pelo menos um grupo alquila ou arila ligado à dupla ligação do carbono, podem ser usados como *spin trap* (**Figura 2**) (FINKELSTEIN et al., 1980; ANDERSEN et al., 2005).

O espectro ESR dos nitróxidos possui um *splitting* triplete principal devido à interação com o elétron desemparelhado com o núcleo nitrogênio do grupo nitróxido. *Splittings* secundários podem surgir a partir de outros núcleos magnéticos presentes no radical preso. Nos *spin traps* nitrosos, os radicais são

adicionados diretamente ao nitrogênio, enquanto nas nitronas, a adição ocorre no carbono adjacente ao nitrogênio. Desta forma, os radicais presos pelos *spin traps* nitrosos podem influenciar o espectro de ESR pela interação do núcleo magnético com o elétron desemparelhado. No caso das nitronas, o elétron desemparelhado está mais distante e quase não sente a presença do núcleo magnético no radical adicionado, sendo assim, o espectro tende a ser semelhante ao do radical preso. As nitronas são usadas com maior frequência por formarem *spin adducts* normalmente mais estáveis que os compostos nitrosos (MILE, 2000; ANDERSEN et al., 2005).

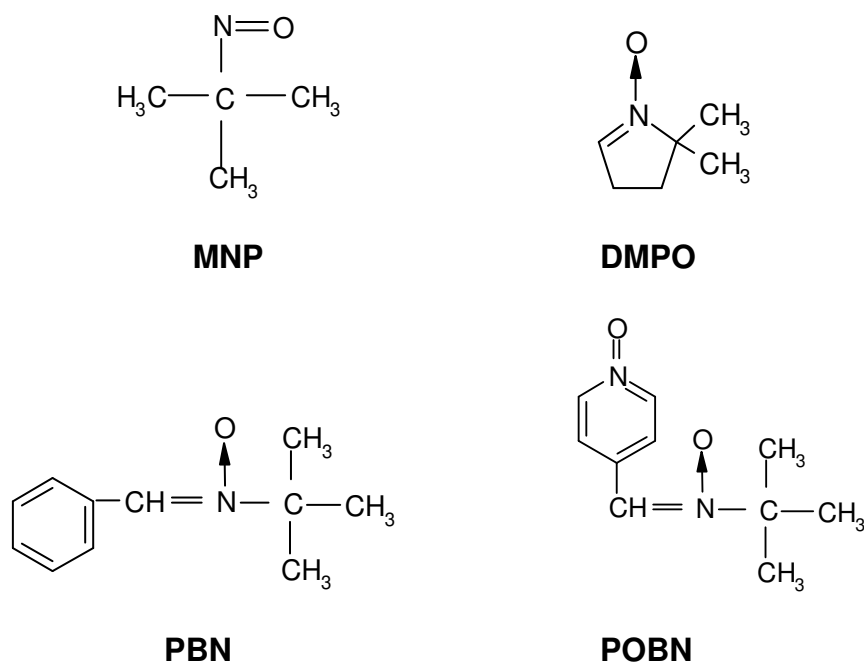


Figura 2. Estruturas de alguns compostos nitrosos e nitronas usados como *spin trap*

Outras técnicas conhecidas são o *spin scavenging*, baseado em princípios opostos ao *spin trapping*, onde radicais relativamente estáveis são adicionados ao sistema e seu consumo é seguido através de uma reação radical-radical, e o *spin probing*, que é usado para estudos de mobilidade molecular e consumo de oxigênio em sistemas alimentícios (HARGREAVES et al., 1994; ANDERSEN et al., 2005; RØDTJER et al., 2006).

5. Efeitos do processamento e do armazenamento sobre a oxidação lipídica em carne de frango

A oxidação dos constituintes lipídicos é uma reação importante que limita a vida de prateleira de vários alimentos, sendo um dos mecanismos primários da deterioração da qualidade em produtos alimentícios, especialmente de carnes. As alterações na qualidade podem ser percebidas pelas mudanças de sabor, cor, textura, valor nutricional e pela produção de compostos potencialmente tóxicos. Dentre os fatores extrínsecos que contribuem para o desenvolvimento da oxidação lipídica em carnes estão as condições e o tipo de processamento (moagem, tratamento térmico, alta pressão, etc.), a adição de certos ingredientes à formulação do produto, a temperatura de armazenamento, o tipo de embalagem e a exposição à luz.

5.1. Tratamento térmico

O efeito pró-oxidante do tratamento térmico em carne de frango tem sido descrito na literatura (MARASCHIELLO et al., 1998; GRAU et al., 2001; CONCHILLO et al., 2003; 2005; BELTRAN et al., 2004; BONOLI et al., 2007; BRAGAGNOLO et al., 2007; MARIUTTI et al., 2007; 2008a) e atribuído a vários fatores. Dentre eles estão a desnaturação proteica, que pode causar a perda de atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, a glutathione peroxidase e a superóxido desmutase; a ruptura das membranas celulares, que coloca os ácidos graxos insaturados e o colesterol em contato com espécies pró-oxidantes como os radicais alcoxila e hidroxila; e a liberação de ferro pelas metaloproteínas, principalmente pela mioglobina (RHEE, 1988; DECKER e XU, 1998; MONAHAN, 2000; ERICKSON, 2002). O decréscimo no teor de ferro-heme, e consequente aumento no teor de ferro livre, em decorrência da cocção, varia em função do corte do frango, sendo de 7% no peito, 24% a 27% na coxa e 43% na asa de frango (LOMBARDI-BOCCIA et al., 2002).

A cocção pode aumentar significativamente a oxidação do colesterol, aumentando o conteúdo total dos óxidos de colesterol (PARK e ADDIS, 1987; PIE et al., 1991; MARASCHIELLO et al., 1998; GRAU et al., 2001; LEE et al., 2001; ECHARTE et al., 2003; CONCHILLO et al., 2003; 2005; MARIUTTI et al., 2007; 2008a), além de modificar o valor nutricional em relação ao produto original, através da alteração da composição de ácidos graxos (ECHARTE et al., 2003; CONCHILLO et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2007a; 2007b).

A **Tabela 1** apresenta um resumo dos principais estudos sobre o efeito do tratamento térmico e do armazenamento na oxidação do colesterol em carne de frango nos quais os resultados são apresentados individualmente para cada óxido estudado. Entretanto, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura analisa apenas os resultados para os óxidos de colesterol totais. Geralmente, os principais óxidos de colesterol encontrados em carne de frango crua são os mesmos encontrados após o tratamento térmico e posterior armazenamento, sendo que o 7 β -hidroxicolesterol e o 5,6- β -epoxicolesterol são os óxidos que, em geral, apresentam as maiores concentrações no frango cru. Na carne de frango cozida e após o armazenamento, além destes dois óxidos, há um aumento na concentração do 7-cetocolesterol. A presença de 20 α -hidroxicolesterol foi verificada apenas em coxas de frango (MARASCHIELLO et al., 1998) e o 25-hidroxicolesterol e o colestanoltriol, que são os óxidos considerados com maior potencial de toxicidade, foram encontrados na maioria das amostras, porém, em baixas concentrações.

Embora a composição de ácidos graxos não seja o parâmetro mais importante para detectar o desenvolvimento da oxidação lipídica, os ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados, podem sofrer alterações decorrentes da oxidação. O teor de lipídios totais em peito de frango sem pele é de aproximadamente 1,7%, sendo constituído por 36,6% de SFA, 32,5% MUFA e 30,8% PUFA. Os ácidos graxos saturados mais abundantes são o palmítico, seguido do esteárico; os principais monoinsaturados são os ácidos palmitoleico e

Tabela 1. Efeito do tratamento térmico e do armazenamento na formação de óxidos de colesterol em frango e produtos de frango

Produto	Tratamento Térmico	Armazenamento	óxidos de colesterol			referência
			cru	após cozimento (início)	após cozimento (final)	
Peito + 1% sal + 5% água (variação do teor de α -tocoferol na dieta)	forno convencional 160°C/40 min	4°C , luz fluorescente, 12 dias	não realizado	25-OH (0,10–0,14)	25-OH (0,27-1,04) 7-ceto (0,17-0,39)	GALVIN et al. (1998) ^a
Coxa + 1% sal + 5% água (variação do teor de α -tocoferol na dieta)			não realizado	25-OH (0,23-0,56)	25-OH (0,74-3,47) 7-ceto (0,45-0,73)	
Hambúrguer (comercial)	microondas 3 min/900 W Temperatura interna: 100°C	não realizado	7 β -OH (2,14) 7-ceto (1,87)	7 α -OH (12,67) 7 β -OH (6,43) 7-ceto (4) α -EP (1,53)	não realizado	ECHARTE et al. (2003) ^b
	frito com 10 mL de azeite de oliva 180°C/3 min de cada lado Temperatura interna: 85-90°C			7 α -OH (2,93) 7 β -OH (2,25) 7-ceto (2,53) α -EP (0,65) triol (2,39)		

^a óxidos de colesterol expressos em $\mu\text{g/g}$; ^b óxidos de colesterol expressos em $\mu\text{g/g}$ de lipídio.

Continuação Tabela 1. Efeito do tratamento térmico e do armazenamento na formação de óxidos de colesterol em frango e produtos de frango

Produto	Tratamento Térmico	Armazenamento	óxidos de colesterol			referência
			cru	após cozimento (início)	após cozimento (final)	
Coxa (variação no teor de α -tocoferol e β - caroteno e na fonte de gordura na dieta)	Cocção em sacos de polietileno em banho de água a 85°C/50min Temperatura interna: 80°C	não realizado	7 α -OH (0,01-0,21)	7 α -OH (0,14-1,41)		MARASCHIELLO et al. (1998) ^a
			7 β -OH (0-0,11)	7 β -OH (0,12-1,50)		
			7-ceto (0-0,13)	7-ceto (0,15-1,01)		
			α -EP (0-0,05)	α -EP (0,03-0,51)		
			β -EP (0-0,15)	β -EP (0,21-0,84)	não realizado	
			20 α -OH (0-0,05)	20 α -OH (0-0,14)		
				25-OH (0-0,01)		
				triol (0-0,06)		
					7 α -OH (0,27-2,47)	
					7 β -OH (0,89-6,32)	
Peito inteiro	grelhada 180°C/1,5 min de cada lado com 9mL de óleo de girassol Temperatura interna: 85-90°C	-18°C, 13 meses aerobiose	7 α -OH (0,20-1,31)		7-ceto (1,00-12,58)	CONCHILLO et al. (2005) ^b
			7 β -OH (0,50-1,49)		α -EP (0,21-2,43)	
			7-ceto (0,53-0,55)		β -EP (1,71-3,96)	
			α -EP (0,20-0,25)	não realizado	25-OH (0,21-0,35)	
			β -EP (2,40-2,69)		triol (0,61-0,79)	
			25-OH (0,12-0,23)		7 α -OH (2,78-6,14)	
			triol (0,59-0,92)		7 β -OH (4,94-9,46)	
					7-ceto (7,33-13,74)	
					α -EP (0,79-2,52)	
					β -EP (3,56-6,67)	
	assada 220°C/10 min de cada lado Temperatura interna: 95-100°C				25-OH (0,12-0,14)	
					triol (0,71-0,74)	

^a óxidos de colesterol expressos em $\mu\text{g/g}$; ^b óxidos de colesterol expressos em $\mu\text{g/g}$ de lipídio.

Continuação Tabela 1. Efeito do tratamento térmico e do armazenamento na formação de óxidos de colesterol em frango e produtos de frango

Produto	Tratamento Térmico	Armazenamento	óxidos de colesterol			referência
			cru	após cozimento (início)	após cozimento (final)	
Hambúrguer de peito e coxa	forno elétrico, irradiado Temperatura interna 70°C	4°C, 14 dias aerobiose	7 α -OH (0,83-1,05)	7 α -OH (1,44-8,1)	7 α -OH (1,55-33,8)	LEE et al. (2001) ^a
			7 β -OH (3,47-20,35)	7 β -OH (10,10-61,7)	7 β -OH (18,73-174,2)	
			7-ceto (0-2,78)	7-ceto (2,86-9,6)	7-ceto (7,38-39,7)	
			β -EP (<0,05)	β -EP (0,87-1,1)	β -EP (1,62-3,6)	
Peito inteiro	grelhada 180°C/1,5 min de cada lado Temperatura interna: 85-90°C	4°C, 6 dias		7 α -OH (1,93)	7 α -OH (12,58)	CONCHILLO et al. (2003) ^b
				7 β -OH (2,86)	7 β -OH (30,77)	
				7-ceto (2,42)	7-ceto (21,46)	
				α -EP (0,54)	α -EP (4,31)	
				β -EP (4,08)	β -EP (21,78)	
			7 α -OH (0,22)	25-OH (0,35)	25-OH (0,53)	
			7 β -OH (0,39)	triol (0,64)	triol (0,92)	
			7-ceto (0,06)			
	assada 220°C/10 min de cada lado Temperatura interna:95-100°C	4°C, 6 dias	β -EP (1,33)	7 α -OH (1,50)	7 α -OH (12,28)	
			25-OH (0,19)	7 β -OH (2,29)	7 β -OH (22,66)	
			triol (0,67)	7-ceto (2,27)	7-ceto (30,86)	
				α -EP (0,49)	α -EP (4,04)	
				β -EP (4,08)	β -EP (17,43)	
				25-OH (0,24)	25-OH (0,46)	
				triol (0,66)	triol (0,87)	

^a óxidos de colesterol expressos em $\mu\text{g/g}$; ^b óxidos de colesterol expressos em $\mu\text{g/g}$ de lipídio.

oleico; e os principais poliinsaturados são o linoleico, o AA e o DHA (CANTOR et al., 2008). O teor de lipídios totais da carne cozida é afetado pelo método de cocção e pode aumentar cerca de 2 a 3 vezes em relação à carne crua, quando comparado em base úmida, devido à perda de água durante a cocção. A composição de ácidos graxos de frango assado ou cozido no vapor é semelhante, porém, quando comparada à carne crua, nota-se uma diminuição nas concentrações de ácidos graxos insaturados, principalmente devido à perda de PUFA com 20 e 22 átomos de carbono na cadeia (CANTOR et al., 2008). No entanto, o período de armazenamento e o tratamento térmico não alteraram a composição de ácidos graxos de produtos processados de carne de frango (BAGGIO e BRAGAGNOLO, 2006 a; 2006b).

A oxidação do colesterol é altamente influenciada pela composição de ácidos graxos, principalmente dos ácidos graxos insaturados. Os tecidos com maiores teores de PUFA promoveriam uma maior taxa de formação de radicais livres, acelerando a oxidação do colesterol (MARASCHIELLO et al., 1998; GALVIN et al., 1998; ECHARTE et al., 2003). Em um sistema modelo, a diminuição do grau de insaturação na composição dos ácidos graxos foi capaz de prolongar o período de indução da oxidação do colesterol, porém, a velocidade de oxidação do colesterol na fase de formação dos óxidos de colesterol após o período de indução não foi afetada pela proporção de ácidos graxos altamente insaturados presentes no sistema modelo (LI et al., 1994).

Por outro lado, existem evidências de que os ácidos graxos insaturados, principalmente os PUFA, seriam responsáveis por exercerem um efeito protetor

sobre o colesterol frente à oxidação, devido ao fato de se oxidarem preferencialmente (PARK e ADDIS, 1987; GRAU et al., 2001; BONOLI et al., 2007). Em um estudo comparativo entre 3 métodos de cocção (fritura, cocção em água fervente e assamento), o peito de frango apresentou maiores concentrações de óxidos de colesterol total, tanto na amostra crua como nas amostras termicamente processadas, quando comparado à coxa de frango, com exceção do método de assamento, onde o teor total de óxidos de colesterol foi maior na coxa (MARIUTTI et al., 2007).

Após a cocção, é importante armazenar a carne em temperatura baixa para minimizar a oxidação lipídica, porém, mesmo sob temperaturas de congelamento, a oxidação lipídica é apenas retardada, mas não eliminada (PICKUL et al., 1984).

5.2. Alta pressão

O conceito da teoria dos obstáculos foi introduzido por Leistner (1978) e é baseado na aplicação de fatores preservativos combinados, os chamados obstáculos, com a finalidade de garantir a segurança microbiológica, a estabilidade química e a qualidade sensorial e nutricional dos produtos alimentícios. Dentre os processos tecnológicos emergentes, a aplicação de alta pressão hidrostática é uma das técnicas mais promissoras para preservação de alimentos com baixo pH como geléia, sucos de frutas, molhos, frutas, iogurtes, ingredientes para sorvetes e guacamole, e alguns alimentos com pH alto como carne fatiada embalada (LEISTNER e GOULD, 2002). Geralmente, o tratamento

com alta pressão resulta na inativação de microrganismos, podendo também afetar a cinética de reações enzimáticas, causando apenas alterações imperceptíveis no sabor e odor dos alimentos. Entretanto, pode ocasionar efeitos negativos como alterações de cor, textura e estrutura, além de induzir a oxidação lipídica em carnes, dependendo do nível de pressão e tempo de aplicação (ORLIEN et al., 2000; BELTRAN et al., 2004; WIGGERS et al., 2004; BRAGAGNOLO et al., 2006; 2007; MA et al., 2007; MARIUTTI et al., 2008a).

O processamento sob alta pressão hidrostática consiste em submeter o produto à alta pressão dentro de uma câmara pressurizada, utilizando um meio que transfere a pressão ao produto, em geral, utiliza-se água potável para alimentos. Os efeitos da aplicação da alta pressão podem ser entendidos através de dois princípios gerais: o Princípio de Le Chatelier, segundo o qual qualquer fenômeno acompanhado por uma redução de volume é favorecido pelo aumento de pressão, ou seja, reações com ΔV (ΔV = volume dos produtos – volume dos reagentes) negativo serão favorecidas e aquelas com ΔV positivo serão inibidas; e o princípio isostático, que indica que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea através de uma amostra biológica. Desta forma, o processo de pressurização é, portanto, independente do volume e da forma da amostra (JOHNSTON, 1995; CHEFTEL e CULIOLI, 1997; HOGAN et al., 2005). No entanto, dada a complexidade da composição da matriz alimentícia e as interações que podem ocorrer entre seus componentes, é difícil prever o efeito da alta pressão em determinado alimento.

O efeito da alta pressão na formação de radicais livres em peito e coxa de frango foi correlacionado à estabilidade oxidativa destes músculos e à adição de sal (BRAGAGNOLO et al., 2006). Os autores verificaram que a geração de radicais livres ocorre até mesmo sob pressões moderadas (200 MPa) por apenas 5 min, havendo um aumento significativo na formação de radicais livres quando o sal foi adicionado e de acordo com a natureza oxidativa do músculo (peito ou coxa). A máxima formação de radicais ocorreu a 1000 MPa e a 600 MPa em peito e coxa de frango, respectivamente.

Atualmente, a adição de condimentos, extratos vegetais, agentes quelantes e clara de ovo para controlar a oxidação lipídica induzida pela alta pressão em carne de frango tem apresentado resultados positivos, porém, o efeito antioxidante depende da magnitude da pressão aplicada (BELTRAN et al., 2004; MARIUTTI et al., 2008a) e do tratamento térmico subsequente (BRAGAGNOLO et al., 2007).

6. O uso de sálvia (*Salvia officinalis*) e alho (*Allium sativum*) como antioxidantes

O uso de antioxidantes sintéticos para prolongar a vida de prateleira de carnes e produtos cárneos é comum nas indústrias de alimentos. No entanto, devido à crescente preocupação com a saúde há uma tendência cada vez maior de consumo de produtos naturais e o uso de condimentos como antioxidantes naturais tem sido objeto de estudo em diversas matrizes como hambúrgueres, almôndegas, embutidos, desidratados e cortes marinados (JURDI-HALDEMAN et

al., 1987; PIZZOCARO et al., 1994; EL-ALIM et al., 1999; AGUIRREZABAL et al., 2000; NISSEN et al., 2000; SUN et al., 2000; MC CARTHY et al., 2001; WONG e KITTS, 2002; YIN e CHENG, 2003; BELTRAN et al., 2004; RACANICCI et al., 2004; SALLAM et al., 2004; BRAGAGNOLO et al., 2005; 2007; ESTÉVEZ et al., 2007; MARIUTTI et al., 2008).

Os antioxidantes podem atuar por diversos mecanismos protegendo os lipídios alvo dos iniciadores da oxidação ou interrompendo a fase de propagação. O principal mecanismo de ação de compostos fenólicos, naturalmente presentes nos condimentos em geral, é a inativação de radicais livres de lipídios, diminuindo a produção de espécies reativas e consequentemente, interrompendo a fase de propagação da autooxidação lipídica (GORDON, 2004).

A atividade dos antioxidantes em sistemas alimentícios depende não apenas da reatividade química do antioxidante, ou seja, de aprisionar ou sequestrar radicais livres, quelar metais, entre outros, mas também de fatores como a localização física, a interação com outros componentes do alimento, além das condições ambientais. Desta forma, a eficácia de cada condimento ou erva aromática varia nos diferentes tipos de alimentos, não sendo possível estimar a ação antioxidante destes compostos a partir dos resultados obtidos em outros substratos (CHIPAULT et al., 1956). Além disso, o uso dos antioxidantes naturais deve ser compatível sensorialmente ao produto onde está sendo usado (LAI et al., 1991).

6.1. Sálvia (*Salvia officinalis*)

A família Lamiaceae consiste em aproximadamente 3500 espécies que são nativas principalmente na área do Mediterrâneo, embora algumas tenham origem na Austrália, no Sudoeste da Ásia e na América do Sul (CUPPET e HALL, 1998). Dentre elas, o alecrim e a sálvia têm sido extensivamente estudados e são conhecidos por possuírem grande capacidade antioxidante (MADSEN e BERTELSEN, 1995; CUPPETT e HALL, 1998; MARIUTTI et al., 2008b) relacionada aos seus compostos fenólicos, agindo de modo semelhante aos compostos sintéticos (LAI et al., 1991). Cuvelier et al. (1994) identificaram os constituintes antioxidantes da sálvia como sendo carnosol, rosmadial, ácido carnosínico, rosmanol e epirosmanol, previamente encontrados em alecrim e notadamente conhecidos por suas propriedades antioxidantes.

A ação da sálvia como antioxidante em alimentos foi inicialmente verificada por Chipault et al. (1956) em maionese, banha, massa de torta, molho para salada e em carne suína. Um controle eficaz da oxidação lipídica foi obtido através da adição de 0,05% de sálvia em hambúrgueres de carne suína (MC CARTHY et al., 2001); de um extrato etanólico de sálvia em carne de porco crua, pré-tratada com cloreto de sódio durante armazenamento sob congelamento (EL-ALIM et al., 1999); de uma mistura de alecrim e sálvia frescos (0,3% + 0,3%, p.p.) em hambúrgueres de carne congelados (PIZZOCARO et al., 1994) e do uso de extratos puros de sálvia e de alecrim, bem como da mistura dos dois extratos, em um sistema modelo de carne (WONG et al., 1995). Entretanto, estes extratos quando

adicionados a quantidades iguais de vitamina E não demonstraram efeito sinérgico em comparação à vitamina E pura.

Outra forma de aplicação da sálvia como antioxidante nos alimentos que vem sendo estudada é através da adição de seu óleo essencial. A adição de 0,1% de óleo essencial de sálvia em uma formulação de patê de fígado suíno reduziu a degradação dos PUFA e a formação de compostos voláteis provenientes da oxidação lipídica durante o armazenamento a 4°C por 90 dias (ESTÉVEZ et al., 2007) e a adição de 3% de óleo essencial de sálvia à carne homogeneizada foi eficiente no controle da oxidação lipídica durante a cocção e armazenamento a 4°C por 12 dias (FASSEAS et al., 2007).

6.2. Alho (*Allium sativum*)

Uma vasta gama de funções biológicas tem sido associada ao consumo de alho, dentre elas, a ação antimicrobiana (KREST et al., 2000; KYUNG et al., 2002); antitrombótica (BLOCK et al., 1986); anticâncer (HIRSCH et al., 2000; MOUSA, 2001); antiaterosclerótica (OREKHOV e TERTOV, 1997; SRINIVASAN et al., 2004); antioxidante (PRASAD et al., 1996; KIM et al., 1997; YIN e CHENG, 1998; WU et al., 2001; NUUTILA et al., 2003; OKADA et al., 2006); fortalecedora do sistema imunológico (LIU et al., 1998; KANG, 2001); a habilidade de baixar os níveis de lipídios e glicose no soro (ZHANG et al., 2001; LAWNSON et al., 2001; SINGH e PORTER, 2006) e a pressão sanguínea (ALI et al., 2000). Recentemente, Benavides et al. (2007) verificaram que a liberação de H₂S proveniente de

polissulfitos durante a metabolização de compostos orgânicos derivados de alho seria a responsável por uma ação vaso dilatadora cardioprotetora.

Os vegetais do gênero *Allium*, como o alho e a cebola, são extensamente utilizados na culinária brasileira e têm como característica marcante seu odor peculiar e sabor pungente que são propiciados pelos compostos organossulfurados presentes em sua composição.

A atividade antioxidante dos vegetais do gênero *Allium* tem sido atribuída, principalmente, a diversos compostos sulfúricos (NUUTILA et al., 2003). Por outro lado, Fernández-López et al. (2005) avaliaram o efeito antioxidante de um extrato hidrossolúvel de alho disponível no mercado através do método Rancimat e observaram efeito pró-oxidante. A atividade do alho depende dos compostos presentes no extrato, os quais podem diferir em função dos solventes que foram usados na extração e também da concentração usada em cada estudo (YIN e CHENG, 1998; NUUTILA et al., 2003).

Os trabalhos que avaliam os efeitos da adição de alho frente à oxidação de produtos alimentícios são escassos e apresentam resultados divergentes. Por um lado, resultados positivos, indicando uma atividade antioxidante relacionada à adição de alho ou extratos derivados de alho, foram verificados em carne moída adicionada de quatro compostos organossulfurados derivados de alho (dialil sulfito, dialil dissulfito, *S*-etil cisteína e *N*-acetil cisteína) resultando no retardo da oxidação lipídica e também da oximioglobina, mostrando-se mais eficiente do que a adição de α -tocoferol (YIN e CHENG, 2003). Além disso, em salsichas de frango cruas

durante o armazenamento a 3°C por 21 dias, a adição de alho fresco, alho desidratado e óleo de alho em diversas concentrações, resultou em valores de TBARS (substâncias reativas com o ácido tio-barbitúrico) iguais ou menores a salsichas adicionadas de BHA (0,01%) (SALLAM et al., 2004). Entretanto, a formulação destas salsichas de frango continha outras substâncias como fosfato de sódio, glutamato monossódico, nitrato de sódio e outros condimentos como pimenta branca, noz moscada, sálvia e pimenta da Jamaica e, de acordo com Mariutti et al. (2008a), a sálvia é capaz de conter parcialmente o efeito pró-oxidante causado pelo alho, permanecendo portanto, a dúvida quanto à atribuição do efeito antioxidante ao alho. Em outro trabalho, a adição de suco de alho em carne de ovelha reduziu o desenvolvimento da rancidez em comparação à carne pura (JURDI-HALDEMAN et al., 1987).

Por outro lado, um efeito pró-oxidante foi observado com a adição de 1% de alho fresco em bifes embalados a vácuo e submetidos à irradiação após 4 semanas de armazenamento a 4°C (WONG e KITTS, 2002). Além disso, em salsichas chinesas semidesidratadas (SUN et al., 2000) e em salsichas secas fermentadas tipo *chorizo* (AGUIRREZABAL et al., 2000), a adição de alho (tipo não especificado) à formulação não resultou em diferenças significativas quando os valores de TBARS foram comparados às amostras preparadas com a formulação controle.

7. Conclusão

O tratamento térmico e a aplicação de alta pressão são reconhecidamente eficientes na preservação de alimentos, porém, para a carne de frango, estes métodos também são fatores que podem desencadear ou acelerar a oxidação lipídica, resultando em alterações na qualidade sensorial e nutricional do produto, além de formar compostos potencialmente prejudiciais à saúde, como os óxidos de colesterol.

O uso de condimentos pode ser considerado uma forma eficiente para minimizar ou retardar a oxidação lipídica causada por estes fatores, prolongando sua vida de prateleira e preservando suas características.

A adição de sálvia tem apresentado resultados positivos nos diversos tipos de alimentos em que foi testada, sendo capaz de reduzir os efeitos causados pelo processamento e por outros fatores pró-oxidantes, como a adição de cloreto de sódio. Os compostos responsáveis pela ação antioxidante da sálvia e seu mecanismo de ação já são conhecidos.

Os estudos sobre a ação do alho na oxidação lipídica em alimentos são mais escassos e controversos. As diversas condições utilizadas nos diferentes trabalhos com a adição de alho em produtos alimentícios não permitem uma comparação direta entre estes, sugerindo que a ação do alho seja extremamente dependente da matriz estudada, da concentração e forma de adição do alho, dentre outros fatores. Os compostos sulfurados presentes no alho seriam os responsáveis pela sua possível ação antioxidante, porém, o provável mecanismo

de ação permanece desconhecido. A necessidade de investigações mais aprofundadas sobre o comportamento do alho frente à oxidação lipídica, bem como de seu mecanismo de ação é evidente.

Referências

AGUIRREZABAL, M. M.; MATEO, J.; DOMINGUEZ, M. C.; ZUMALACARREGUI, J. M. The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. **Meat Sci.**, 54, 77-81, 2000.

ALI, M.; AL-QATTAN, K. K.; AL-ENEZI, F.; KHANAFER, R. M. A.; MUSTAFA, T. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. **Prostag. Leukot. Ess.**, 62, 253-259, 2000.

ANDERSEN, M. L.; VELASCO, J.; SKIBSTED, L. H. Analysis of lipid oxidation by ESR spectroscopy. In *Analysis of lipid oxidation*, A. Kamal-Edin, J. Pokorný, Ed. AOCS Press: Champaign **2005**; pp 127-151.

ANDRES, C. Fats and foods. The health and nutrition factor. **Food Proc.**, 48, 41-47, 1987.

BAGGIO, S. R.; BRAGAGNOLO, N. Cholesterol oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage. **Food Chem.**, 95, 611-619, 2006a.

BAGGIO, S. R.; BRAGAGNOLO, N. Fatty acids, cholesterol oxides and cholesterol in Brazilian processed chicken products. **Ital. J. Food Sci.**, 18, 199-208, 2006b.

- 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.
- BELTRAN, E.; PLA, R.; YUSTE, J.; MOR-MUR, M. Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. **Meat Sci.**, 66, 719-725, 2004.
- BENAVIDES, G. A.; SQUADRITO, G. L.; MILLS, R. W.; PATEL, H. D.; ISBELL, T. S.; PATEL, R. P.; DARLEY-USMAR, V. M.; DOELLER, J. E.; KRAUS, D. W. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. **PNAS**, 104, 17977-17982, 2007.
- BLOCK, E.; AHMAD, S.; CATALFAMO, J. L.; JAIN, M. K.; APITZCASTRO, R. Antithrombotic Organosulfur Compounds from Garlic - Structural, Mechanistic, and Synthetic Studies. **J. Am. Chem. Soc.**, 108, 7045-7055, 1986.
- BONOLI, M.; CABONI, M. F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; LERCKER, G. Effect of feeding fat sources on the quality and composition of lipids of precooked ready-to-eat fried chicken patties. **Food Chem.**, 101, 1327-1337, 2007.
- 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.; DANIELSEN, B.; SKIBSTED, L. H. Combined effect of salt addition and high-pressure processing on formation of free radicals in chicken thigh and breast muscle. **Eur. Food Res. Technol.**, 223, 669-673, 2006.
- BRAGAGNOLO, N.; DANIELSEN, B.; SKIBSTED, L. H. Rosemary as antioxidant in pressure processed chicken during subsequent cooking as evaluated by electron spin resonance spectroscopy. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, 8, 24-29, 2007.

- BRAGAGNOLO, N. Cholesterol and cholesterol oxides in meat and meat products. In *Handbook of Muscle Foods Analysis*, L. M. L. Nollet, F. Toldrá, Ed. CRC Press: Boca Raton, **2009**; pp. 187-219.
- BROWN, O.; JESSUP, W. Oxysterols and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 142, 1-28, 1999.
- CARLSEN, C. U.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Oxidative stability of processed pork, assay based on ESR detection of radicals. **Eur. Food Res. Technol.**, , 213, 170-173, 2001.
- CANTOR, A. H.; DECKER, E. A; COLLINS, V. P. Fatty acids in poultry and egg products. In *Fatty acids in foods and their health implications*, C. K. Chow, 3rd Ed. CRC Press: Boca Raton, **2008**. e-book, disponível em www.foodnetbase.com, acessado em 15/10/2008.
- CHEFTEL, J. C.; CULIOLI, J. Effects of high pressure on meat: A review. **Meat Sci.**, 46, 211-236, 1997.
- CHIPAULT, J. R.; MIZUNO, G. R.; LUNDBERG, W. O. The antioxidant properties of spices in foods. **Food Technol.**, 10, 209-211, 1956.
- CONCHILLO, A.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Combined effect of cooking (grilling and roasting) and chilling storage (with and without air) on lipid and cholesterol oxidation in chicken breast. **J. Food Prot.**, 66, 840-846, 2003.
- CONCHILLO, A.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. The effect of cooking and storage on the fatty acid profile of chicken breast. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 106, 301-306, 2004.
- CONCHILLO, A.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. **J. Sci. Food Agric.**, 85, 141-146, 2005.

- CORL, B. A.; BARBANO, D. M.; BAUMAN, D. E.; IP, C. *Cis*-9, *trans*-11 CLA derived endogenously from *trans*-11 18:1 reduces cancer risk in rats. **J. Nutr.** 133, 2893–2900, 2003.
- CUPPETT, S. L.; HALL III, C. A. Antioxidant activity of the Labiatae. **Adv. Food Nutr. Res.**, 42, 245-271, 1998.
- CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). **J. Agric. Food Chem.**, 42, 665-669, 1994.
- DECKER, E. A.; XU, Z. Minimizing rancidity in muscle foods. **Food Technol.**, 52, 54-59, 1998.
- DEFILIPPIS, A. P.; SPERLING, L. S. Understanding omega-3's. **Am. Heart J.**, 151, 564-570, 2006.
- DEPARTMENT OF HEALTH. **1994**. Report on health and social subjects, 46. Nutritional aspects of cardiovascular disease. Her Majesty's Stationery Office, London.
- EATON, G. R.; EATON, S. S. Electron Paramagnetic Resonance. In *Analytical Instrumentation Handbook*, G.W.Ewing, Ed. Marcel Dekker, Inc.: **1990**; pp 467-530.
- 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.
- EL-ALIM, S. S. L. A.; LUGASI, A.; HÓVÁRI, J.; DWORSCHÁK, E. Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. **J. Sci. Food Agric.**, 79, 277-285, 1999.

- ENDO, K.; TOMOKAZU, O.; SAIKI, A.; BAN, N.; OHIRA, M.; KOIDE, N.; MURANO, T.; WATANABE, H.; NISHII, M.; MIURA, M.; SEKINE, K.; MIYASHITA, Y.; SHIRAI, K. Determination of serum 7-ketocholesterol concentrations and their relationships with coronary multiple risks in diabetes mellitus. **Diabetes Res. Clin. Pr.**, 80, 63–68, 2008.
- ERICKSON, M. C. Lipid oxidation of muscle foods. In *Food lipids: Chemistry, nutrition, and biotechnology*, second ed.; C.C. Akoh, D. B. Min, Ed. Marcel Dekker, Inc.: New York, **2002**. e-book, disponível em www.foodnetbase.com, acessado em 23/05/2006.
- ESTEVEZ, M.; RAMIREZ, R.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pate. **Lebensm. Wiss. Technol.**, 40, 58-65, 2007.
- FASSEAS, M. K.; MOUNTZOURIS, K. C.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M; ZERVAS, G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chem.**, 106, 1188-1194, 2007.
- FERDERBAR, S.; PEREIRA, E. C.; APOLINÁRIO, E.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A.; MONTE, O.; CALLIARI, L. E.; SALES, J. E.; GAGLIARDI, A. R.; XAVIER, H. T.; ABDALLA, D. S. P. Cholesterol oxides as biomarkers of oxidative stress in type 1 and type 2 diabetes *mellitus*. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, 23, 35–42, 2007.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; ZHI, N.; ALESON-CARBONELL, L.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; KURI, V. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. **Meat Sci.**, 69, 371-380, 2005.
- FINKELSTEIN, E.; ROSEN, G. M.; RAUCKMAN, E. J. Spin Trapping. Kinetics of the Reaction of Superoxide and Hydroxyl Radicals with Nitrones. **J. Am. Chem. Soc.**, 102, 4994-4999, 1980.
- FINOCCHIARO, E.T.; RICHARDSON, T. Sterol oxides in foodstuffs: a review. **J. Food Protec.**, 46, 917-925, 1983.

- FLORENT-BÉCHARD, S.; MALAPLATE-ARMAND, C.; KOZIEL, V.; KRIEM, B.; OLIVIER, J.; PILLOT, T.; OSTER, T. Towards a nutritional approach for prevention of Alzheimer's disease: Biochemical and cellular aspects. **J. Neurol. Sci.**, 262, 27–36, 2007.
- GALVIN, K.; MORRISEY, P. A.; BUCKLEY, D. J. Cholesterol oxides in processed chicken muscle as influenced by dietary α -tocopherol supplementation. **Meat Sci.**, 48, 1-9, 1998.
- 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, **2002**; pp 241-277.
- GARDNER, H. W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Bio. Med.**, 7, 65-86, 1989.
- GIRAO, H.; MOTA, M. C.; RAMALHO, J.; PEREIRA, P. Cholesterol oxides accumulate in human cataracts. **Exp. Eye Res.**, 66, 645-652, 1998.
- GORDON, M. H. Factors affecting lipid oxidation. In *Understanding and measuring the shelf-life of food*, R. Steel, Ed. CRC Press, Boca Raton, **2004**. e-book, disponível em www.foodnetbase.com, acessado em 15/10/2008.
- GRAU, A.; GUARDIOLA, F.; GRIMPA, S.; BARROETA, A. C.; CODONY, R. Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: influence of dietary fat and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. **Poult. Sci.**, 80, 1630-1642, 2001.
- 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.
- HARGREAVES, J.; LE MESTE, M.; POPINEAU, Y. ESR studies of gluten-lipid systems. **J. Cereal Sci.**, 19, 107-113, 1994.

- HIRSCH, K.; DANILENKO, M.; GIAT, J.; MIRON, T.; RABINKOV, A.; WILCHEK, M.; MIRELMAN, D.; LEVY, J.; SHARONI, Y. Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. **Nutr. Cancer**, 38, 245-254, 2000.
- HODIS, H. N.; CRAWFORD, D. W.; SEVANIAN, A. Cholesterol feeding increases plasma and aortic tissue cholesterol oxide levels in parallel: further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 89,117-126, 1991.
- HOGAN, E.; KELLY, A. L.; SUN, D. High pressure processing of foods: an overview. In: *Emerging technologies for food processing*. D. Sun, Ed. Elsevier Academic Press: San Diego, **2005**, pp. 3-32.
- HUR, S. J.; PARK, G. B.; JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. **Food Control**,18, 939-947, 2007.
- INNIS, S. M. Fatty acids and early human development. **Early Hum. Dev.**, 83, 761-766, 2007.
- JANZEN, E. G.; KRYGSMAN, P. H.; LINDSAY, D. A.; HAIRE, D. L. Detection of alkyl, alkoxy, and alkyperoxyl radicals from the thermolysis of azobis(isobutyronitrile) by ESR/spin trapping. evidence for double spin adducts from liquid-phase chromatography and mass spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, 112, 8279-8284, 1990.
- JOHNSTON, D. E. High pressure effects on milk and meat. In: *High pressure processing of foods*. D. A. Ledward, D.E. Johnston, R. G. Earnshaw, A. P. M. Hasting, Ed. Nottingham University Press: Nottingham, **1995**, pp. 99-122.
- JUDD, J. T.; CLEVIDENCE, B. A.; MUESING, R. A.; WITTES, J.; SUNKIN, M. E.; PODCZASY, J. J. Dietary *trans* fatty acids: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women. **Am. J. Clin. Nutr.**, 59, 861-868, 1994.

- JUDD, J. T.; BAER, D. J.; CLEVIDENCE, B. A.; KRIS-ETHERTON, P.; MUESING, R. A.; IWANE, M. Dietary *cis* and *trans* monounsaturated and saturated FA and plasma lipids and lipoproteins in men. **Lipids**, 37, 123-131, 2002.
- JURDI-HALDEMAN, D.; MACNEIL, J. H.; YARED, D. M. Antioxidant Activity of Onion and Garlic Juices in Stored Cooked Ground Lamb. **J. Food Protect.**, 50, 411-413, 1987.
- KANG, N. S.; MOON, E. Y.; CHO, C. G.; PYO, S. Immunomodulating effect of garlic component, allicin, on murine peritoneal macrophages. **Nutr. Res.**, 21, 617-626, 2001.
- KEYS, A.; PARLIN, R. W. Serum cholesterol response to changes in dietary lipids. **Am. J. Clin. Nutr.**, 19, 175–181, 1966.
- KIM, S. M.; KUBOTA, K.; KOBAYASHI, A. Antioxidative activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic. **Biosci. Biotech. Bioch.**, 61, 1482-1485, 1997.
- KNAPP, H. R. Dietary fatty acids in human thrombosis and hemostasis. **Am. J. Clin. Nutr.**, 65, 1687S-1698S, 1997.
- KOLSCH, H.; LUTJOHANN, D.; TULKE, A.; BJORKHEM, I.; RAO, M. L. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Brain Res.**, 818, 171-175, 1999.
- KREST, I.; GLODEK, J.; KEUSGEN, M. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species. **J. Agric. Food Chem.**, 48, 3753-3760, 2000.
- KYUNG, K. H.; KIM, M. H.; PARK, M. S.; KIM, Y. S. Alliinase-independent inhibition of *Staphylococcus aureus* B33 by heated garlic. **J. Food Sci.**, 67, 780-785, 2002.
- LAI, S.; GRAY, J. I.; SMITH, D. M.; BOOREN, A. M.; CRACKEL, R. L.; BUCKLEY, D. J. Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. **J. Food Sci.**, 56, 616-620, 1991.

- LAWSON, L. D.; WANG, Z. J.; PAPADIMITRIOU, D. Allicin release under simulated gastrointestinal conditions from garlic powder tablets employed in clinical trials on serum cholesterol. **Planta Med.**, 67, 13-18, 2001.
- 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.
- LEISTNER, L. Hurdle effect and energy saving. In *Food Quality and Nutrition*,. W. K. Downey , Ed. Applied Science Publishers: London, **1978**; p. 553.
- LEISTNER, L.; GOULD, G. W. *Hurdle technologies – combination treatments for food stability, safety and quality*. Kluwer Academic / Plenum Publishers: New York , **2002**; p.194.
- LEMAIRE-EWING, S.; PRUNET, C.; MONTANGE, T.; VEJUX, A.; BERTHIER, A.; BESSÈDE, G.; CORCOS, L.; GAMBERT, P.; NÉEL, D.; LIZARD, G. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. **Cell Biol. Toxicol.**, 21, 97–114, 2005.
- LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Oxidized products of cholesterol: Dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). **J. Nutr. Biochem.**, 13, 700-710, 2002.
- LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T. Cholesterol oxidation mechanisms. In *Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence, and biological effects*, F. Guardiola, P.C. Dutta, R. Codony, G.P. Savage, Ed. Springer: Champaign, **2002**; pp 1-25.
- LI, N.; OHSHIMA, T.; SHOZEN, K.; USHIO, H.; KOIZUMI, C. Effects of the degree of unsaturation of coexisting triacylglycerols on cholesterol oxidation. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 71, 623-627, 1994.

- LIU, C. T.; CHEN, H. W.; SHEEN, L. Y.; KUNG, Y. L.; CHEN, P. C. H.; LII, C. K. Effect of garlic oil on hepatic arachidonic acid content and immune response in rats. **J. Agric. Food Chem.**, 46, 4642-4647, 1998.
- LIZARD, G.; LEMAIRE, S.; MONIER, S.; GUELDRY, S.; NÉEL, D.; GAMBERT, P. Induction of apoptosis and of interleukin-1 β secretion by 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression. **FEBS Letters**, 419, 276-280, 1997.
- LOMBARDI-BOCCIA, G.; MARTINEZ-DOMINGUEZ, B.; AGUZZI, A. Total heme and non-heme iron in raw and cooked meats. **J. Food Sci.**, 67, 1738-1741, 2002.
- LUTJOHANN, D.; PAPASSOTIROPOULOS, A.; BJORKHEM, I.; LOCATELLI, S.; BAGLI, M.; OEHRING, R. D.; SCHLEGEL, U.; JESSEN, F.; RAO, M. L.; VON BERGMANN, K.; HEUN, R. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. **J. Lipid Res.**, 41, 195-198, 2000.
- MA, H. J.; LEDWARD, D. A.; ZAMRI, A. I.; FRAZIER, R. A.; ZHOU, G. H. Effects of high pressure/thermal treatment on lipid oxidation in beef and chicken muscle. **Food Chem.**, 104, 1575-1579, 2007.
- MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends Food Sci. Tech.**, 6, 271-277, 1995.
- MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Incidência de óxidos de colesterol em cortes de frango submetidos a diferentes tratamentos térmicos. **Anais do XII Congresso Latino-Americano de Óleos e Gorduras**. CD, 10: 1-6, 2007.
- MARIUTTI, L. R. B.; ORLIEN, V.; BRAGAGNOLO, N.; SKIBSTED, L. H. Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. **Eur. Food Res. Technol.**, 227, 337-344, 2008a.

- MARIUTTI, L. R. B.; BARRETO, G.P.M.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A.Z. Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, 51, 1225-1232, 2008b.
- MARASCHIELLO, C.; ESTEVE, E.; GARCÍA-REGUEIRO, J.A. Cholesterol oxidation in meat from chickens fed α -tocopherol and β -carotene-supplemented diets with different unsaturation grades. **Lipids**, 33, 705-713, 1998.
- MENSINK, R. P.; KATAN, M.B. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. **New Engl. J. Med.**, 323, 439-445, 1990
- MC CARTHY, T. L.; KERRY, J. P.; KERRY, J. F.; LYNCH, P. B.; BUCKLEY, D. J. Assessment of the antioxidant potencial of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. **Meat Sci.**, 57, 177-184, 2001.
- MILE, B. Free radical participation in organic chemistry: electron spin resonance (ESR) studies of their structures and reactions. **Curr. Org. Chem.**, 4, 55-83, 2000.
- MILLER, A.; MCGRATH, E.; STANTON, C.; DEVERY, R. Vaccenic acid (*t*11-18:1) is converted to *c*9,*t*11-CLA in MCF-7 and SW480 cancer cells. **Lipids**, 38, 623–632, 2003.
- MONAHAN, F. J. Oxidation of lipids in muscle foods: fundamental and applied concerns. In: *Antioxidants in muscle foods – Nutritional strategies to improve quality*. E. Decker, C. Faustman, C. J. Lopez-Bote, Ed. A John Wiley & Sons, Inc.: Canada, **2000**, pp. 3-24.
- MORRISON, J. A.; GLUECK, C. J.; WANG, P. Dietary *trans* fatty acid intake is associated with increased fetal loss. **Fertil. Steril.**, 90, 385-390, 2008.
- MOSLEY, E. E.; MCGUIRE, M. K.; WILLIAMS, J. E.; MCGUIRE, M. A. *Cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid is synthesized from vaccenic acid in lactating women. **J. Nutr.**, 136, 2297–2301, 2006.

- MOUSA, A. S. Discovery of angiogenesis inhibition by garlic ingredients: Potential anti-cancer benefits. **FASEB J.**, 15, A117-A117, 2001.
- NISSEN, L. R.; MANSSON, L.; BERTELSEN, G.; HUYNH-BA, T.; SKIBSTED, L. H. Protection of dehydrated chicken meat by natural antioxidants as evaluated by electron spin resonance spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 48, 5548-5556, 2000.
- NOGUEIRA, G. C.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Alteração da relação $\omega 6/\omega 3$ de coxas de frango submetidas a diferentes métodos de cozimento. **Anais do XII Congresso Latino-Americano de Óleos e Gorduras**. CD, 2: 1-6, 2007a.
- NOGUEIRA, G. C.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Relação entre o método de cozimento e a composição de ácidos graxos em peito de frango. **Anais do XII Congresso Latino-Americano de Óleos e Gorduras**. CD, 15: 1-6, 2007b.
- NUUTILA, M.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AARNI, M.; OKSMAN-CALDENTHEY, K. M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chem.**, 81, 485-493, 2003.
- OHTANI, K.; MIYABARA, K.; OKAMOTO, E.; KAMEL, M.; MATSUI-YUASA, I. Cytotoxicity of 7-cetocholesterol toward cultured rat hepatocytes and the effect of vitamin E. **Biosci. Biotech. Bioch.**, 60, 1989-1993, 1996.
- OHTANI, K.; TERADA, E.; KAMEL, M.; MATSUI-YUASA, I. Cytotoxicity of cholestane 3 β ,5 α ,6 β - triol on cultured intestinal crypt cells (IEC-6). **Biosci. Biotech. Bioch.**, 61, 573-576, 1997.
- OKADA, Y.; TANAKA, K.; SATO, E.; OKAJIMA, H. Kinetic and mechanistic studies of allicin as an antioxidant. **Org. Biomol. Chem.**, 4, 4113-4117, 2006.
- OREKHOV, A. N.; TERTOV, V. V. *In vitro* effect of garlic powder extract on lipid content in normal and atherosclerotic human aortic cells. **Lipids**, 32, 1055-1060, 1997.

- ORLIEN, V.; HANSEN, E.; SKIBSTED, L. H. Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. **Eur. Food Res. Technol.**, 211, 99-104, 2000.
- 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, **2002**; pp 278-318.
- PANIANGVAIT, P.; KING, A. J.; JONES, A. D.; GERMAN, B. G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **J. Food Sci.**, 60, 1159-1174, 1995.
- PARK, S. W.; ADDIS, P. B. Cholesterol oxidation products in some muscle foods. **J. Food Sci.**, 52, 1500-1503, 1987.
- PAZOS, M.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Amino acid and protein scavenging of radicals generated by iron/hydroperoxide system: an electron spin resonance spin trapping study. **J. Agric. Food Chem.**, 54, 10215-10221, 2006.
- PENG, S. K.; TAYLOR, C. B; HILL, J. C.; MORIN, R. J. Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage. **Atherosclerosis**, 54, 121-133, 1985.
- 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.
- PIKUL, J.; LESZCZYNSKI, D. E.; BECHTEL, P. J.; KUMMEROW, F.A. Effect of frozen storage and cooking on lipid oxidation in chicken meat. **J. Food Sci.**, 49, 838-843, 1984.
- PIZZOCARO, F.; SENESI, E.; BABBINI, G. Effetto protettivo di salvia e rosmarino freschi su hamburger surgelati di carne bovina. **Industrie Alimentari**, 33, 289-294, 1994.
- PRASAD, K.; LAXDAL, V. A.; YU, M.; RANEY, B. L. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. **Mol. Cell. Biochem.**, 154, 55-63, 1996.

- RACANICCI, A. M. C.; DANIELSEN, B.; MENTEN, J. F. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chill-storage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Eur. Food Res. Technol.**, 218, 521-524, 2004.
- RHEE, K. S. Enzymic and nonenzymic catalysis of lipid oxidation in muscle foods. **Food Technol.**, 42, 127-132, 1988.
- RØDTJER, A.; SKIBSTED, L. H.; ANDERSEN, M. L. Antioxidative and prooxidative effects of extracts made from cherry liqueur pomace. **Food Chem.**, 99, 6-14, 2006.
- SALLAM, K. I.; ISHLOROSHI, M.; SAMEJIMA, K. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. **Lebensm. Wiss. Technol.**, 37, 849-855, 2004.
- SALMERÓN, J.; HU, F. B; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; RIMM, E. B.; WILLETT, W. C. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. **Am. J. Clin. Nutr.**, 73, 1019–1026, 2001.
- SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Prog. Lipid Res.**, 47, 147-155, 2008.
- SEVANIAN, A.; PETERSON, A. R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. **Food Chem. Toxicol.**, 24, 1103-1110, 1986.
- SEVILLA, C. L.; BECKER, D.; SEVILLA, M. D. An electron spin resonance investigation of radical intermediates in cholesterol and related compounds: relation to solid-state autoxidation. **J. Phys. Chem.**, 90, 2963-2968, 1986.
- SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, 70, 560S–569S, 1999.
- SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of *omega*-6/*omega*-3 essential fatty acids. **Biomed. Pharmacother.**, 56, 365-379, 2002.

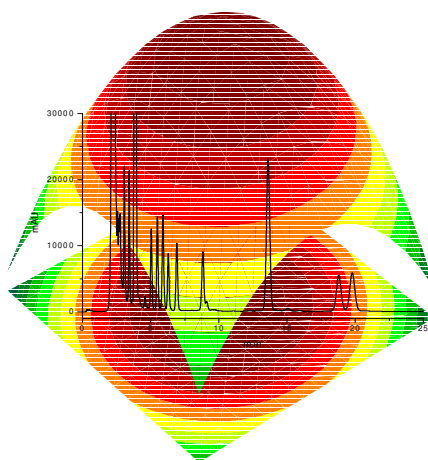
- SINGH, D. K.; PORTER, T. D. Inhibition of sterol 4 alpha-methyl oxidase is the principal mechanism by which garlic decreases cholesterol synthesis. **J. Nutr.**, 136, 759S-764S, 2006.
- SMITH, L. L. Cholesterol autoxidation: 1981-1986. **Chem. Phys. Lipids**, 44, 87-125, 1987.
- SMITH, L. L. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. **Lipids**, 31, 453-487, 1996.
- SMITH, L. L.; JOHNSON, B. H. Biological activities of oxysterols. **Free Radical Bio. Med.**, 7, 285-332, 1989.
- SRINIVASAN, K.; SAMBAIAH, K.; CHANDRASEKHARA, N. Spices as beneficial hypolipidemic food adjuncts: a review. **Food Rev. Int.**, 20, 187-220, 2004.
- SUMMERS, L. K. M; FIELDING, B. A.; BRADSHAW, H. A.; ILIC, V.; BEYSEN, C.; CLARK, M. L.; MOORE, N. R.; FRAYN, K. N. Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. **Diabetologia**, 45, 369-377, 2002.
- SUN, Y. M.; OCKERMAN, H. W.; MARRIOTT, N. G. Garlic in Chinese sausage. **J. Muscle Foods**, 11, 35-43, 2000.
- THOMSEN, M. K.; JACOBSEN, C.; SKIBSTED, L. H. Mechanism of initiation of oxidation in mayonnaise enriched with fish oil as studied by electron spin resonance spectroscopy. **Eur. Food Res. Technol.**, 211, 381-386, 2000.
- VESSBY, B.; UUSITUPA, M.; HERMANSEN, K.; RICCARDI, G.; RIVELLESE, A. A.; TAPSELL, L. C. ; NÄLSÉN, C.; BERGLUND, L.; LOUHERANTA, A.; RASMUSSEN, B. M.; CALVERT, G. D.; MAFFETONE, A.; PEDERSEN, E.; GUSTAFSSON, I. B.; STORLIEN, L. H. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU study. **Diabetologia**, 44, 312-319, 2001.

- 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**, 32, 887-893, 1997.
- VINIKOOR, L. C.; SCHROEDER, J. C.; MILLIKAN, R. C.; SATIA, J. A.; MARTIN, C. F.; IBRAHIM, J.; GALANKO, J. A.; SANDLER, R. A. Consumption of *trans*-fatty acid and its association with colorectal adenomas. **Am. J. Epidemiol.**, 168, 289-297, 2008.
- WIGGERS, S. B.; KROGER-OHLSSEN, M. V.; SKIBSTED, L. H. Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast during chill storage and subsequent heat treatment: effect of working pressure, packaging atmosphere and storage time. **Eur. Food Res. Technol.**, 219, 167-170, 2004.
- WONG, J. W.; HASHIMOTO, K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model system. **J. Agric. Food Chem.**, 43, 2707-2712, 1995.
- WONG, P. Y. Y.; KITTS, D. D. The effects of herbal pre-seasoning on microbial and oxidative changes in irradiated beef steaks. **Food Chem.**, 76, 197-205, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **2003**. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva, WHO.
- WU, C. C.; SHEEN, L. Y.; CHEN, H. W.; TSAI, S. J.; LII, C. K. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. **Food Chem. Toxicol.**, 39, 563-569, 2001.
- YIN, M. C.; CHENG, W. Antioxidant activity of several *Allium* members. **J. Agric. Food Chem.**, 46, 4097-4101, 1998.
- YIN, M. C.; CHENG, W. S. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. **Meat Sci.**, 63, 23-28, 2003.

ZHANG, X. H.; LOWE, D.; GILES, P.; FELL, S.; CONNOCK, M. J.; MASLIN, D. J. Gender may affect the action of garlic oil on plasma cholesterol and glucose levels of normal subjects. **J. Nutr.**, 131, 1471-1478, 2001.

CAPÍTULO 2

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF ANALYTICAL CONDITIONS FOR CHOLESTEROL AND CHOLESTEROL OXIDES EXTRACTION IN CHICKEN MEAT USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY



"Reprinted with permission from 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, (9), 2913-2918. © Copyright 2008 American Chemical Society."

ABSTRACT

The analytical conditions for the extraction of cholesterol and cholesterol oxides in chicken meat were optimized by means of response surface methodology. The separation and identification were performed by normal phase HPLC using UV and refractive index (RI) detectors, and the confirmation of the 11 cholesterol oxides identities in the samples was verified by HPLC-APCI-MS. The developed methodology showed good analytical performance, presenting recovery levels from 84 to 103% and detection limits varying from 0.01 to 0.06 µg/g for UV detection and from 1.98 to 2.12 µg/g for RI detection. The present study demonstrated the presence of 22*R*-hydroxycholesterol, 24*S*-hydroxycholesterol, and 22*S*-hydroxycholesterol for the first time in chicken meat.

INTRODUCTION

Food of animal origin containing significant cholesterol amount is susceptible to supplying dietary cholesterol oxides (COP). Although there are no established safety levels for COP ingestion, these compounds can be absorbed from the diet in a proportion of 6-90%, constituting a risk for human health due to chronic exposure (1). The toxicological relevance of the COP results from their potentially atherogenic, cytotoxic, mutagenic, and possibly carcinogenic effects (2-6). Moreover, COP can influence enzymatic activity in cholesterol metabolism and the modulation of cell membrane stability and function, and COP also have been implicated on some chronic and degenerative diseases (5, 6).

Cholesterol oxidation can be initiated by exposure to light, oxygen, radiation, transition metals, and unsaturated fatty acids, by a mechanism of chain reactions of free radicals in a similar way of lipid oxidation (7, 8). The cholesterol oxides of biological interest most commonly reported in foodstuffs are those derived from the B-ring of the main chain, such as 5,6 α -epoxycholesterol, 5,6 β -epoxycholesterol, cholestanetriol, 7-ketcholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, 7 α -hydroxycholesterol, and, in lower concentrations, derivatives of the side chain, such as 20 α -hydroxycholesterol, and 25-hydroxycholesterol (2, 9).

Chicken meat is particularly susceptible to lipid oxidation as it has a high proportion of unsaturated fatty acids, and the formation of COP in processed chicken appears to vary depending on the part of the chicken and cooking method used (10-17). The levels of COP reported in fresh or freshly processed chicken are

generally low or undetectable (12, 15-18). On the other hand, cooking methods can increase significantly cholesterol oxidation up to 1.5 % (COP/cholesterol) in fried chicken patties (10), raising in 4 to 10 times the total COP content (10-17).

To obtain reliable results with good recovery levels and also to avoid the artifact formation due to cholesterol instability under the analytical conditions, it is recommended that mild analytical conditions be used with a limited number of steps in the procedure. In fact, the cold saponification of milk powders, followed by the extraction of cholesterol and COP using an organic solvent, showed higher accuracy and repeatability than methods involving previous extraction of the lipids (19); this method is also suitable for egg (20) and fish (21) analysis.

The aims of this work were to (i) optimize saponification and extraction conditions of cholesterol and COP by means of the experimental design methodology, (ii) validate a methodology for simultaneous determination of 11 COP and cholesterol in chicken meat, and (iii) apply the method to the determination of the cholesterol and COP contents in chicken breast subjected to different cooking processes.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and Reagents. Cholesterol and cholesterol oxide standards 20 α -hydroxycholesterol (20 α -OH), 22S-hydroxycholesterol (22S-OH), 25-hydroxycholesterol (25-OH), 5,6 α -epoxycholesterol (α -EP), 5,6 β -epoxycholesterol (β -EP), and 7-ketocholesterol (7-keto) were purchased from Sigma (Milford, MA); 22R-hydroxycholesterol (22R-OH), 24S-hydroxycholesterol (24S-OH), 25R-

hydroxycholesterol (25R-OH), 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OH), and 7 α -hydroxycholesterol (7 α -OH) were acquired from Steraloids (Newport, RI). The purities of the standards varied from 95 to 98%.

Chicken Samples. For the optimization of the saponification and extraction conditions, 3 kg of chicken breast meat without skin and bones was minced using a food processor. 60 ± 0.5 g was used for each patty. The patties were grilled at 170 °C for 4 min on each side, until the core temperature reached 70 °C. For the application of the methodology, 4 kg of chicken breast without bone was divided into four portions of 1 kg. One portion was analysed raw (R), and the other portions were subjected to three cooking procedures during 20 min: one portion was roasted at 220 °C (RO), one portion was deep fried in soybean oil at 180 °C (DF), and the other was boiled in water (BO). In addition, two whole ready-to-eat condimented chickens cooked in an electric rotatory oven were acquired, and the breasts (ER) were used in the analysis. All of the apparent connective and adipose tissues were removed after thermal treatments, and the samples were ground before analysis. The samples were purchased at a local market in Campinas, São Paulo, Brazil.

Experimental Design. The saponification and extraction procedures based on the method developed by Mazalli et al. (20) were optimized by means of response surface methodology (22). First, two factorial screening designs 2^{7-3} (plus three central points) were carried out to verify the simultaneous effects of seven independent variables (**Table 1**) on the cholesterol and COP extraction efficiency

and also to choose the best solvent for the extraction of unsaponifiable matter between hexane and diethyl ether. The independent variables were the weight of the chicken sample (**w**), the concentration of the ethanolic KOH solution (**KOH**), the saponification time (**t**), the volume of water added for partition (**H₂O**), the number of extractions (**n**), the number of washes for clean up (**c**) of the unsaponifiable matter, and the solvent volume used to wash the anhydrous sodium sulphate in the filter paper (**s**). After that, a central composite design 2^4 with eight axial points and four central points was developed using the statistically significant variables ($p < 0.10$) plus the weight of chicken sample. Cholesterol and 25-OH contents were set as the response variables.

Table 1. Levels of Independent Variables of Factorial Screening Design 2^{7-3}

variable	unit	-1	0	+1
<i>w</i>	g	1.0	1.5	2.0
KOH	%	10	15	20
<i>t</i>	h	20	22	24
H ₂ O	mL	10	20	30
<i>n</i>		3	4	5
<i>c</i>		2	3	4
<i>s</i>	mL	10	15	20

Method Validation. The analytical method was validated for linearity, recovery, repeatability, and limits of detection. Linearity was observed through correlation

coefficients (R^2) of the calibration curves constructed with seven points of standard solutions, with concentrations ranging from 0.2 to 6 mg/mL for cholesterol and from 0.5 to 100 µg/mL for the cholesterol oxides. The recovery analysis for cholesterol and cholesterol oxides were performed separately, and both were carried out in two levels with 10 replicates for each level. Repeatability was evaluated using the relative standard deviations (RSD). Detection and quantification limits were calculated according to IUPAC recommendations (23).

HPLC Analysis. A Shimadzu (Kyoto, Japan) liquid chromatograph was used equipped with UV (SPD-10 AVVP) and RI (RID-10 A) detectors. The analytical column was a Nova Pack CN HP (Waters, Milford, MA), 300 x 3.9 mm i.d. x 4 µm; injection loop of 20 µL; oven temperature was 32 °C. The mobile phase was n-hexane/2 propanol (97:3) at a flow rate of 1 mL/min (21). The epimeric 5,6-epoxides were quantified using the RI detector. Cholesterol and the other COP were quantified using the UV detector at 210 nm. Identification of cholesterol and COP was made by comparison of retention times of peaks in samples with those of reference standards and spiking. Quantification was done by external calibration. Characteristic chromatograms of the cholesterol and COP standards and spiked chicken (there was no sample containing all the COP at the same time) are shown in **Figures 1 and 2**.

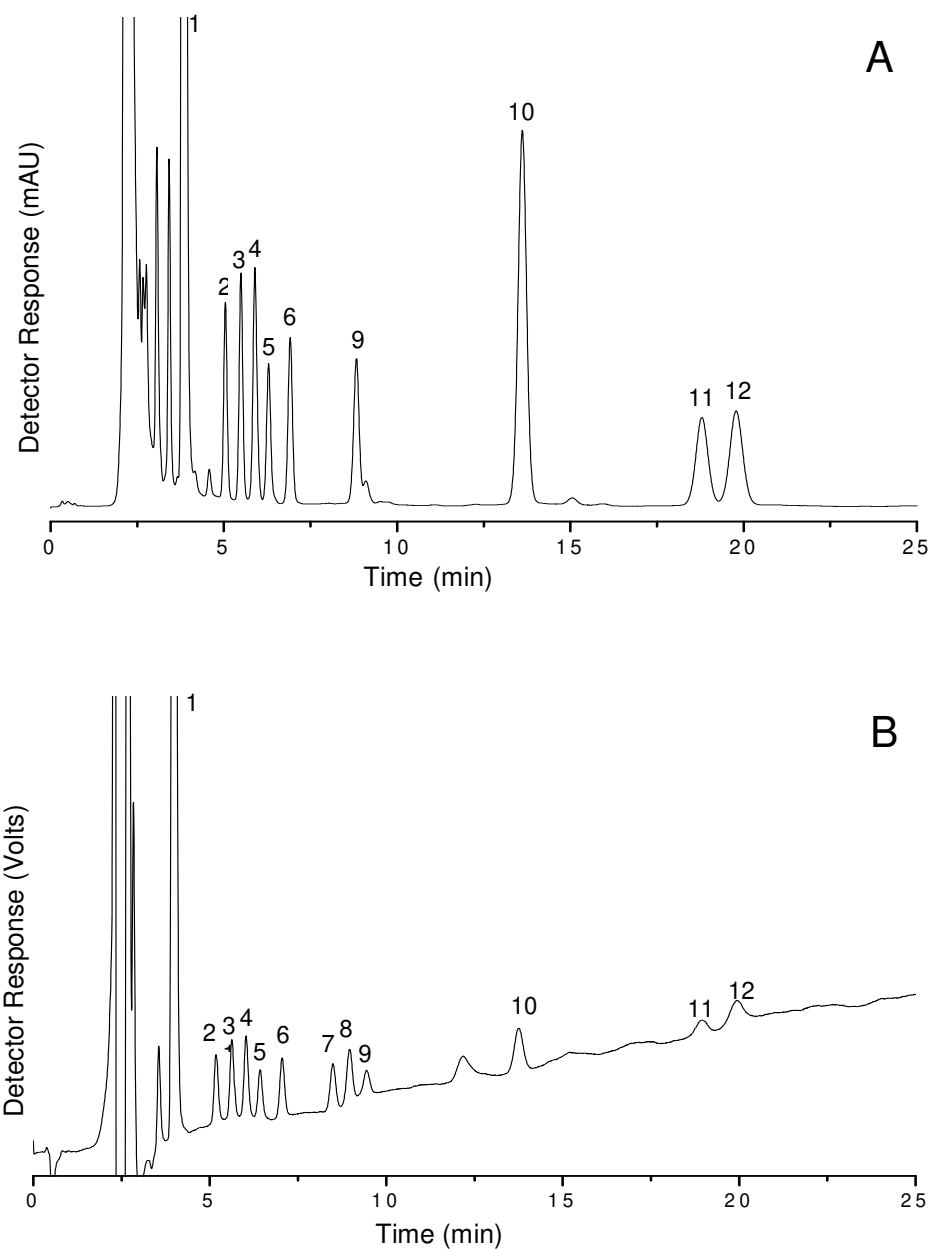


Figure 1. Chromatograms of cholesterol (peak 1) and cholesterol oxides standards: 20 α -OH (2), 22R-OH (3), 24S-OH (4), 22S-OH (5), 25-OH (6), α -EP (7), β -EP (8), 25R-OH (9), 7-keto (10), 7 β -OH (11), and 7 α -OH (12) obtained by (A) UV and (B) RI detector.

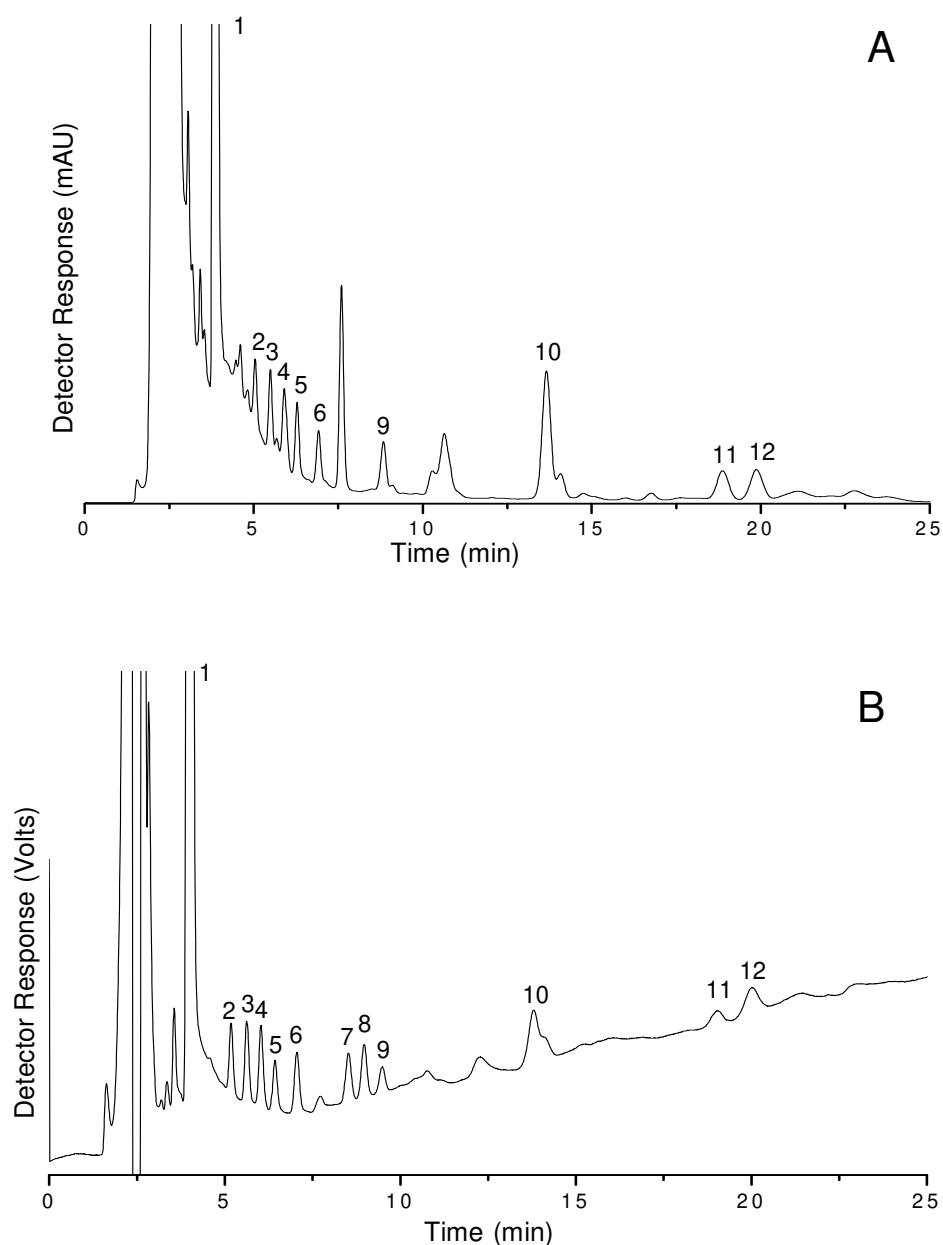


Figure 2. Chromatograms of cholesterol (peak 1) and cholesterol oxides in spiked chicken meat: 20 α -OH (2), 22R-OH (3), 24S-OH (4), 22S-OH (5), 25-OH (6), α -EP (7), β -EP (8), 25R-OH (9), 7-keto (10), 7 β -OH (11), and 7 α -OH (12) obtained by (A) UV and (B) RI detector.

HPLC-APCI-MS Analysis. To confirm the identity of the COP, the chicken samples were injected into a Shimadzu HPLC equipped with quaternary pumps (LC-20AD) and a degasser unit (DGU-20A5) connected in series to a photodiode array detector (PDA) (SPD-M20A) and to a mass spectrometer (MS) from Bruker Daltonics (Esquire 4000 model, Bremen, Germany) with an atmospheric pressure chemical ionization source (APCI) and an ion-trap analyser. The HPLC conditions were the same as described above. The MS parameters were set as follows: positive mode; source temperature, 400 °C; corona, 4000 nA; dry gas (N₂) 300 °C, 5 L/min flow, and 65 psi nebulizer; scan range from m/z 80 to 450. The MS spectra of the COP from the chicken samples were compared to the MS spectra of the COP standards at the correspondent retention time. The 25R-OH MS spectrum presented only the fragment with 385 u corresponding to elimination of 1 water molecule, and 7-keto presented the protonated molecule ($[M + H]^+$) at m/z 401 and the fragment corresponding to the loss of 1 water molecule (m/z 383). On the other hand, the MS spectra of both epoxides and the other hydroxycholesterols did not show the protonated molecule, and only the fragments at m/z 385 and 367, corresponding to the loss of 1 and 2 water molecules, were respectively detected. The MS spectra are in Figure 1 of the Supporting Information.

Moisture Content. Moisture content was determined according to AOAC method 950.46 (24).

Total Lipid Content. Total lipid content was determined according to the method of Folch et al. (25).

Statistical Analysis. The software Statistica for Windows 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, OK) was used to perform the regression analysis, and variance analysis (ANOVA) and to obtain the response surfaces in the experimental designs. COP contents were compared by Tuckey test (confidence level of 95 %). The second order polinomial equation expressed below was used to correlate the cholesterol content to the variables (w , KOH , H_2O , and n) and was adjusted to the experimental results (confidence level of 95 %).

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_i x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k b_{ij} x_i x_j$$

(i=1-3, j=1-3)

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of Saponification and Extraction Conditions. Two factorial screening designs 2^{7-3} (data not shown) were used to select the significantly different variables ($p < 0.10$) and to choose the best extraction solvent for the unsaponifiable matter. Hexane was chosen as the best extraction solvent due to fewer interference peaks and better repetability of the central points. The variables w , t , c , and s did not present significantly differences ($p > 0.10$) for both cholesterol and 25-OH, so, to optimize the analytical conditions, the variables t , c , and s were fixed in 20 h, 2 and 10 mL, respectively, according to the tendency pointed out by the effects on the screening design. Moreover, w was included in the dependent variables of the new central composite design due to the negative signal of its

effect, meaning that higher amounts of sample were related to lower contents of cholesterol and 25-OH, probably because of the interfering substances that were extracted together with the compounds of interest.

The optimization of the method was finally carried out using a central composite design 2^4 with eight axial points and four central points; the variables and the levels are presented in **Table 2**.

The variance analysis for the central composite design showed that the mathematical model, taking into consideration all the variables and interactions among them, had a good correlation coefficient for cholesterol and 25-OH ($r^2=82\%$ and 86% , respectively; $p < 0.05$), demonstrating that the model was predictable and valid. The regression coefficients of the mathematical model are shown in **Table 3**.

Table 2. Levels of Independent Variables Used in Central Rotational Design 2^4

variable	unit	-2	-1	0	+1	+2
<i>w</i>	g	0.5	0.75	1.00	1.25	1.50
KOH	%	10	15	20	25	30
H ₂ O	mL	5	10	15	20	25
<i>n</i>		2	3	4	5	6

Table 3. Regression Coefficients for the Predictive Mathematical Model of Cholesterol and 25-OH Contents^a

	Cholesterol	25-OH
mean	81.07*	25.74*
<i>w</i> (L)	0.01	0.37
<i>w</i> (Q)	-1.99*	-0.25
KOH (L)	0.25	3.35*
KOH (Q)	-4.32*	-1.81
H ₂ O (L)	1.34*	4.25*
H ₂ O (Q)	-2.52*	-1.76
<i>n</i> (L)	-0.21	6.52*
<i>n</i> (Q)	-2.12*	0.71
<i>w</i> x KOH	0.39	0.86
<i>w</i> x H ₂ O	-0.36	-0.45
<i>w</i> x <i>n</i>	0.37	-1.10
KOH x H ₂ O	-3.47*	0.50
KOH x <i>n</i>	-1.56*	0.40
H ₂ O x <i>n</i>	-0.32	0.68

^a * statistically significant ($p < 0.05$). L - linear, Q – quadratic.

The interactions between **KOH** and **H₂O** and between **KOH** and **n** were significant ($p < 0.05$) and negative for cholesterol. An analysis of the response surfaces for cholesterol (available in Figure 2 of the Supporting Information) clearly shows that the levels set at the central point are optimum for cholesterol extraction. No interactions between the evaluated factors were significant ($p > 0.05$) for 25-OH. The significant ($p < 0.05$) factors for 25-OH extraction were **KOH**, **H₂O** and **n** and they all positively influence 25-OH extraction.

The optimum level for each variable was defined from the analysis of the response surfaces obtained from the mathematical models for cholesterol and 25-OH and corresponded to the levels applied to the central points. The methodology was established as follows: direct cold saponification was performed using 1 g of ground sample and 10 mL of a 20% potassium hydroxide solution in 90% aqueous ethanol, in the dark, during 20 h in a shaker at 118 rpm. After the addition of 15 mL of water, the unsaponifiable matter was extracted four times with 10 mL of hexane. The hexane layers were then washed once with 5 mL of 0.5 N KOH aqueous solution and twice with distilled water. The water phase was discarded, and the hexane phase was filtered through anhydrous sodium sulfate and washed using 10 mL of hexane. The filtrate was dried under nitrogen flush, redissolved in 1 mL of mobile phase, filtered through 0.45 μ m Millipore membrane, and injected into the HPLC. The whole procedure was performed under nitrogen atmosphere.

To validate the experimental design, the procedure described above was carried out four times using the same sample, and the relative standard deviations were 1 and 6% for cholesterol and 25-OH, respectively, demonstrating good repeatability.

Validation of the Analytical Methodology. The calibration curves of cholesterol and COP were linear with correlation coefficients between 0.997 and 0.999 (available in Table 1 of the Supporting Information). Similar results were previously obtained using CN analytical column (20, 21). Recovery tests were conducted in two levels of standard addition, 50 and 100 µg of cholesterol/g of chicken, and 25 and 50 µg of COP/g of chicken. The method showed good recovery levels for all compounds (**Table 4**). Cholesterol presented recovery from 96 to 101%, whereas the COP presented recoveries from 84 to 103%. Detection limits were 0.06 µg/mL for cholesterol, from 0.01 to 0.04 µg/mL for COP detected by UV, and from 1.98 to 2.12 µg/mL for COP detected by RI (**Table 5**), expressing adequate sensitivity of the method used for cholesterol and COP analysis. As expected, UV detector was more sensitive than RI detector, showing a sensitivity about 100 times higher than RI detection. **Table 5** presents the limits of quantification defined as 5 times the limit of detection. No increase in any of the cholesterol oxides peaks was observed when only cholesterol was added, showing no artifact formation.

Table 4. Recovery of Cholesterol and Cholesterol Oxides in Grilled Chicken Breast ^a

compound ^b	level of addition (µg)	recovery (%)	RSD (%)
cholesterol	50	101	4
	100	96	4
20α-OH	25	89	4
	50	84	4
22R-OH	25	93	4
	50	90	2
24S-OH	25	87	4
	50	87	5
22S-OH	25	101	2
	50	97	5
25-OH	25	98	2
	50	91	4
α-EP	25	96	4
	50	100	2
β-EP	25	96	3
	50	98	4
25R-OH	25	99	4
	50	103	2
7-keto	25	84	3
	50	98	3
7β-OH	25	92	3
	50	102	2
7α-OH	25	87	1
	50	100	1

^a Means and relative standard deviations (RSD) of 10 analysis. ^b Compounds are presented according to elution order .

Table 5. Detection and Quantification Limits for Cholesterol and Cholesterol Oxides

compound ^a	detector	DL ^b (µg/mL)	QL ^c (µg/mL)
cholesterol	UV	0.06	0.32
20α-OH	UV	0.03	0.16
22R-OH	UV	0.03	0.14
24S-OH	UV	0.03	0.13
22S-OH	UV	0.04	0.20
25-OH	UV	0.03	0.17
α-EP	RI	2.12	10.62
β-EP	RI	1.98	9.88
25R-OH	UV	0.03	0.15
7-keto	UV	0.01	0.04
7β-OH	UV	0.02	0.09
7α-OH	UV	0.02	0.11

^a Compounds are listed according to elution order. ^b Detection limit ^c Quantification limit, QL = 5 x DL.

Incidence of COP and Alterations in Cholesterol Content in Chicken Breast Cooked under Different Conditions. The chicken breasts were submitted to different cooking processes and analysed for moisture, fat, cholesterol, and COP contents (**Table 6**). The presence of cholesterol oxides was confirmed by mass spectrometry.

Table 6. Cholesterol Oxides (Micrograms per gram), Cholesterol (Milligrams per 100g), Moisture (Grams per 100g), Fat (Grams per 100g) Contents and Cholesterol Oxidation (Percent) in Chicken Breast ^a

	raw (R)		roasted (RO)		deep fried (DF)		boiled in water (BO)		roasted in electric oven (ER)	
22R-OH	13.5 ^c	(5.1)	12.5 ^c	(0.3)	14.6 ^c	(3.9)	22.3 ^a	(4.3)	19.3 ^b	(1.4)
24S-OH	1.5 ^b	(0.7)	0.8 ^d	(1.3)	1.7 ^a	(0.6)	1.5 ^b	(0.7)	0.6 ^c	(1.8)
22S-OH	2.3 ^b	(1.0)	0.5 ^d	(0.2)	nd ^a		nd ^a		0.9 ^c	(5.8)
25-OH	nd ^a		nd ^a		nd ^a		4.4 ^b	(3.9)	nd ^a	
β-EP	nd		nd		nd		<9.8		nd	
7-keto	nd ^a		0.4 ^d	(0.5)	0.5 ^c	(2.2)	1.0 ^b	(2.0)	0.4 ^d	(7.1)
7β-OH	nd ^a		3.4 ^c	(6.2)	nd ^a		4.0 ^b	(4.0)	3.7 ^{bc}	(2.2)
7α-OH	nd ^a		9.5 ^c	(0.8)	nd ^a		6.4 ^d	(5.0)	11.2 ^b	(1.9)
total COP	17.3 ^e	(2.6)	27.1 ^c	(1.0)	16.8 ^d	(3.2)	39.6 ^a	(2.2)	36.1 ^b	(1.6)
cholesterol	54.7 ^d	(1.3)	81.2 ^b	(1.1)	98.5 ^a	(0.4)	78.34 ^c	(0.2)	88.4 ^b	(0.1)
moisture	76.3 ^a	(0.4)	61.8 ^c	(0.5)	54.9 ^d	(0.9)	68.4 ^b	(0.2)	67.4 ^b	(0.6)
fat	1.1 ^d	(3.5)	2.2 ^b	(3.9)	5.7 ^a	(2.9)	1.6 ^c	(2.2)	2.8 ^b	(1.2)
cholesterol oxidation ^b	3.2 ^c	(3.8)	3.3 ^c	(2.1)	1.7 ^d	(3.6)	5.2 ^a	(2.0)	4.1 ^b	(1.5)

^a Means and relative standard deviations (RSD, parentheses) of duplicate determinations of the same sample. ^b Cholesterol oxidation as total COP x 100/cholesterol content. Different letters in the same line mean that there are statistically significant differences ($p < 0.05$) among the samples. nd, not detected; for detection and quantification limits, see **Table 5**. The oxides 20α-OH, 25R-OH, and α-EP were not detected.

An increase in the cholesterol and fat contents (**Table 6**) was verified in all cooked chicken regardless of the used method, and this increase could be explained by the loss of water during the cooking procedure. The cholesterol

content in the analyzed raw and cooked samples are similar to that reported in the literature (10, 13, 15); however, lower cholesterol values, from 21.7 mg/100g to 55.7 mg/100g, were found in raw chicken meat (17).

This is the first time that the COP 22R-OH, 24S-OH, and 22S-OH were detected in chicken, although they have been previously verified in fish (21, 26-28). The oxides 22R-OH, 24S-OH, and 22S-OH were found in R. All of them are derived from the lateral chain oxidation of the cholesterol and apparently formed enzymatically, probably by the animal metabolism (6). From these, 22R-OH and 24S-OH were also present in all the cooked samples. 25-OH and β -EP were found just in BO, which was processed using the lowest temperature (90 °C). 22R-OH was the most abundant COP in all the chicken samples, corresponding to 53 to 87% of total COP.

The total COP content observed in this study was higher than other values reported in the literature for raw chicken (0.1-1.5 μ g/g) and for thermally processed chicken (maximum of 5 μ g/g) (10-17). Besides, disregarding the COP 22R-OH, 24S-OH, and 22S-OH, the total COP content for R and DF are in agreement with the literature values for chicken meat, although the total COP for RO, BO, and ER are still higher. A large number of different COP were analyzed in this research, so it was expected that a higher total COP would be found; these new COP (22R-OH, 24S-OH, and 22S-OH) could be also present in the samples reported in the literature, but they probably were not detected. The oxides 20 α -OH and α -EP, commonly present in foods, were not detected in any of the samples; also 25R-OH

was not detected. Baggio and Bragagnolo (18) analyzed seven types of chicken products and did not detect COP in any of the samples, probably due to the use of the antioxidant sodium erythorbate in the product formulations.

Considering the extent of cholesterol oxidation, the COP/cholesterol ratio presented values from 1.7 to 5.2%, which were similar or slightly higher than the values shown by some authors (17). On the other hand, Maraschiello et al. (10) found lower values for total COP/cholesterol ratio, varying from 0.003 to 0.10% for raw chicken and from 0.11 to 0.59% for cooked chicken. BO showed the greatest number of COP, the highest total COP content, and consequently the highest COP/cholesterol ratio. By contrast, DF chicken presented the lowest total COP content among the processed samples and also the lowest COP/cholesterol ratio among all analysed samples. The high temperature of deep frying process could cause thermodegradation of COP, possibly producing new compounds other than oxides, by combination with other molecules such as Maillard reaction products and proteins (29); moreover, a small amount of COP could have migrated from the meat to the frying oil (17).

In summary, the experimental design proved to be a useful tool for method development and optimization employing a small number of experiments. Optimization of saponification and extraction procedures resulted in a novel reliable method for simultaneous detection of cholesterol and COP in chicken meat with no artifact formation. The presence of a large number of COP in chicken breast could be easily confirmed by using HPLC-APCI-MS, leading to total COP contents higher than those previously found in the literature. The COP intake provided by

meat can be underestimated and more studies on this subject are necessary to estimate the real COP intake, as well as to investigate the toxicological role of these new COP found in human health.

LITERATURE CITED

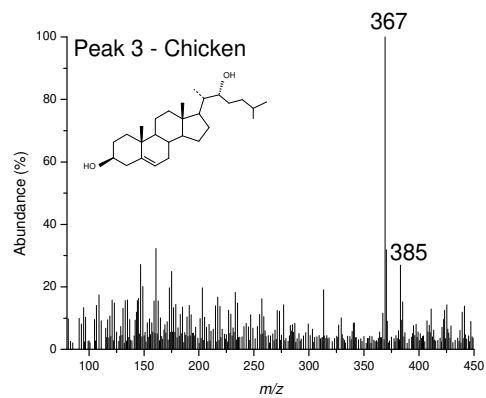
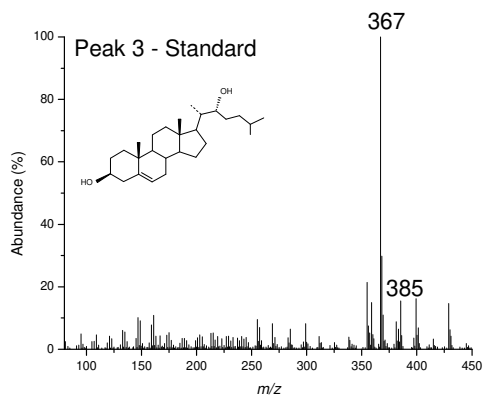
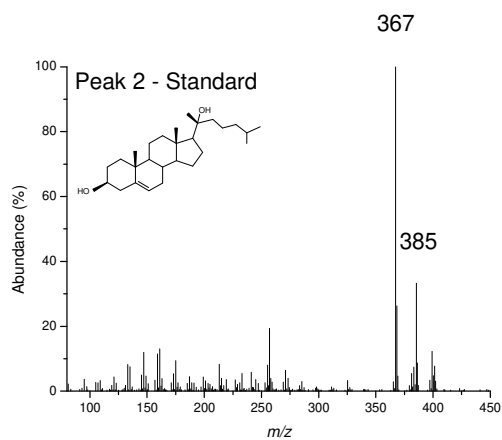
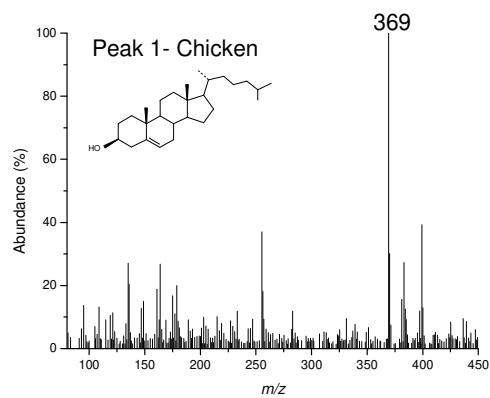
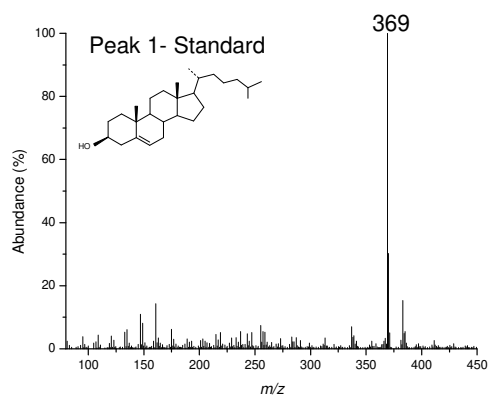
- (1) Bascoul, J.; Domergue, N.; Mourot, J.; Debry, G.; Crastes De Paulet, A. Intestinal absorption and fecal excretion of 5,6 α -epoxy-5 α -cholesta-3 β -ol by the male wistar rat. *Lipids* **1986**, *21*, 744-747.
- (2) Leonarduzzi, G.; Sottero, B.; Poli, G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 700-710.
- (3) Kumar, N.; Singhal, O. P. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *55*, 497-510.
- (4) 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*; Guardiola, F., Dutta, P. C., Codony, R., Savage, G. P., Eds.; AOCS Press: Champaign, IL, 2002; pp. 241-277.
- (5) Osada, K. Cholesterol oxidation products: other biological effects. In *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*; Guardiola, F., Dutta, P. C., Codony, R., Savage, G. P., Eds.; AOCS Press: Champaign, IL, 2002; pp. 278-318.
- (6) Schroepfer, G. J. Jr. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 361-554.

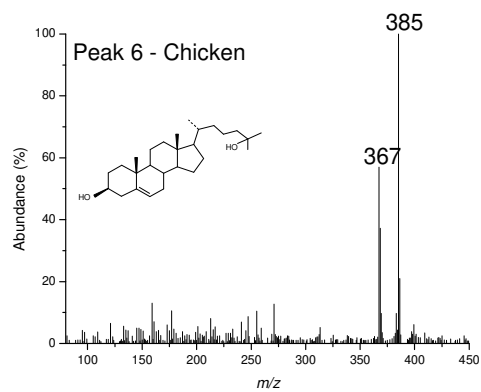
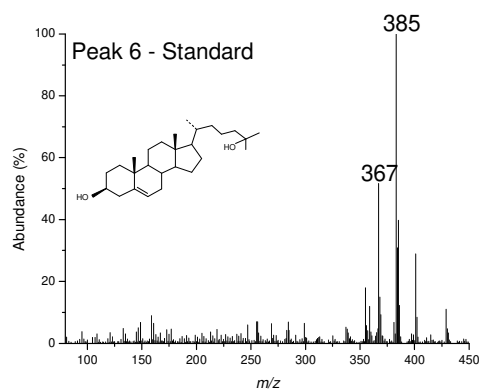
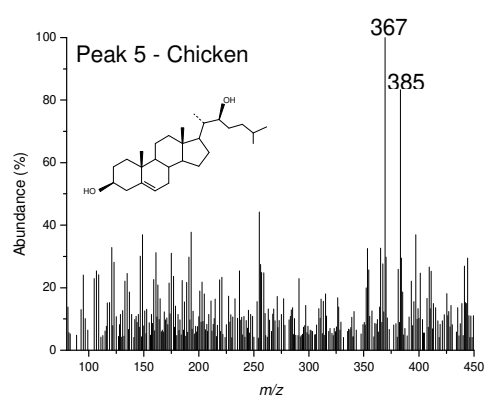
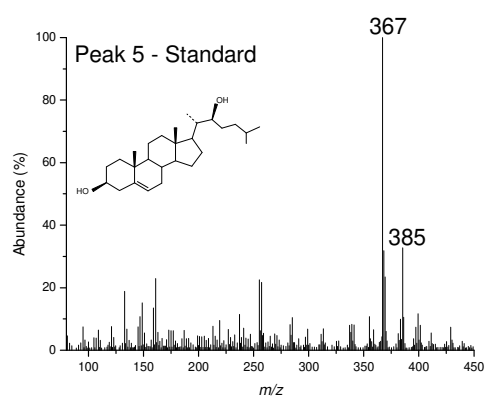
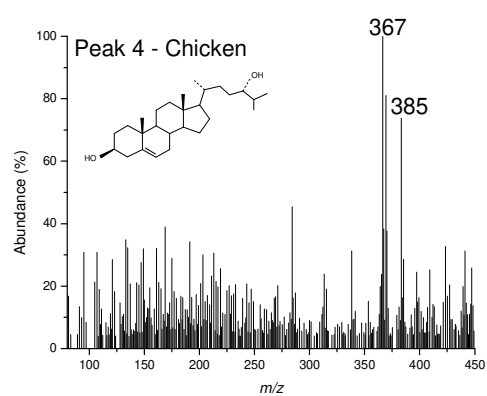
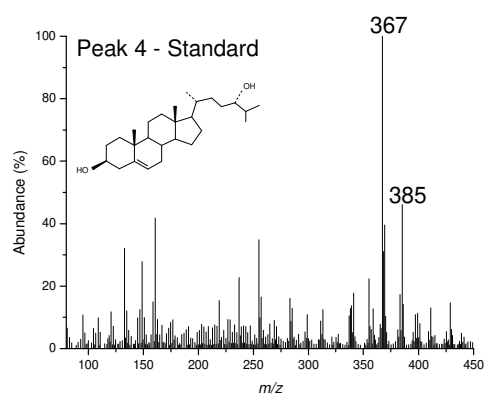
- (7) Smith, L. L. Cholesterol autoxidation: 1981-1986. *Chem. Phys. Lipids* **1987**, *44*, 87-125.
- (8) Smith, L. L. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. *Lipids* **1996**, *31*, 453-487.
- (9) Smith, L. L.; Johnson, B. H. Biological activities of oxysterols. *Free Rad. Biol. Med.* **1989**, *7*, 285-332.
- (10) Maraschiello, C.; Esteve, E.; Regueiro, J.; García, A. Cholesterol oxidation in meat from chickens fed α -tocopherol- and β -carotene supplemented diets with different unsaturation grades. *Lipids* **1998**, *33*, 705-713.
- (11) Grau, A.; Guardiola, F.; Grimpa, S.; Barroeta, A. C.; Codony, R. Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: influence of dietary fat and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poult. Sci.* **2001**, *80*, 1630-1642.
- (12) 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.* **2001**, *80*, 105-108.
- (13) 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.* **2003**, *51*, 5941-5945.
- (14) Conchillo, A.; Ansorena, D.; Astiasarán, I. Combined effect of cooking (grilling and roasting) and chilling storage (with and without air) on lipid and cholesterol oxidation in chicken breast. *J. Food Prot.* **2003**, *66*, 840-846.
- (15) Conchillo, A.; Ansorena, D.; Astiasarán, I. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 141-146.

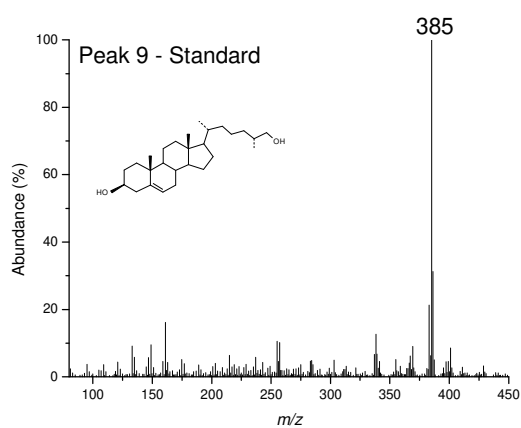
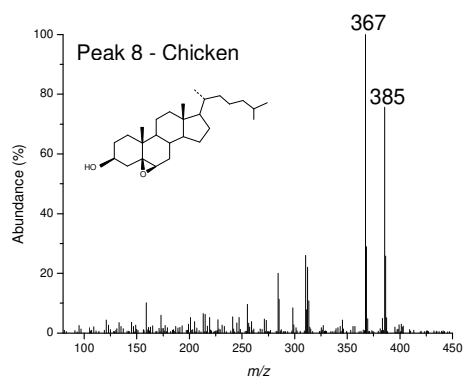
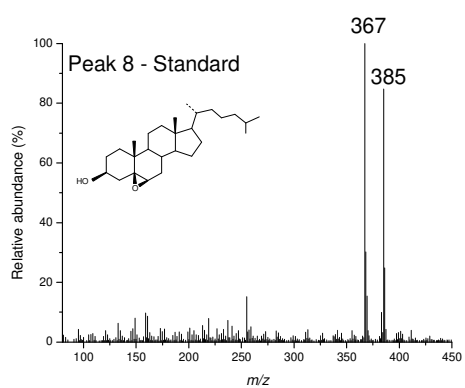
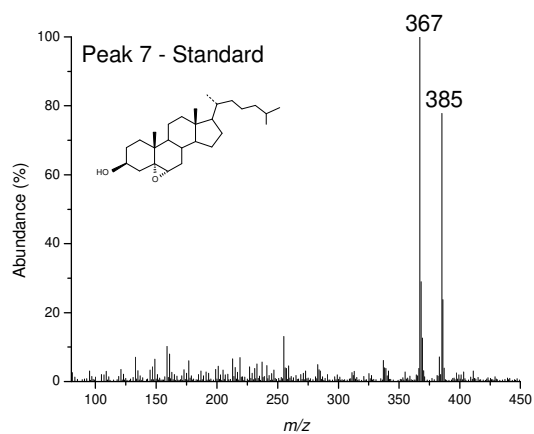
- (16) Eder, K.; Grünthal, G.; Kluge, H.; Hirche, F.; Spilke, J.; Brandsch, C. Concentrations of cholesterol oxidation products in raw, heat-processed and frozen-stored meat of broiler chickens fed diets differing in the type of fat and vitamin E concentrations. *Brit. J. Nutr.* **2005**, *93*, 633-643.
- (17) Bonoli, M.; Caboni, M. F.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Lercker, G. Effect of feeding fat sources on the quality and composition of lipids of precooked ready-to-eat fried chicken patties. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1327-1337.
- (18) Baggio, S. R.; Bragagnolo, N. Fatty acids, cholesterol oxides and cholesterol in Brazilian processed chicken products. *Italian J. Food Sci.* **2006**, *18*, 199-208.
- (19) Dionisi, F.; Golay, P. A.; Aeschlimann, J. M.; Dsiczfalusy, U. Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: methods comparison and validation. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2227-2233.
- (20) Mazalli, M. R.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Bragagnolo, N. HPLC method for quantification and characterization of cholesterol and its oxidation products in eggs. *Lipids* **2006**, *41*, 615-622.
- (21) 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.* **2006**, *54*, 4107-4113.
- (22) Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. Statistics for experiments: An introduction to designs, data analysis and model building. New York. Wiley, 1978.
- (23) Long, G. L.; Winefordner, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 712-724.

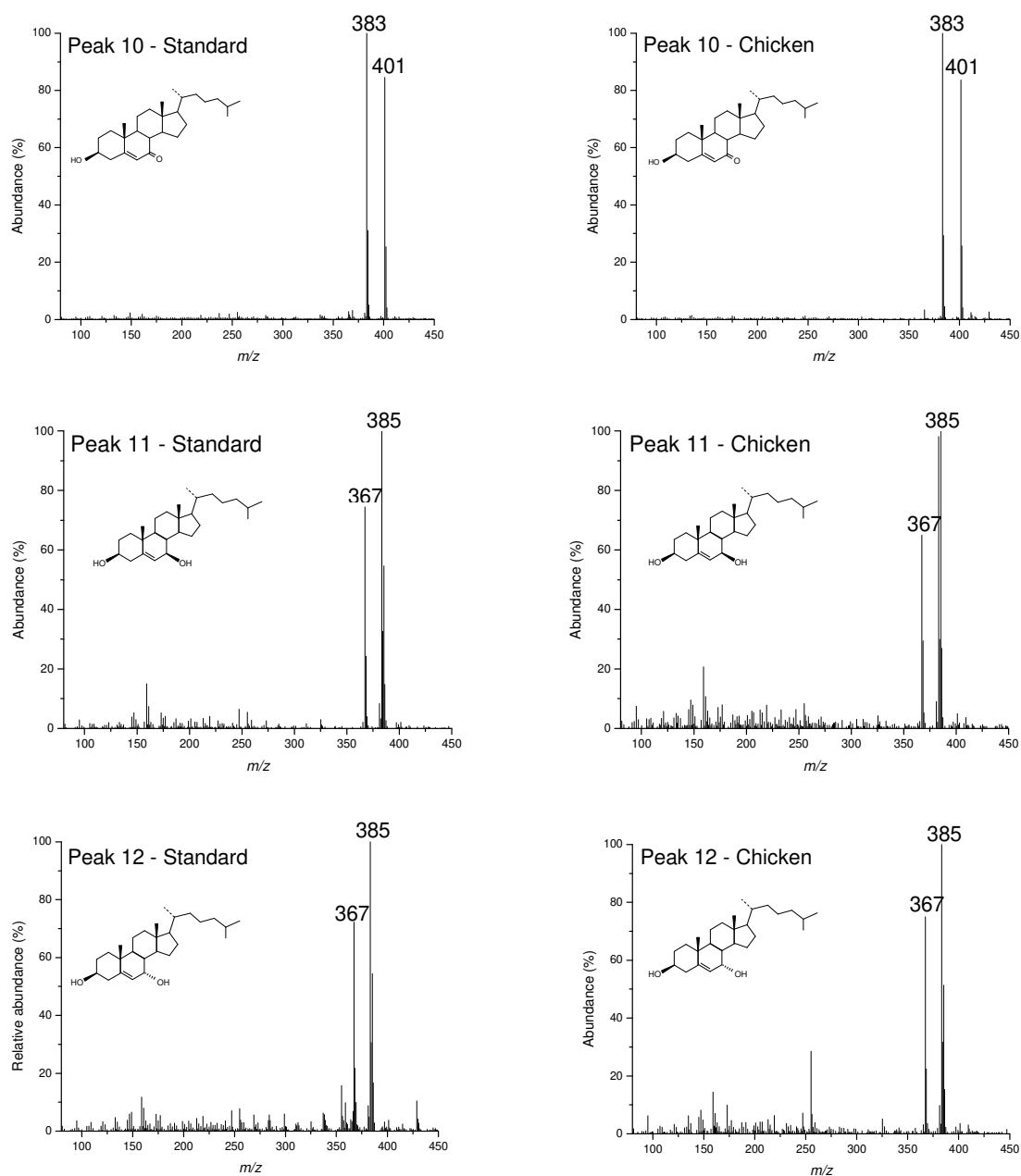
- (24) AOAC, Official Methods of Analysis, 17th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gouthersburg, MD, 2002.
- (25) Folch, J.; Lees, M.; Stanley, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497-509.
- (26) Saldanha, T.; Bragagnolo, N. Cholesterol oxidation is increased and PUFA decreased by frozen storage and grilling of Atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). *Lipids* **2007**, *42*, 777-778.
- (27) Saldanha, T.; Benassi, M. T.; Bragagnolo, N. Fatty acid contents evolution and cholesterol oxides formation in Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) as a result of frozen storage followed by grilling. *LWT - Food Sci. Technol.* **2007**, *41*, 1301-1309.
- (28) Saldanha, T.; Bragagnolo, N. Relation between types of packaging, frozen storage and grilling on cholesterol and fatty acids oxidation in Atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). *Food Chem.* **2008**, *106*, 619-627.
- (29) Rodriguez-Estrada, M. T.; Penazzi, G.; Caboni, M. F.; Bertacco, G.; Lercker, G. Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburgers. *Meat Sci.* **1997**, *45*, 365-375.

SUPPORTING INFORMATION

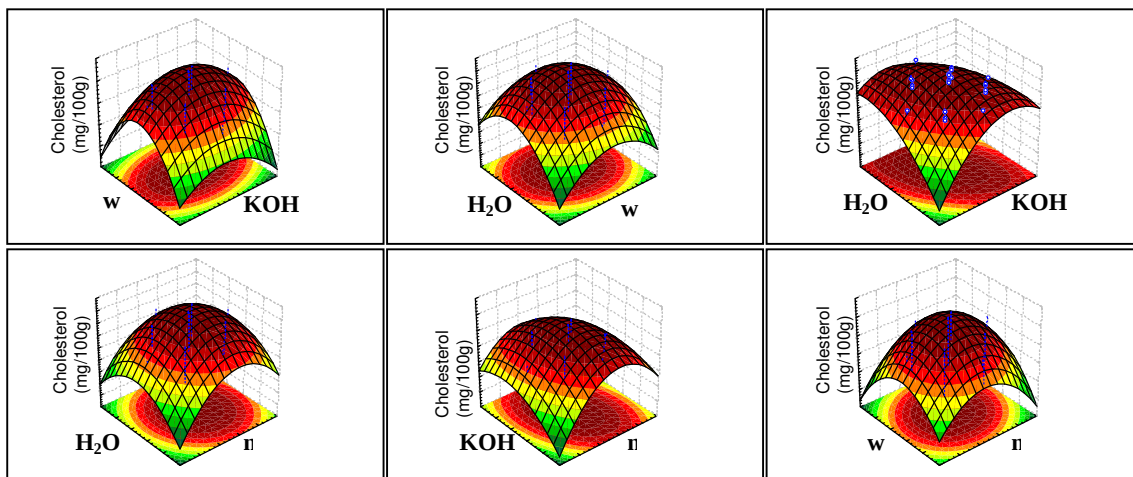








Supplemental Figure 1. MS spectra of cholesterol and cholesterol oxides standards and from chicken samples. Peak numbers correspond to those from Figures 1 and 2.



Supplemental Figure 2. Response surfaces obtained by the predictive model of the central rotational design 2^4 .

Supplemental Table 1. Calibration curves and correlation coefficients (r^2) for cholesterol and cholesterol oxides.

compounds ^a	detector ^b	calibration curve ^c	r^2 ^d
cholesterol	UV	$y = 3135800 x$	0.997
20 α -OH	UV	$y = 6482 x$	0.999
22R-OH	UV	$y = 7146 x$	0.999
24S-OH	UV	$y = 7579 x$	0.998
22S-OH	UV	$y = 4992 x$	0.999
25-OH	UV	$y = 5924 x$	0.999
α -EP	RI	$y = 252 x$	0.999
β -EP	RI	$y = 271 x$	0.998
25R-OH	UV	$y = 6846 x$	0.999
7K	UV	$y = 25967 x$	0.999
7 β -OH	UV	$y = 10959 x$	0.999
7 α -OH	UV	$y = 9193 x$	0.999

^a Peaks are presented according to elution order. ^b UV - ultra violet, RI - refractive index. ^c y is the peak area in the HPLC chromatogram, and x is the compound concentration in mg/mL for cholesterol and μ g/mL for COP. ^d Correlation coefficients are statistically significant ($p < 0.0001$).

CAPÍTULO 3

SOLID PHASE MICROEXTRACTION – GAS CHROMATOGRAPHY FOR THE EVALUATION OF SECONDARY LIPID OXIDATION PRODUCTS IN CHICKEN PATTIES DURING LONG-TERM STORAGE



SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA *JOURNAL OF THE BRAZILIAN
CHEMICAL SOCIETY*

Resumo

A formação de hexanal, pentanal e malonaldeído em hambúrgueres de frango cru e grelhado durante o armazenamento a -18 °C por 90 dias foi avaliada por microextração em fase sólida (SPME) utilizando fibras DVB/CAR/PDMS. As condições de extração foram otimizadas para obtenção de resultados reprodutíveis e evitar a saturação da fibra, mesmo para as amostras mais oxidadas. O desempenho de diferentes fibras DVB/CAR/PDMS foi verificado durante toda estocagem, sendo necessárias sete fibras para acompanhar o desenvolvimento da oxidação lipídica. O coeficiente de variação (CV) foi calculado para 60 determinações em duplicata e não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre os CV das fibras independentemente do número de vezes que foram usadas. Os hambúrgueres crus apresentaram correlações de Pearson significativas ($p < 0,05$) entre todos os parâmetros analisados, variando entre 0,93 e 0,99; entretanto, para os hambúrgueres grelhados, apenas a correlação de 0,98 entre hexanal e pentanal foi significativa.

Abstract

The formation of hexanal, pentanal and malonaldehyde from raw and grilled chicken patties during storage at -18°C for 90 days was evaluated by SPME using a DVB/CAR/PDMS fiber. The extraction conditions were optimized to provide reproducible results and avoided fiber saturation even for more oxidised samples. The performance of different DVB/CAR/PDMS fibers was verified during the entire storage period, and seven separate fibers were used to assay the extent of lipid oxidation. The relative standard deviation (RSD) was calculated for 60 duplicate analysis and no differences were observed ($p > 0.05$) among the fibers RSD despite the number of times they were used. The relationship between the different parameters were also established and compared to the results obtained by the traditional TBARS test. Raw patties showed significant ($p < 0.05$) Pearson's correlations between all parameters, varying from 0.93 to 0.99; however, grilled patties presented a correlation of 0.98 only between hexanal and pentanal.

Introduction

Solid phase microextraction (SPME) is a solvent free sampling technique introduced in the 1990s by Arthur and Pawliszyn¹ and has successfully been used in the determination of volatile profile of foodstuffs²⁻⁶ and also to follow the extent of lipid oxidation by the measure of secondary products, mainly in meat and meat products.⁷⁻¹² Although there are some limitations of interfiber comparisons, SPME technique was successfully applied for extended time-course experiments for monitoring volatile compounds in olive oil.¹³

The autoxidation process in food is a complex phenomenon induced by oxygen in the presence of initiators such as heat, free radicals, light, photosensitizing pigments and metal ions, which generates hydroperoxides and volatile compounds, generally through a process consisting of three phases: initiation, propagation and termination. During the initiation phase, the unsaturated fatty acids suffer a homolytic breakdown of the hydrogen-carbon bond in α position relative to the double bond, resulting in the formation of highly unstable free radicals that stabilize by abstracting an hydrogen from another chemical specie. In the presence of oxygen, the free radicals react quickly with the triplet oxygen ($^3\text{O}_2$) generating other radical species, such as the peroxyradicals. The propagation phase comprises the continuation and acceleration of this chain reaction, increasing the formation of hydroperoxides. The termination phase is characterized by the reaction between free radicals generating stable nonradical species, and the

transformation of hydroperoxides into secondary nonradical oxidation compounds, such as hydrocarbons, aldehydes, alcohols and ketones.

The decomposition of lipid hydroperoxides is associated to the formation of a large variety of aldehydes that are responsible for off-flavors development in food. The most abundant aldehydes formed are 4-hydroxynonenal, hexanal, pentanal, propanal and malonaldehyde. Hexanal is mainly generated as a consequence of the oxidative decomposition of polyunsaturated fatty acids (PUFA), and has been used as an indicator of oxidative stability and flavor acceptability and also to follow lipid oxidation in food systems.^{7-12,14} Malonaldehyde, a three carbon dialdehyde with carbonyl groups at the C1 and C3 positions, is a minor product of PUFA autoxidation derived from hydroperoxides formed from PUFA with three or more double bonds. In this sense, chicken meat is highly susceptible to lipid oxidation as it has a high proportion of unsaturated fatty acids.

The aim of the present study was to optimize the conditions for the extraction of hexanal, pentanal and malonaldehyde from chicken meat using SPME technique as a semi quantitative method to follow the development of lipid oxidation during a long term storage. The relationship between the different parameters were also established and compared to the results obtained by the traditional TBARS test.

Experimental

Chemicals and Reagents

Hexanal (99%) and 2-heptanone (99%) were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); pentanal (97%), from Fluka (Steinheim, Germany), and 1,1,3,3-

tetraethoxypropane (TEP, for synthesis), from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents were analytical grade.

Preparation of Chicken Patties

Twenty five 4-week old chickens (Cobb) were slaughtered and the breasts were minced in a food processor after the removal of the skin, bones and apparent fat and connective tissues. Thirty patties (60 ± 1 g) were molded, and half of them was grilled at 170 °C for 4 min each side, until core temperature reached 70 °C. The internal temperature was monitored using a digital calibrated thermometer (Traceable Long-Stem, VWR, Friendswood, TX, USA). Raw and grilled patties were packed in polyethylene bags permeable to oxygen and stored in the dark at -18 °C for 90 days.

Optimization of Secondary Lipid Oxidation Volatiles Extraction by SPME

The optimization of the volatiles derived from lipid oxidation was carried out in a 7 ml flask and using a divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30 μm SPME fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Different parameters were tested to optimize the method: weight of the sample (0.5, 1 e 2 g), water addition (0, 3 e 6 ml), addition of butylated hydroxyanisole (BHA) (0, 5 e 10 mg), time of fiber exposure in the headspace, and temperature of extraction (60 °C and 80 °C). Before analysis, the fibers were preconditioned in the GC injection port as indicated by the manufacturer.

GC Analysis

After the extraction of the volatiles in the headspace, the fiber was removed from the vial and inserted directly into the injection port at 250 °C of a Shimadzu gas chromatograph (GC 2010, Kyoto, Japan), equipped with a flame ionization detector at 280 °C. The sampling time was 1 min, although the fiber was kept in the injection port during all the running time. The injection port was in the splitless mode. The column (DB-WAX, 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm, J&W, Folsom, CA, USA) temperature varied from 40 °C to 180 °C at 4 °C min⁻¹, remaining at 180 °C for 2 min.¹² The flow control mode was linear velocity set at 47.3 cm sec⁻¹, with carrier gas H₂, make up gas N₂ at 30 mL min⁻¹ and air flow at 400 mL min⁻¹. A narrow-bore glass liner of 0.75 mm i.d. (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was used in substitution of common liners to improve peaks resolution. Identification was done by comparison of the retention time of the peaks of interest compared to the retention time of authentic standards and co-chromatography. Quantification was done using 2-heptanone as internal standard. Blank samples were regularly made to check possible carryover and the described desorption conditions ensure total desorption from fiber. The reported values are means of duplicate measurements.

Analysis of thiobarbituric acid reactive substances

The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined in 5.00±0.05 g samples of homogenized meat according to the method of Vyncke^{15,16} with some modifications.¹⁷ TBARS were expressed in µg of malonaldehyde equivalent per kg of dry meat using a standard curve (concentration range from

0.10 to 8.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $y=0.0826x+0.0068$, $R^2=0.9999$) established using 1,1,3,3-tetraethoxypropane. The reported values are means of duplicate measurements.

Moisture Content

Moisture content was determined according to AOAC method 950.46.¹⁸

Statistical Analysis

The software Statistica for Windows 5.5 (StatSoft Inc., OK, USA) was used to calculate the Pearson's correlation coefficients between the secondary oxidation products. The RSD means were compared by Tuckey's test (confidence level of 95 %).

Results and Discussion

Optimization of SPME Conditions

The formation of hexanal, pentanal and malonaldehyde from chicken meat oxidation was evaluated using a DVB/CAR/PDMS fiber. The DVB/CAR/PDMS fiber is made of a layer of PDMS-CAR, where small molecules with high diffusion coefficients are adsorbed onto the Carboxen, and is also covered by a second layer of PDMS-DVB, where the heavier molecules are retained in the outer of the DVB layer.¹⁹ This fiber has been previously shown more affinity to aldehyde compounds than CAR/PDMS fiber which was better to evaluate ester compounds.² DVB/CAR/PDMS fiber was also used for hexanal determination in frankfurters⁸ and pressurized chicken;¹² while CAR/PDMS fiber was used for hexanal determination

in pressurized chicken,⁷ PDMS/DVB fiber was used for hexanal and pentanal determination in cooked turkey,⁹ and PDMS fiber was used for hexanal determination in freeze dried chicken myofibrils¹⁰ and minced pork.¹¹

The addition of water, 3 mL or 6 mL, and the use of magnetic stirring to improve volatile extraction led to an increase in the number of peaks in the GC chromatogram, showing the release of diverse volatile compounds in high amounts, and interfering in the quantification of the aldehydes of interest in the present study. Besides, when any concentration of the internal standard (2-heptanone) and water were added to the sample, the fiber was saturated by the 2-heptanone. In this case, the GC chromatogram presented a huge peak at 7.08 min, 2-heptanone retention time, and the peaks of malonaldehyde, pentanal and hexanal remained always with the same area despite of the degree of oxidation of the meat. The 2-heptanone was easily transferred to the headspace from the water once it was free in the matrix. To overcome this problem, no water was added to the sample and no agitation was performed. The addition of 10 μ L of the internal standard solution was done directly to the meat in the vial, and after the vial was closed, the mixture was homogenized by shaking.

Similarly, when temperature was risen from 60 °C to 80 °C, the volatile extraction was also increased and the appearance of new peaks in the GC chromatogram had impaired the quantification of malonaldehyde, pentanal and hexanal. Moreover, when fiber exposure time exceed 30 min at 80 °C, fiber saturation occurred.

The use of BHA as antioxidant did not show any effect on the release of secondary products of the lipid oxidation regardless of extraction temperature, time of fiber exposure in the headspace or water addition.

For each analysis, the SPME fiber was introduced into the vial headspace and held for different time periods to determine the effect of duration of sampling on pentanal, hexanal and malonaldehyde uptake at 60 °C (**Figure 1**). A competition between water vapour and hydrophobic oxidation products for active sites on the fiber may occur and this may take time to reach equilibrium.²⁰

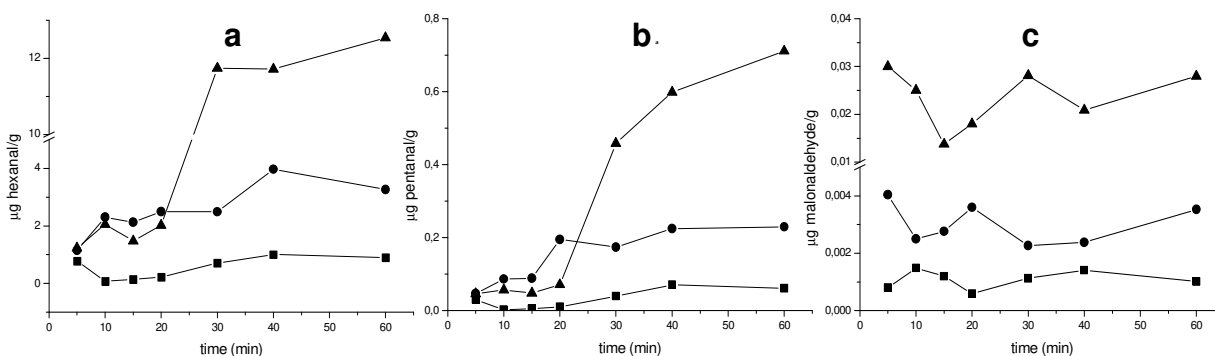


Figure 1. Effect of sample weight and sampling time on (a) hexanal, (b) pentanal and (c) malonaldehyde uptake by DVB/CAR/PDMS SPME fibers at 60 °C from the headspace of chicken meat: (-■-) 0.5 g, (-●-) 1 g, (-▲-) 2 g.

Finally, the optimised extraction procedure was defined: two grams of sample were weighted into a 7 mL vial, added of 10 µL of internal standard (2-heptanone, 81.3 µg mL⁻¹) and the vial was sealed with a teflon septum secured by an aluminium cap and gently shaken for homogenization. The SPME fiber was

introduced through the septum into the headspace and the vial was heated in a water bath at 60 °C for 10 min. After extraction, the fiber was immediately injected at the GC to avoid contamination. These conditions provided reproducible results and avoided fiber saturation even for more oxidised samples. **Figure 2** shows a typical chromatogram of the volatile aldehydes extracted by SPME from a chicken sample.

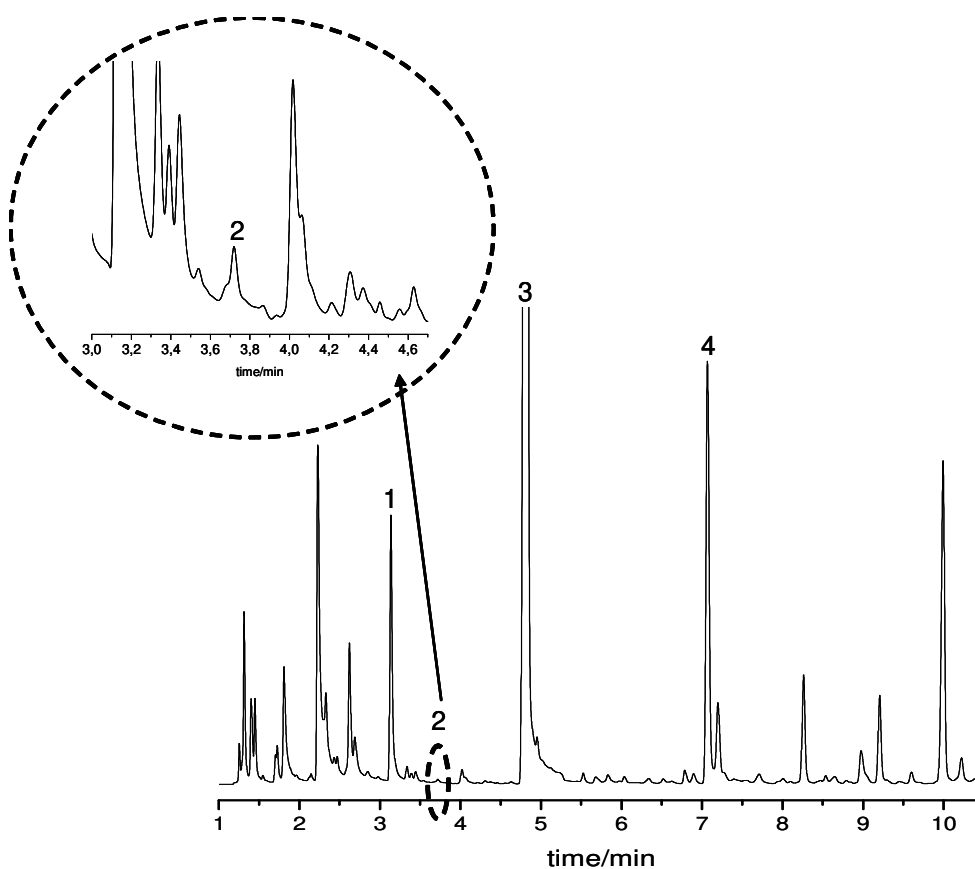


Figure 2. GC-FID chromatogram of the volatile aldehydes extracted from a chicken sample. Peaks: 1=pentanal, 2=malonaldehyde, 3=hexanal and 4=2-heptanone.

The SPME technique presents some limitations. Usually, there is good reproducibility when using a single fiber on routine analysis, whereas reproducibility is poor when using different fibers, especially from different batches.²¹ The use of different fibers in a study can affect the results, and most comparative studies are performed using a single fiber.^{22,23}

For these reasons, after establishing the extraction conditions, the performance of different DVB/CAR/PDMS fibers was also verified. The course of lipid oxidation was followed in raw and grilled chicken patties stored at -18 °C during 90 days using the developed method for malonaldehyde, pentanal and hexanal determinations. During the entire storage period, seven different fibers were necessary to assay the extent of lipid oxidation, and a single fiber was used 21.7 times, in average, and 30 times maximum. The relative standard deviation (RSD) was calculated for 60 duplicate analysis, totaling 120 determinations (**Table 1**), each duplicate analysis was performed using the same fiber. No differences were observed ($p>0.05$) among the RSD of the fibers despite the number of times they were used. In general, malonaldehyde showed the highest RSD (12.5 %, in average), while pentanal and hexanal presented lower RSD values (9.6 % and 8.9 %, in average). The distribution of the RSD according to the use was plotted for the four fibers that were used 30 times each (**Figure 3**) and, with a few exceptions, the RSD values are below 20 % which is acceptable for SPME semi-quantitative analysis. However, it is important to note that single fibers could respond differently for the same analysis; for example, fiber D (**Figure 3**) did not present any RSD above 20 % for any of the three analysed aldehydes, while the other fibers

presented at least one RSD above 20 % for one determination. Variations due to samples were minimized once new or aged fibers were used randomly to determine the oxidative status in fresh and oxidised samples. Kalua et al.¹³ has also successfully used a SPME-GC method to monitor volatile compounds in olive oil stored in the light for 12 months using three separate fibers.

Table 1. Performance of DVB/CAR/PDMS fibers ^a during a 90 days storage experiment

Times of use	n ^b	RSD (%)		
		hexanal	pentanal	malonaldehyde
1 - 5	10	7.9	13.1	12.6
6 - 10	11	8.3	7.9	11.7
11 - 15	10	13.5	11.5	14.5
16 - 20	11	7.3	6.1	13.4
21 - 25	10	7.9	9.3	9.8
26 - 30	8	8.7	9.8	13.3
average use	60	8.9	9.6	12.5

^a data is referent to 7 single fibers. ^b number of duplicate samples analysed

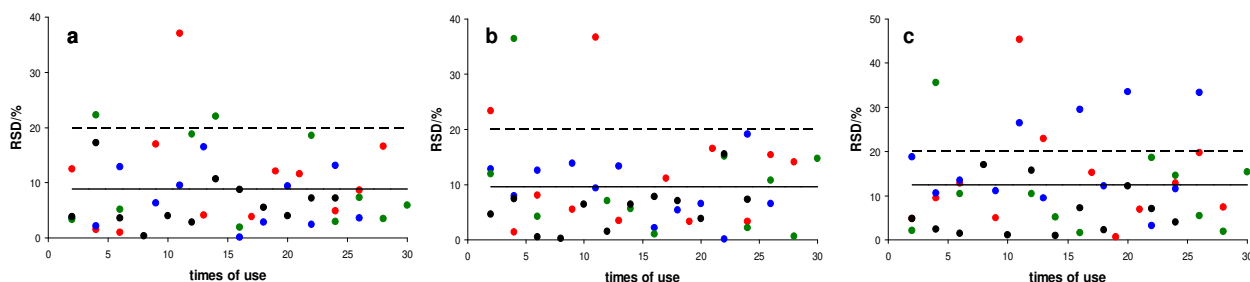


Figure 3. Relative standard deviations (RSD) of duplicate measurements using four different fibers, for (a) hexanal, (b) pentanal and (c) malonaldehyde determinations in chicken meat: fiber A (red), fiber B (blue), fiber C (green), and fiber D (black).

Formation of Secondary Lipid Oxidation Products in Chicken Meat During Storage

Raw and grilled chicken patties were analysed for secondary lipid oxidation products formation by SPME and TBARS test during storage at -18 °C for 90 days (Figure 4). The TBARS test is a method based on the spectrophotometric determination of malonaldehyde commonly used for assessing lipid oxidation in foods. Although the TBARS reaction is not specific for malonaldehyde because TBA reacts with many different carbonyl compounds formed during lipid oxidation, TBARS test can be used to assess the extent of lipid oxidation in general, rather than to quantify malonaldehyde.^{7-9,11,14,24}

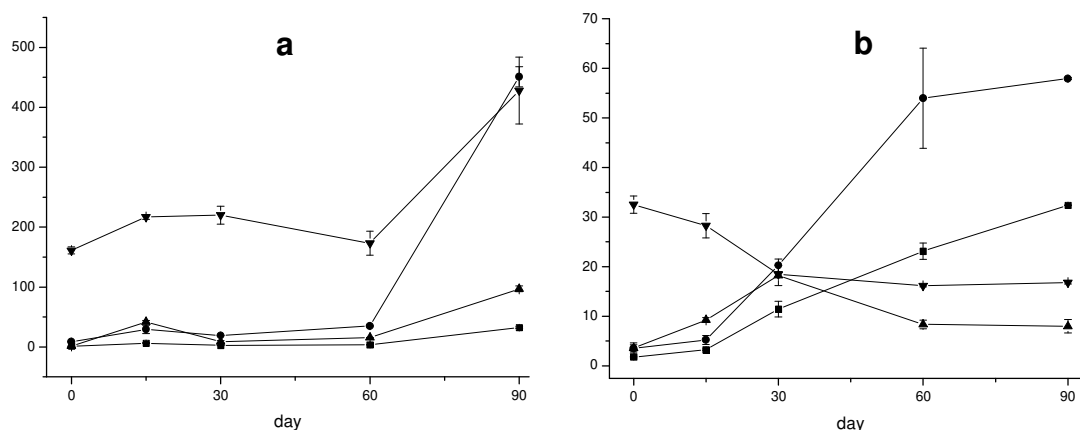


Figure 4. Formation of secondary lipid oxidation products in chicken meat during storage at -18°C for 90 days in the dark: (a) -■- pentanal ($\mu\text{g kg}^{-1}$ of dry meat), -●- hexanal ($\mu\text{g kg}^{-1}$ of dry meat), -▲- malonaldehyde ($\mu\text{g kg}^{-1}$ of dry meat), and -▼- TBARS ($\mu\text{g malonaldehyde equivalent kg}^{-1}$ of dry meat) in raw chicken; and (b) -■- pentanal ($10^{-1} \mu\text{g kg}^{-1}$ of dry meat), -●- hexanal ($10^{-2} \mu\text{g kg}^{-1}$ of dry meat), -▲- malonaldehyde ($\mu\text{g kg}^{-1}$ of dry meat), and -▼- TBARS ($10^{-1} \mu\text{g of malonaldehyde equivalent kg}^{-1}$ of dry meat) in grilled chicken. Means values $\pm$ standard deviation of two samples.

Raw patties showed an increase in all analysed aldehydes after 60 days of storage, especially for TBARS and hexanal, resulting in significant ($p<0.05$) correlations between all parameters, varying from 0.93 and 0.99 (**Table 2**). The slow rate of lipid oxidation in raw samples was mainly due to mechanical processing, which disrupted the muscle membrane structure, and resulted in exposure of labile phospholipids to oxygen, enzymes, heme pigments, and metal ions.

Table 2. Pearson correlation coefficients for the lipid oxidation analysis of raw and grilled chicken during storage at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 90days

Correlation	Raw chicken	Grilled chicken
Pentanal vs hexanal	0.99*	0.98*
Pentanal vs malonaldehyde	0.97*	0.05
Pentanal vs TBARS	0.98*	-0.43
Hexanal vs malonaldehyde	0.93*	0.02
Hexanal vs TBARS	0.97*	-0.53
Malonaldehyde vs TBARS	0.95*	-0.64

*Correlation coefficients were statistically significant ($p<0.05$)

The grilled patties presented distinct behaviours for the different aldehydes measured. TBARS decreased from day 0 to day 60 and after that remained stable. Malonaldehyde presented a peak value at day 30, and then decreased, while hexanal and pentanal were still increasing at day 90. Besides the mechanical processing, the grilled samples suffered thermal treatment, what accelerated the development of lipid oxidation. TBARS and malonaldehyde did not show significant correlation between each other nor hexanal nor pentanal. TBARS and malonaldehyde were formed in low contents and the decrease in their contents suggested the occurrence of degradation or reaction with other compounds, such as proteins. On the other hand, a significant ($p < 0.05$) correlation of 0.98 (**Table 2**) was verified between hexanal and pentanal, both compounds are known to be markers of the termination phase of lipid oxidation.

The occurrence of correlations between TBARS and volatile aldehydes measured by SPME in meat products was found by other authors and summarized in **Table 3**. The comparison among the results is very difficult since the reported correlations are referred to different meat products during chill storage, at temperatures around 4 °C,⁸⁻¹² and these conditions were obviously prone to accelerate the rate of lipid oxidation more than the conditions applied in the present study. These methods are widely used as indicators of lipid oxidation and the pattern of hexanal and pentanal level was previously found to be more sensitive compared to TBARS for monitor lipid oxidation in poultry.^{13,14}

Table 3. Correlation coefficients between hexanal and pentanal determined by SPME and TBARS found in literature

Determination	Correlation	Significance	Product	Storage conditions
hexanal vs TBARS ⁸	0.55	p<0.01	raw frankfurters	4 °C for 60 days
hexanal vs TBARS ⁹	0.99	*	whole pieces of cooked turkey	4 °C for 6 days
pentanal vs TBARS ⁹	0.98	*	whole pieces of cooked turkey	4 °C for 6 days
hexanal vs TBARS ¹⁰	0.94	p<0.05	freeze dried chicken myofibrils	50 °C for 50 h
hexanal vs TBARS ¹¹	0.98	*	pre-cooked minced pork	4 °C for 4 days
hexanal vs TBARS ¹²	0.93	*	cooked pressurized chicken	5 °C for 8 days

* not available in the reference

Conclusions

The optimized assay is simple and do not require any solvent for extraction of the volatile aldehydes. The SPME technique was successfully applied in a long course storage experiment for monitoring lipid oxidation in chicken meat using separate single DVB-CAR-PDMS fibers.

References

1. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145.
2. Marco, A.; Navarro, J. L.; Flores, M.; *Food Chem.* **2004**, 84, 633.

3. Elmore, J. S.; Mottram, D. S.; Hierro, E.; *J. Chromatogr., A.* **2001**, *905*, 233.
4. Vichi, S; Castellote, A. I.; Pizzale, L.; Conte, L. S.; Buxaderas, S.; Lopez-Tamames, E.; *J. Chromatogr., A.* **2003**, *983*, 19.
5. Brunton, N. P.; Cronin, D. A.; Monahan, F. J.; *Flavour Fragr. J.* **2001**, *16*, 294.
6. Estevez, M.; Ventanas, S.; Ramirez, R.; Cava, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5168.
7. Beltran, E.; Pla, R.; Yuste, J.; Mor-Mur, M.; *Meat Sci.* **2003**, *64*, 19.
8. Estevez, M.; Ventanas, S.; Cava, R.; *Food Chem.* **2007**, *100*, 55.
9. Brunton, N. P.; Cronin, D. A.; Monahan, F. J.; Durcan, R.; *Food Chem.* **2000**, *68*, 339.
10. Goodridge, C. F.; Beaudry, R. M.; Pestka, J. J.; Smith, D. M.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4185.
11. Nielsen, J. H.; Sorensen, B.; Skibsted, L. H.; Bertelsen, G.; *Meat Sci.* **1997**, *46*, 191.
12. Wiggers, S. B.; Kroger-Olsen, M. V.; Skibsted, L. H.; *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 167.
13. Kalua, C. M.; Bedgood, D. R.; Prenzler, P. D.; *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *556*, 407.
14. Bragagnolo, N.; Danielsen, B.; Skibsted, L. H.; *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *221*, 610.
15. Vyncke, W.; *Fette Seifen. Anstrichm.* **1970**, *72*, 1084.
16. Vyncke, W.; *Fette Seifen. Anstrichm.* **1975**, *77*, 239.

17. Sørensen, G.; Jørgensen, S. S.; *Z. Lebensm. Unter Forsch.* **1996**, *202*, 205.
18. AOAC Official Methods of Analysis, 17th edn. Association of Official Analytical Chemists. Gouthersburg, **2002**.
19. Pillonel, L.; Bossett, J. O.; Tabacchi, R.; *LWT-Food Sci. Technol.* **2002**, *35*, 1.
20. Beltran, G.; Aguilera, M. P.; Gordon, M. H.; *Food Chem.* **2005**, *92*, 401.
21. Martos, P. A.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 206.
22. Grote, C.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 587.
23. Fabre, M.; Aubry, V.; Guichard, E.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1497.
24. Mariutti, L. R. B.; Orlie, V.; Bragagnolo, N.; Skibsted, L. H.; *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 337.

CAPÍTULO 4

AÇÃO DA SÁLVIA E DO ALHO NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNE DE FRANGO DURANTE O TRATAMENTO TÉRMICO E ARMAZENAMENTO



EM PREPARAÇÃO PARA SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO NA REVISTA

MEAT SCIENCE

Resumo

O uso de sálvia e de alho desidratados como antioxidantes naturais foi avaliado em carne de peito de frango, através da análise dos compostos secundários da oxidação lipídica (TBARS, malonaldeído, hexanal e pentanal), de colesterol e óxidos de colesterol, das alterações na composição de ácidos graxos e do grau de degradação da vitamina E. Os fatores pró-oxidantes utilizados foram a adição de sal, o tratamento térmico e o armazenamento a -18°C por 90 dias. A sálvia mostrou-se um agente eficaz no controle da oxidação dos lipídios e do colesterol durante o processamento térmico e o armazenamento a -18°C, sendo capaz de contrapor parcialmente os efeitos pró-oxidantes do sal. Por outro lado, o alho apresentou um comportamento variável de acordo com a metodologia analítica utilizada, sugerindo que este não tem efeito como antioxidante, podendo até mesmo acelerar a oxidação lipídica do peito de frango durante o armazenamento a -18°C.

1. Introdução

O consumo de alimentos processados e congelados aumentou muito nos últimos anos devido às necessidades impostas pela vida moderna, onde o tempo de preparo doméstico dos alimentos é um fator limitante. A temperatura e o tempo necessários para a cocção dos alimentos, além das condições de transporte e de armazenamento, são alguns dos fatores que podem contribuir para alterações químicas relacionadas à oxidação lipídica, causando não apenas perdas nutricionais e de qualidade, como o desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis e a descoloração que podem tornar o produto final inaceitável pelo consumidor, mas também gerando compostos indesejáveis e até mesmo potencialmente prejudiciais à saúde humana. Atualmente, a tendência pela procura cada vez maior de produtos naturais pelos consumidores, gerada pela crescente preocupação com a saúde, torna necessário o estudo do uso de condimentos e ervas aromáticas como antioxidantes naturais em substituição aos convencionais antioxidantes sintéticos amplamente utilizados como BHA e BHT.

O cloreto de sódio é comumente utilizado em carnes, aves e seus derivados devido a suas propriedades tecnológicas, organolépticas e antimicrobianas, porém, é conhecido também como um importante pró-oxidante, provavelmente, devido à contaminação do próprio sal por microelementos como o cobre e o ferro, que promoveriam o aumento da taxa de reações de radicais livres (Barbut, Josephson, & Maurer, 1985; El-Alim, Lugasi, Hóvári, & Dworschák, 1999), ou pela liberação de íons ferro ligados a proteínas (Kanner, Harel, & Jaffe, 1991). O efeito catalítico do

sal na oxidação de lipídios foi observado em vários produtos cárneos, sendo verificado através do aumento significativo das concentrações de TBARS (Barbut et al., 1985; Stoick, Gray, Booren, & Buckley, 1991; Lai, Gray, Smith, Booren, Crackel, & Buckley, 1991; El-Alim et al., 1999; Beltran, Pla, Yuste, & Mor-Mur, 2003; Bragagnolo, Danielsen, & Skibsted, 2005).

Os métodos de cocção podem catalisar significativamente o desenvolvimento da oxidação lipídica na carne de frango, aumentando o conteúdo total dos óxidos de colesterol (Grau, Guardiola, Grimpa, Barroeta, & Codony, 2001; Lee, Kang, Ahn, & Lee, 2001; Echarte, Ansorena, & Astiasarán, 2003; Conchillo, Ansorena, & Astiasarán, 2003; Mariutti, Nogueira, & Bragagnolo, 2008), além de modificarem o valor nutricional dos alimentos em relação ao produto original, através da alteração da composição de ácidos graxos (Echarte et al., 2003) e da formação de produtos secundários de oxidação, como as substâncias reativas com o ácido tio-barbitúrico e os aldeídos voláteis, malonaldeído, hexanal e pentanal (Barbut et al., 1985; Stoick et al., 1991; Lai et al., 1991; El-Alim et al., 1999; Beltran et al., 2003; Nissen, Byrne, Bertelsen, & Skibsted, 2004; Bragagnolo et al., 2005; Mariutti, Orlie, Bragagnolo, & Skibsted, 2008).

A presença de vitamina E em tecidos animais exerce influência na estabilidade dos lipídios na carne durante o armazenamento, sendo capaz de agir como um antioxidante, neutralizando os radicais livres e protegendo os fosfolipídios e o colesterol da oxidação (Gray, Goma, & Buckley, 1996). O efeito de antioxidantes naturais como o alecrim e *dittany* sobre a degradação de vitamina E durante o armazenamento refrigerado foi estudado em almôndegas de frango pré-cozidas

em embalagens permeáveis ao oxigênio, sendo ambos considerados protetores da vitamina E, por um mecanismo sugerido de regeneração do α -tocoferol pelos polifenóis dos condimentos (Racan Ricci, Danielsen, Menten, Reginato-d'Arce, & Skibsted, 2004; Bragagnolo et al., 2005). Entretanto, não foi observada a degradação da vitamina E durante o armazenamento refrigerado por 15 dias em almôndegas de frango submetidas à alta pressão e adicionadas ou não de sálvia e alho (Mariutti, Orlie n, Bragagnolo, & Skibsted, 2008).

O uso da sálvia como antioxidante já foi testado com sucesso em uma diversidade de produtos alimentícios como maionese, banha, massa de torta, molho para salada e carnes (Chipault, Mizuno, & Lunderberg, 1956; Pizzocar o, Senesi, & Babbini, 1994; Wong, Hashimoto, & Shibamoto, 1995; El-Alim et al., 1999; Mc Carthy, Kerry, Kerry, Lynch, & Buckley, 2001; Mariutti, Orlie n, Bragagnolo, & Skibsted, 2008). Por outro lado, os trabalhos que avaliam os efeitos da adição de alho frente à oxidação lipídica de produtos alimentícios são escassos e apresentam resultados divergentes. Resultados que sugerem uma atividade antioxidante relacionada à adição de alho ou extratos derivados de alho foram verificados em óleo de girassol (Iqbal & Bhanger, 2007), carne (Yin & Cheng, 2003; Jurdi-Haldeman, Macneil, & Yared, 1987) e em salsichas de frango cruas (Sallam, Ishloroshi, & Samejima, 2004), porém, estas salsichas continham outras substâncias como fosfato de sódio, glutamato monossódico, nitrato de sódio e outros condimentos como pimenta branca, noz moscada, sálvia e pimenta da Jamaica em sua formulação. De fato, Mariutti, Orlie n, Bragagnolo, & Skibsted (2008) verificaram que a sálvia é capaz de conter parcialmente o efeito pró-

oxidante do alho, permanecendo portanto, a dúvida quanto ao efeito antioxidante do alho. Efeitos pró-oxidantes relacionados à adição de alho foram observados em carne (Wong & Kitts, 2002), em salsichas chinesas semidesidratadas (Sun, Ockerman, & Marriott, 2000) e em salsichas secas fermentadas tipo *chorizo* (Aguirrezabal, Mateo, Dominguez, & Zumalacarregui, 2000). Não foram encontrados relatos na literatura quanto aos efeitos da adição de alho e sálvia na oxidação do colesterol.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da sálvia e do alho desidratados, como antioxidantes naturais, e do sal, como fator pró-oxidante, em carne de peito de frango crua e grelhada, através da análise dos compostos secundários da oxidação lipídica (TBARS, malonaldeído, hexanal e pentanal), da análise de colesterol e óxidos de colesterol, das alterações na composição de ácidos graxos e no grau de degradação da vitamina E, durante o armazenamento a -18°C por 90 dias.

2. Material e Métodos

2.1. Material

2.1.1. Criação das Aves

Os frangos utilizados neste experimento foram gentilmente criados pela granja experimental da empresa Poli-Nutri Alimentos Ltda., localizada na cidade de Lençóis Paulista, São Paulo. Os 51 frangos da raça Cobb foram abatidos após 35 dias de seu nascimento. A alimentação foi fornecida à vontade. O consumo

estimado foi de 1,3 kg para fase inicial (1 a 21 dias) e de 2,4 kg para fase de engorda (22 a 35 dias). A composição centesimal e de micronutrientes e os teores de aditivos na ração fornecida às aves estão apresentadas nas Tabelas Suplementares 1 e 2, respectivamente.

2.1.2. Preparo da Amostra

Os filés de frango foram triturados em multiprocessador após a retirada da pele e da gordura externa aparente. À carne triturada foi adicionado sal, sálvia desidratada ou alho desidratado, de acordo com a **Figura 1**. Após a mistura de sal e/ou dos condimentos, hambúrgueres pesando 60 ± 1 g foram moldados e metade destes foi grelhada a 170°C , por 4 min de cada lado, até que a temperatura interna atingisse 70°C . Os hambúrgueres crus e grelhados (**Figura 2**) foram embalados em sacos de polietileno permeáveis ao oxigênio e estocados no escuro a -18°C durante 90 dias.

O alho desidratado (200 g) foi adquirido em um supermercado de Campinas, São Paulo, na forma de flocos. A sálvia fresca (500 g) foi comprada no CEASA de Campinas e desidratada em estufa a 40°C por 65 h. Os condimentos secos foram armazenados a -18°C e triturados em almofariz antes do uso.

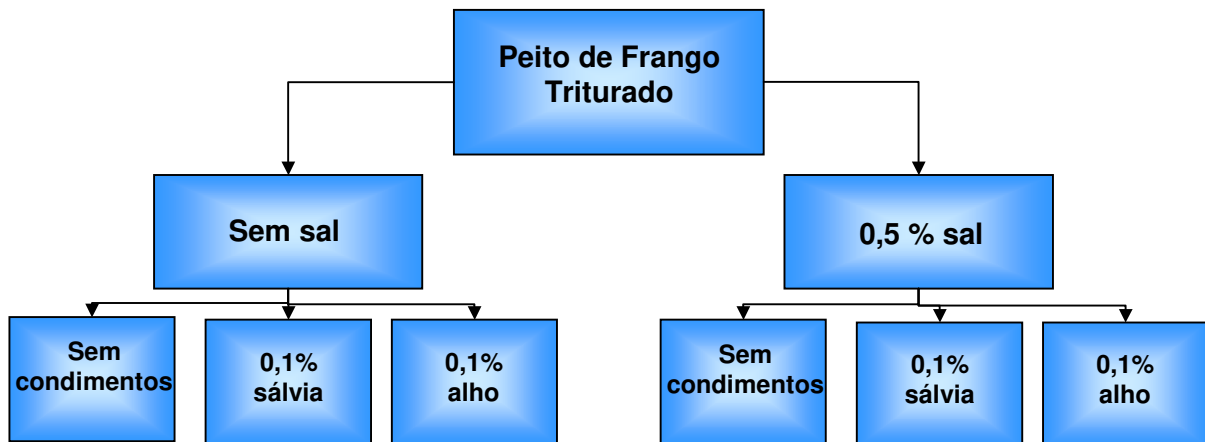


Fig. 1. Fluxograma de preparo de amostra

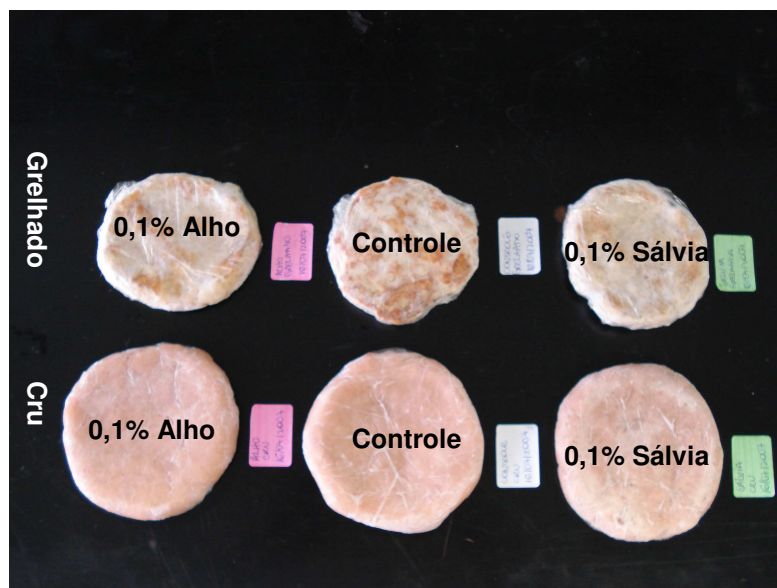


Fig. 2. Amostras de hambúrgueres de peito de frango grelhados e crus

2.2.2. Composição de Ácidos Graxos

O óleo (25 mg) obtido através da extração segundo Folch, Lees, & Stanley (1957) foram submetidos à saponificação e os ácidos graxos convertidos a ésteres metílicos segundo Joseph & Ackmann (1992). Os ésteres metílicos foram diluídos em hexano para a injeção em cromatógrafo gasoso. A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos padrões de ésteres metílicos (FAME Mix C4-C24, Supleco, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) e a quantificação por padronização interna com éster metílico de ácido tridecanóico e éster metílico de ácido nonadecanóico (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha), adicionados antes da injeção. Foi utilizado um cromatógrafo a gás (modelo GC2010, SHIMADZU, Kyoto, Japão), equipado com injetor split (1/50) a 250°C, coluna capilar de sílica fundida (100 m comprimento, 0,25 mm d.i., 0,20 µm espessura de fase estacionária) (CP-SIL 88, Chromopack, Middleburg, Holanda); detector de ionização de chama a 260°C e Workstation (GCSolution, SHIMADZU, Kyoto, Japão). A temperatura do forno do cromatógrafo foi programada com início a 120°C permanecendo por 8 min, aumentando para 160°C a 20°C/min, aumentando para 195°C a 3°C/min e permanecendo por 10 min, a 3°C/min a temperatura foi aumentada até 210°C, subiu até 220°C a 35°C/min permanecendo por 3 min, aumentando para 240°C com rampa de 20°C/min e permanecendo por 5 min, totalizando 46 min de corrida. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com velocidade linear de 34 cm/s e o gás *make*

up, nitrogênio a 30 ml/min. O volume de injeção foi de 1 µl através da técnica de *hot needle* por 5 s. As análises foram realizadas em triplicata.

2.2.3. Análise das Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação de TBARS foi realizada de acordo com Vyncke (1970, 1975) com algumas modificações (Sørensen & Jørgensen, 1996). 15 ml de TCA (7,5% de ácido tricloroacético adicionado de 0,1% de EDTA e 0,1% de galato de propila) foram adicionados a 5 g de amostra, homogeneizados (45 s, 13500 rpm em agitador mecânico) e filtrados. 5 ml do filtrado foram misturados com 5 ml de TBA 0,02 M (ácido tiobarbitúrico) e colocados em banho de água em ebulição por 40 min. A absorbância foi lida a 532 e 600 nm em espectrofotômetro (Agilent, modelo 8453E, Waldbronn, Alemanha). O valor de TBARS foi expresso em µmol de malonaldeído (MA) por kg de matéria seca usando curva padrão construída com concentrações de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP, Merck, Darmstadt, Alemanha) variando entre 0,1 e 8,0 µmol/l. As amostras foram analisadas em triplicata.

2.2.4. Determinação Pentanal, Hexanal e Malonaldeído

A extração dos voláteis derivados da oxidação lipídica foi realizada de acordo com o método otimizado e descrito no Capítulo 3. As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.5. Determinação da Vitamina E

A vitamina E foi analisada de acordo com Jensen et al. (1997). 4 g de amostra foram homogeneizadas com 20 ml de KCl 1,15% em um agitador mecânico por 30

s a 13500 rpm. 2 ml do homogeneizado foram transferidos para um tubo, contendo 0,2 ml de solução saturada de KOH e 2,0 ml de pirogalol 0,5% em etanol, e pesados. As amostras foram saponificadas em banho de água a 70°C por 30 min. Os lipídios foram extraídos com hexano protegido com BHT e centrifugados a 2500 rpm por 5 min. A fase hexânica foi evaporada sob fluxo de N₂ e as amostras foram diluídas em 0,25 ml de etanol contendo BHT. A separação em um HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) com detector de arranjo de diodos ajustado a 292 nm, em uma coluna C18 (Bondesil, 5µm, 4,6 mm x 15 cm) (Varian, Palo Alto, CA, EUA) utilizando fase móvel metanol/água (98:2) com fluxo de 1,6 ml/min. α-, γ- e δ-tocoferol foram expressos em mg/kg de carne usando padronização externa. Os padrões de α-, γ- e δ- tocoferol (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) com 97% de pureza foram utilizados para a construção das curvas padrão com concentrações entre 0,5 e 25 µg/mL.

2.2.6. Determinação do Teor de Lipídios Totais e Umidade

A determinação de lipídios totais foi realizada por gravimetria segundo Folch et al. (1957) e a umidade, de acordo com a metodologia da AOAC (1997).

2.2.7. Determinação de Minerais

A determinação dos minerais cálcio, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, sódio e zinco no cloreto de sódio foi realizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) de acordo com os métodos 985.35 e 984.27 da AOAC (1997) por espectrometria de emissão de plasma (ICP OES) e quantificação externa.

2.2.8. Análise Estatística

O software *Statistica for Windows 6* (Statsoft Inc., OK, USA) foi utilizado para a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. A correlação entre as metodologias foi estabelecida pelos coeficientes de correlação de Pearson.

3. Resultados e Discussão

Os efeitos da adição de sálvia, alho e sal na oxidação lipídica em peito de frango cru e grelhado foram analisados durante o armazenamento a -18 °C por 90 dias. O desenvolvimento da oxidação lipídica foi observado através da oxidação do colesterol e dos ácidos graxos, bem como da formação de produtos secundários como as substâncias reativas com o ácido tio-barbitúrico (TBARS) e dos aldeídos voláteis malonaldeído, pentanal e hexanal, e da degradação da vitamina E. Os teores de lipídios totais e umidade foram acompanhados durante o período de armazenamento para verificação de possíveis alterações.

3.1. Teor de Lipídios e de Umidade

O tratamento térmico resultou na diminuição da umidade em todas as amostras, sendo que as amostras grelhadas com sal apresentaram teores de umidade maiores que as grelhadas sem sal. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para hambúrgueres de frango assados e cozidos em microondas (Sharma, Panda, & Ahlawat, 2005). Durante todo o período de armazenamento os teores de

umidade permaneceram constantes ($p>0,05$). Em relação aos lipídios, não foram verificadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre as amostras devido ao tratamento térmico ou armazenamento. Os resultados estão apresentados na

Tabela 1.

Tabela 1 Teores médios de umidade (g/100g) e lipídios totais (g/100g, base seca) em carne de peito de frango durante o armazenamento a -18°C por 90 dias

Peito de Frango			Umidade ^a	Lipídios totais ^b
cru	controle		$73,3 \pm 0,5^a$	$4,3 \pm 0,03^a$
	sem sal	0,1 % sálvia	$73,1 \pm 0,4^a$	$4,6 \pm 0,2^a$
		0,1% alho	$72,9 \pm 0,6^a$	$5,0 \pm 0,1^a$
	controle		$72,6 \pm 0,1^a$	$4,5 \pm 0,3^a$
	0,5% sal	0,1 % sálvia	$72,5 \pm 0,4^a$	$4,4 \pm 0,2^a$
		0,1% alho	$72,3 \pm 0,3^a$	$4,5 \pm 0,4^a$
grelhado	controle		$65,9 \pm 0,5^d$	$5,0 \pm 0,04^a$
	sem sal	0,1 % sálvia	$67,3 \pm 0,8^c$	$5,2 \pm 0,04^a$
		0,1% alho	$66,9 \pm 0,3^c$	$5,2 \pm 0,4^a$
	controle		$68,5 \pm 0,4^b$	$5,1 \pm 0,07^a$
	0,5% sal	0,1 % sálvia	$69,1 \pm 0,3^b$	$4,4 \pm 0,2^a$
		0,1% alho	$68,9 \pm 0,5^b$	$4,6 \pm 0,06^a$

^a Valores expressos como a média de 18 determinações $\pm$ desvio padrão; ^b Valores expressos como a média de 6 determinações $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p<0,05$).

3.2. Composição de Ácidos Graxos

A composição de ácidos graxos foi determinada após o preparo das amostras e ao final de 90 dias de armazenamento a -18°C para verificar possíveis alterações

causadas pelo tratamento térmico e armazenamento. As Tabelas Suplementares 3 e 4 apresentam, respectivamente, a composição de ácidos graxos das amostras de peito de frango cru e grelhado.

Os ácidos graxos saturados (SFA) encontrados em maior abundância foram os ácidos palmítico (16:0) e esteárico (18:0). O ácido graxo monoinsaturado (MUFA) majoritário encontrado nas amostras foi o ácido oleico (18:1 n-9) e, em menor concentração, o ácido palmitoleico (16:1 n-7). O ácido linoleico (18:2 n-6) foi o ácido graxo poliinsaturado (PUFA) predominante, sendo o ácido araquidônico (AA) (20:4 n-6) o segundo PUFA encontrado em maior concentração, ambos pertencentes à família dos PUFA n-6. Os PUFA da família n-3 encontrados em maiores concentrações foram os ácidos α -linolênico (18:3 n-3), o eicosapentaenóico (EPA) (20:5 n-3) e o docosahexaenóico (22:6 n-3) (DHA).

Outros PUFA presentes nas amostras foram os ácidos γ -linolênico (18:3 n-6), o 11,14-eicosadienóico (20:2 n-6), o di-homo- γ -linolênico (20:3 n-6), além dos ácidos di-homo- α -linolênico (20:3 n-3) e erúcico (22:1 n-9) que foram detectados em todas as amostras apenas em nível de traços (menor que 1 mg/100g). Pequenas quantidades de ácidos graxos *trans*, especificamente o ácido elaídico (*t* 18:1 n-9), foram detectadas em todas as amostras. Estes resultados estão de acordo com os perfis de ácidos graxos encontrados na literatura para peito de frango (Echarte et al., 2003; Conchillo, Ansorena, & Astiasarám, 2004; Jahan, Paterson, & Spickett, 2004; Cantor, Decker, & Collins, 2008).

Embora a composição de ácidos graxos não seja o parâmetro mais adequado para verificar o desenvolvimento da oxidação lipídica, os ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados, podem sofrer alterações devido à oxidação. Para análise dos efeitos do tratamento térmico e do armazenamento, os ácidos graxos foram agrupados em diferentes grupos: ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA), insaturados totais (UFA), PUFA n-6 (n-6) e PUFA n-3 (n-3). Além disso, foram calculadas algumas relações de importância nutricional, como as relações entre os teores de PUFA n-6 e n-3 e entre PUFA e SFA. Os resultados estão apresentados na **Tabela 2**.

Os SFA não sofreram alterações ($p > 0,05$) devido ao tratamento térmico, nem durante o armazenamento. Modificações nos teores de SFA não são esperadas devido a sua estabilidade frente à autooxidação, porém, existem relatos na literatura da ocorrência de pequenas reduções nos teores de SFA atribuídos à cocção e ao armazenamento (Conchillo et al., 2004). Por outro lado, alterações significativas ($p < 0,05$) foram verificadas nos teores de MUFA, PUFA e UFA causadas pelo tratamento térmico e armazenamento em algumas situações no presente estudo. De fato, a suscetibilidade à oxidação é dependente do número de metilenos alílicos presentes no ácido graxo, sendo que a energia de dissociação de sua ligação fraca C-H do metileno em posição alílica é de 75 kcal/mol nos PUFA e 88 kcal/mol nos MUFA (GARDNER, 1989).

Tabela 2 Teores de ácidos graxos (g/100g, base seca) saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA), insaturados totais (UFA), poliinsaturados n-6 (n-6) e poliinsaturados n-3 (n-3) em carne de peito de frango crua e grelhada durante o armazenamento a -18 °C por 90 dias e relações de importância nutricional

Peito de Frango			dia	SFA	MUFA	PUFA	UFA	n-6	n-3	n-6/n-3	PUFA/SFA
cru	controle		0	1892±63 ^a	1593±19 ^a	1609±23 ^a	3202±4 ^a	1506±23 ^a	103±0 ^c	15±0,2 ^a	0,85±0,04 ^a
			90	1854±43 ^a	1536±9 ^a	1503±8 ^a	3038±1 ^a	1411±12 ^a	92±3 ^f	15±0,7 ^a	0,81±0,01 ^a
	sem sal	0,1 % sálvia	0	1984±90 ^a	1650±58 ^a	1656±75 ^a	3306±134 ^a	1536±75 ^a	120±0,3 ^a	13±0,7 ^b	0,83±0,00 ^a
			90	1900±95 ^a	1647±30 ^a	1613±17 ^a	3260±48 ^a	1493±17 ^a	120±1 ^a	12±0,1 ^b	0,85±0,05 ^a
		0,1% alho	0	2090±120 ^a	1570±14 ^a	1638±47 ^a	3208±61 ^a	1538±46 ^a	100±1 ^d	15±0,2 ^a	0,79±0,07 ^a
			90	2063±25 ^a	1534±3 ^a	1394±19 ^b	2928±22 ^c	1303±20 ^a	91±0,6 ^g	14±0,3 ^a	0,68±0,02 ^b
	controle		0	1952±34 ^a	1492±15 ^b	1588±36 ^a	3081±51 ^a	1490±33 ^a	99±3 ^d	15±0,1 ^a	0,81±0,03 ^a
			90	1950±123 ^a	1428±5 ^d	1267±1 ^c	2695±5 ^e	1186±2 ^b	82±3 ⁱ	15±0,5 ^a	0,65±0,04 ^b
	0,5% sal	0,1 % sálvia	0	1939±33 ^a	1608±44 ^a	1648±110 ^a	3256±66 ^a	1533±109 ^a	114±0,7 ^a	13±0,9 ^b	0,85±0,04 ^a
			90	1962±48 ^a	1619±45 ^a	1427±145 ^a	3046±100 ^a	1321±145 ^a	106±0,9 ^b	12±1,5 ^b	0,73±0,06 ^a
		0,1% alho	0	1983±92 ^a	1473±9 ^c	1599±68 ^a	3072±77 ^a	1503±67 ^a	97±1 ^e	16±0,5 ^a	0,81±0,00 ^a
			90	2077±88 ^a	1404±16 ^d	1221±5 ^d	2625±11 ^f	1138±9 ^c	83±4 ^h	14±0,7 ^a	0,59±0,02 ^c
grelhado	controle		0	1870±14 ^a	1586±33 ^a	1482±60 ^a	3068±27 ^a	1388±64 ^a	94±4 ^f	15±1,2 ^a	0,79±0,04 ^a
			90	1906±43 ^a	1430±5 ^d	1104±22 ^f	2534±17 ^f	1021±24 ^d	82±2 ⁱ	12±0,6 ^b	0,58±0,00 ^c
	sem sal	0,1 % sálvia	0	1857±116 ^a	1597±10 ^a	1583±45 ^a	3179±55 ^a	1462±42 ^a	121±2 ^a	12±0,1 ^b	0,85±0,03 ^a
			90	1945±31 ^a	1570±13 ^a	1474±53 ^a	3043±66 ^a	1360±52 ^a	114±0,9 ^a	12±0,4 ^b	0,76±0,02 ^a
		0,1% alho	0	1928±46 ^a	1474±40 ^c	1448±78 ^a	2921±118 ^c	1353±80 ^a	95±1 ^f	14±1,1 ^a	0,75±0,02 ^a
			90	1937±79 ^a	1311±8 ^f	1135±10 ^c	2446±18 ^g	1055±10 ^c	79±0,3 ⁱ	13±0,2 ^a	0,59±0,03 ^c
	controle		0	1857±30 ^a	1388±18 ^e	1378±98 ^b	2766±79 ^d	1298±98 ^a	79±0,2 ^j	16±1,3 ^a	0,74±0,06 ^a
			90	1903±0 ^a	1106±16 ^h	873±20 ^g	1979±36 ⁱ	808±21 ^e	64±1 ^j	13±0,6 ^b	0,46±0,01 ^d
	0,5% sal	0,1 % sálvia	0	1834±33 ^a	1537±14 ^a	1455±68 ^a	2992±81 ^b	1340±67 ^a	115±1 ^a	12±0,5 ^b	0,79±0,05 ^a
			90	1897±46 ^a	1415±31 ^d	1297±7 ^c	2712±23 ^e	1190±9 ^a	107±1 ^b	11±0,2 ^b	0,68±0,02 ^b
		0,1% alho	0	2012±72 ^a	1180±106 ^g	1128±87 ^f	2308±193 ^h	1054±90 ^c	74±4 ⁱ	14±1,9 ^a	0,56±0,06 ^c
			90	1968±11 ^a	958±27 ⁱ	744±13 ^g	1702±40 ⁱ	690±13 ^f	54±0,1 ^k	13±0,2 ^b	0,38±0,00 ^e

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

As amostras cruas com sálvia não apresentaram alterações nos teores de MUFA, PUFA e UFA durante o armazenamento, independente da adição de sal; enquanto as amostras cruas com alho tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) nos teores destes ácidos graxos durante o armazenamento, em especial, quando foram adicionadas de sal.

Os teores de MUFA, PUFA e UFA também não foram alterados nas amostras com sálvia imediatamente após o tratamento térmico e durante o armazenamento destas amostras grelhadas. Somente naquelas contendo sal houve uma redução significativa ($p < 0,05$) nas concentrações destes ácidos graxos. As amostras com alho apresentaram redução nos teores de ácidos graxos insaturados quando foram grelhadas e ao final do período de armazenamento, os teores de MUFA, PUFA e UFA nas amostras com alho e sal foram os mais baixos dentre todas as amostras.

O período de armazenamento e o tratamento térmico não alteraram a composição de ácidos graxos de produtos processados de carne de frango (Baggio & Bragagnolo, 2006a; 2006b). Em um estudo comparativo entre diferentes métodos de cocção de peito de frango, o cozimento em água fervente foi o método que menos alterou o perfil de ácidos graxos em peito de frango (Nogueira, Mariutti, & Bragagnolo, 2007). De acordo com os resultados, as amostras cozidas em forno, tanto convencional à gás como elétrico giratório, apresentaram um aumento no teor de lipídios, o que afetou diretamente os teores de ácidos graxos, principalmente saturados e monoinsaturados. O peito frito em óleo de soja

apresentou o maior teor de lipídios totais devido à absorção do óleo de fritura e conseqüentemente, um aumento significativo nos UFA.

A importância dietética de uma relação n-6/n-3 baixa é bem conhecida devido aos efeitos pró-trombóticos e pró-agregatórios das plaquetas induzidos pelo alto consumo de n-6, bem como pelas propriedades anti-inflamatórias, antitrombóticas e hipolipidêmicas dos ácidos graxos n-3 (Simopolous, 1999; 2002; 2006). Neste estudo, os teores de ácidos graxos da família n-6 foram muito superiores aos da família n-3, proporcionando uma relação n-6/n-3 elevada, considerando-se a recomendação de 4/1 a 10/1 para uma dieta saudável (Department of Health, 1994; FAO, 1994; Simopoulos, 2006). A relação n-6/n-3 foi de 11/1 a 13/1 para as amostras com sálvia. Estes valores não foram alterados pelo tratamento térmico, adição de sal ou armazenamento e foram significativamente ($p < 0,05$) mais baixos do que a relação n-6/n-3 apresentada pelas demais amostras.

Segundo recomendação do Departamento de Saúde do Reino Unido (1994), a razão entre os grupos de ácidos graxos PUFA/SFA deve ser maior que 0,4 para a manutenção de uma dieta saudável. A menor razão PUFA/SFA observada neste estudo foi de 0,38 em carne de peito de frango grelhada com adição de alho e sal após 90 dias de armazenamento.

3.3. Formação de Produtos Secundários da Oxidação Lipídica

Os valores de TBARS (**Figura 3**) determinados para as amostras cruas foram menores do que para as amostras grelhadas, variando entre 0,47 e 1,87 $\mu\text{mol MA/kg}$ frango (base seca) e entre 0,55 e 1,88 $\mu\text{mol MA/kg}$ frango (base seca),

para as amostras sem e com adição de sal, respectivamente; enquanto os valores de TBARS para as amostras grelhadas foram todos acima de 5 $\mu\text{mol MA/kg}$ frango (base seca).

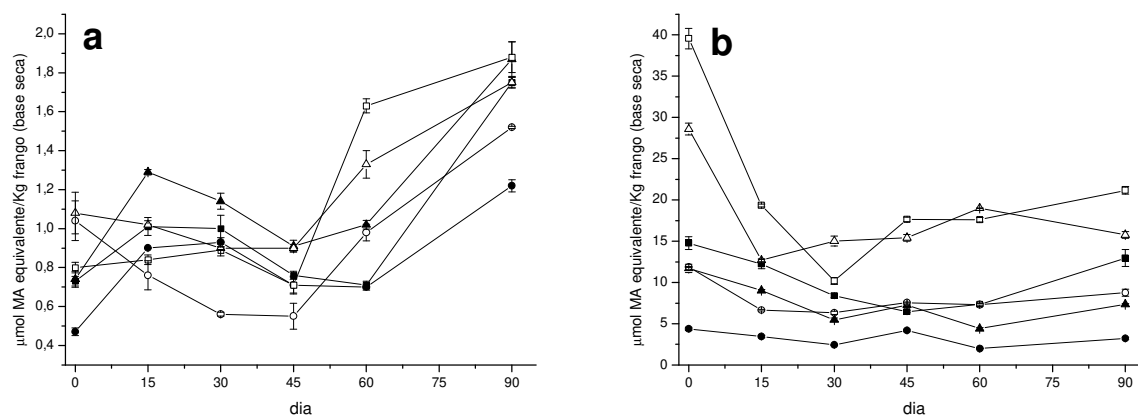


Fig. 3. Valores de TBARS ($\mu\text{mol MA}$ equivalente/kg, base seca) durante o armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 dias em peito de frango (a) cru e (b) grelhado. Legenda: -■- controle, -●- 0,1% sálvia, -▲- 0,1% alho, -□- 0,5% sal, -○- 0,1% sálvia + 0,5% sal, -△- 0,1% alho + 0,5% sal. As barras são os desvios padrão de três determinações.

O efeito do preparo da amostra, ou seja, da limpeza e moagem da carne e da modelagem dos hambúrgueres, evidenciou a ação pró-oxidante destes procedimentos e da adição do sal já no dia 0. A adição de sálvia resultou em um valor significativamente menor ($p < 0,05$) de TBARS entre todas as amostras cruas no dia 0, sugerindo uma ação antioxidante deste condimento frente a estes procedimentos, porém, apenas na ausência de sal. A característica pró-oxidante do sal pode ser facilmente observada, uma vez que todas as amostras contendo sal apresentaram valores maiores de TBARS ($p < 0,05$) do que a correspondente

amostra sem sal, com exceção do controle onde os valores de TBARS não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$). A moagem da carne causa a perda da integridade celular e aumenta a exposição dos lipídios à oxidação decorrente da maior exposição do tecido ao oxigênio. Em particular, a localização intracelular dos triacilgliceróis pode fornecer proteção contra a hidrólise no músculo intacto; porém, após a moagem, esta proteção é minimizada, se não eliminada. A ruptura mecânica do tecido também induz à formação de vesículas menores na membrana lipídica e a maior área da superfície também acelera a degradação (Erickson, 2002).

O tratamento térmico das amostras resultou em um aumento significativo ($p<0,05$) no valor de TBARS, porém, com intensidades distintas. As amostras contendo sálvia apresentaram um aumento médio de 10 vezes no valor de TBARS, independente da presença ou ausência de sal. O aumento no valor de TBARS nas amostras controle e com alho foi de 20 e 16 vezes, respectivamente, e quando estas foram adicionadas de sal, esta proporção foi aumentada ainda mais, sendo que o peito de frango com sal apresentou um aumento de 50 vezes e o com alho e sal de 26 vezes, em relação às amostras cruas. Embora o alho tenha sido capaz de reduzir a formação de TBARS durante o tratamento térmico em relação às amostras controle, a proteção conferida pela sálvia à carne de peito de frango foi maior do que pela adição de alho, independente da presença de sal, ficando desta forma evidente o maior efeito da sálvia na minimização da oxidação lipídica frente ao tratamento térmico.

Durante o período de armazenamento, as amostras cruas sofreram um pequeno aumento nos valores de TBARS, embora estes tenham permanecido sempre baixos. Ao final de 90 dias a -18 °C, a adição de sálvia ao peito de frango resultou no menor valor de TBARS em comparação às demais amostras, mesmo com a adição de sal, demonstrando a atuação da sálvia como antioxidante durante o armazenamento da carne de peito de frango crua. As amostras com adição de alho não apresentaram valores significativamente diferentes ($p>0,05$) das amostras controle. Durante o armazenamento das amostras grelhadas sob as mesmas condições, os maiores valores de TBARS foram encontrados no dia 0, havendo posteriormente um decréscimo, seguido pela estabilização destes valores, com exceção da amostra com sálvia que não apresentou diferença ($p>0,05$) entre os valores de TBARS durante todo o período de armazenamento. O decréscimo nos valores de TBARS durante o armazenamento de carne de frango também foi observado por outros autores (Galvin, Morrissey, & Buckley, 1997; Grau et al., 2001; Bragagnolo et al., 2005) e pode ser atribuído à reação do malonaldeído com proteínas ou a reações de polimerização (Buttkus, 1967; 1969; Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991; Aubourg, 1993). Ao final do período de 90 dias, as amostras com adição de condimentos apresentaram valores de TBARS mais baixos que o controle com e sem sal, sugerindo que ambos, a sálvia e o alho, tenham exercido efeito antioxidante durante o armazenamento das amostras grelhadas. No entanto, as amostras adicionadas de sal sempre apresentaram valores de TBARS maiores que as respectivas amostras sem sal, comprovando a ação catalítica do sal na oxidação lipídica.

A determinação de TBARS é um dos métodos mais usados para verificação e acompanhamento da oxidação lipídica em alimentos, apresentando boa correlação com análises sensoriais (Poste, Willemot, Butler, & Patterson, 1986; Nissen, Mansson, Bertelsen, Huynh-Ba, & Skibsted, 2000; Nissen et al., 2004). Entretanto, sua maior desvantagem é que esta reação não é específica para o malonaldeído, sendo que outros compostos relacionados ou não com a oxidação lipídica podem reagir com o ácido tio-barbitúrico, podendo superestimar o grau de oxidação lipídica (Gray & Monahan, 1992). Desta forma, os valores de TBARS devem ser utilizados para medir a extensão da oxidação lipídica, mas não para quantificar o malonaldeído.

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade do método de TBARS para determinação da ação antioxidante dos condimentos, a formação dos aldeídos voláteis malonaldeído, pentanal e hexanal também foi acompanhada através da técnica de SPME durante o armazenamento.

A **Figura 4** apresenta os teores de malonaldeído nas amostras durante o armazenamento. A formação de malonaldeído não indicou uma ação antioxidante da sálvia em relação ao preparo da amostra, contrariando os resultados obtidos por TBARS. A concentração média de malonaldeído nas amostras cruas após a moldagem dos hambúrgueres (dia 0) foi de $0,21 \pm 0,05$ $\mu\text{g/kg}$, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) independentemente da adição de sal e/ou de condimentos. Apesar de haver um ligeiro aumento nos teores de malonaldeído durante o armazenamento das amostras cruas, a sálvia foi capaz de minimizar sua

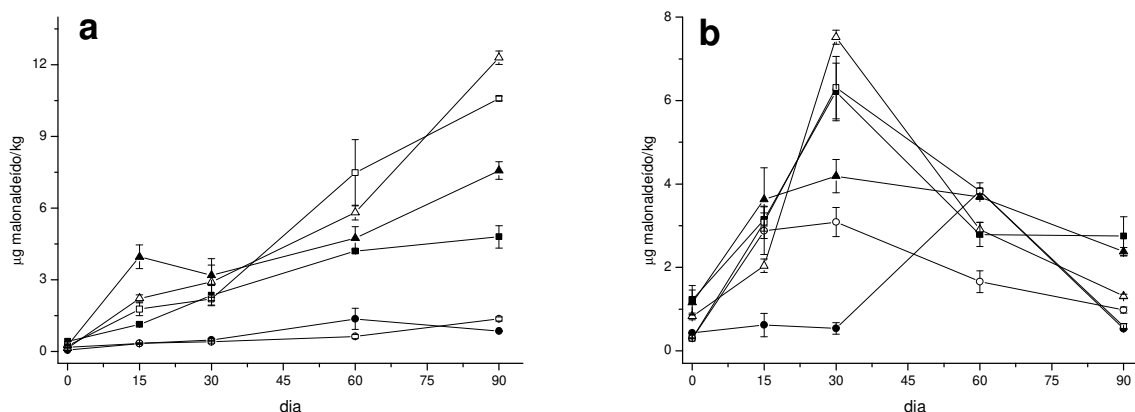


Fig. 4. Concentração de malonaldeído ($\mu\text{g/kg}$) durante o armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 dias em peito de frango (a) cru e (b) grelhado. Legenda: -■- controle, -●- 0,1% sálvia, -▲- 0,1% alho, -□- 0,5% sal, -○- 0,1% sálvia + 0,5% sal, -△- 0,1% alho + 0,5% sal. As barras são os desvios padrão de três determinações.

formação mesmo na presença de sal, mantendo estes valores abaixo de $1,4\text{ }\mu\text{g}$ de malonaldeído/Kg ao término de 90 dias a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por outro lado, a adição de alho não resultou em diferenças em relação ao controle, independentemente da adição de sal, até o dia 30. A partir do dia 60, as amostras contendo sal passaram a apresentar maiores teores de malonaldeído que as respectivas amostras sem sal, não havendo ainda diferença entre as amostras controle e com alho. Ao término do armazenamento, dia 90, o alho apresentou um comportamento pró-oxidante, sendo os teores de malonaldeído superiores aos da amostra controle.

O efeito do tratamento térmico no teor de malonaldeído foi verificado através de um aumento de 1,4 vezes na amostra com adição de sálvia e 5 vezes nas demais amostras, indicando uma ação antioxidante da sálvia frente à cocção, não

sugerindo efeito catalítico do sal na formação de malonaldeído durante o aquecimento.

O perfil da evolução dos teores de malonaldeído na carne grelhada durante o armazenamento foi totalmente distinto do perfil observado para a carne crua. A sálvia teve sua ação protetora evidenciada, sendo capaz de aumentar o período de indução de formação de malonaldeído, uma vez que nas demais amostras, os níveis de malonaldeído apresentaram um pico no dia 30 e na amostra com sálvia o pico ocorreu no dia 60. As amostras controle, com e sem sal, e a amostra com alho e sal foram as que apresentaram as maiores concentrações de malonaldeído. Observou-se pelos resultados obtidos que os teores mais baixos de malonaldeído podem corresponder a dois diferentes pontos durante o armazenamento do peito de frango grelhado, ou seja, antes ou depois do valor máximo alcançado, e portanto, uma baixa concentração de malonaldeído não associada a seu desenvolvimento durante o período de armazenamento pode levar a conclusões equivocadas quanto ao grau de oxidação. Desta forma, o uso deste parâmetro isolado não é recomendável, principalmente se não for realizado o acompanhamento durante o período de armazenamento. Comportamento semelhante foi observado por Shahidi e Pegg (1994) em carne suína cozida durante o armazenamento sob refrigeração por três semanas para os aldeídos pentanal e hexanal.

O hexanal foi o aldeído oriundo da oxidação lipídica formado em maior abundância em todas as amostras, sendo que tanto o hexanal quanto o pentanal, ambos derivados da oxidação de ácidos graxos n-6 como o ácido linoleico, foram

encontrados em maiores concentrações nas amostras grelhadas. As **Figuras 5 e 6** mostram a evolução dos teores de pentanal e hexanal durante o armazenamento. Valores extremamente baixos foram encontrados após o preparo da amostra, em média $0,22 \pm 0,03$ μg de pentanal/kg e $1,12 \pm 0,14$ μg de hexanal/kg, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras. A sálvia demonstrou ser capaz de minimizar a formação de pentanal durante o tratamento térmico. As amostras controle e com alho, sem e com adição de sal, apresentaram um aumento médio de 260 e 783 vezes na concentração de pentanal, respectivamente, enquanto as amostras adicionadas de sálvia sem e com adição de sal, apresentaram um aumento de 53 e 328 vezes, respectivamente. Entretanto, em relação à formação de hexanal, as amostras grelhadas apresentaram um teor médio de 272 μg de hexanal/kg, referente a um aumento de aproximadamente 243 vezes, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras grelhadas no dia 0.

Em geral, um aumento em maiores proporções na formação tanto de pentanal quanto de hexanal nas amostras cruas e grelhadas pode ser observado entre os dias 60 e 90, e entre os dias 30 e 60 do armazenamento, respectivamente. Acompanhando o teor destes dois aldeídos voláteis durante o armazenamento, verificou-se que as amostras com sálvia apresentaram os menores valores de pentanal e hexanal, especialmente as amostras grelhadas sem adição de sal, demonstrando que a adição de sálvia foi capaz de minimizar a formação destes aldeídos atuando como um antioxidante. Por outro lado, as amostras contendo

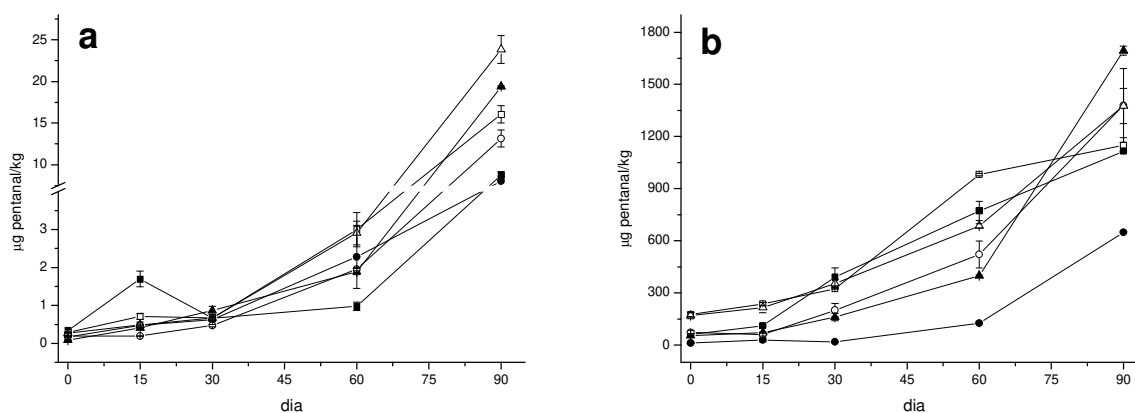


Fig. 5. Concentração de pentanal ($\mu\text{g/kg}$) durante o armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 dias em peito de frango (a) cru e (b) grelhado. Legenda: -■- controle, -●- 0,1% sálvia, -▲- 0,1% alho, -□- 0,5% sal, -○- 0,1% sálvia + 0,5% sal, -△- 0,1% alho + 0,5% sal. As barras são os desvios padrão de três determinações.

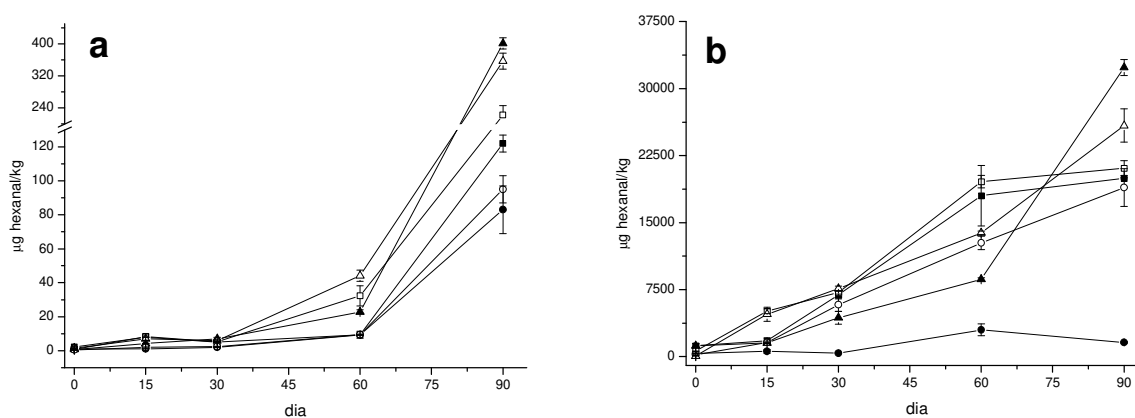


Fig. 6. Concentração de hexanal ($\mu\text{g/kg}$) durante o armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 dias em peito de frango (a) cru e (b) grelhado. Legenda: -■- controle, -●- 0,1% sálvia, -▲- 0,1% alho, -□- 0,5% sal, -○- 0,1% sálvia + 0,5% sal, -△- 0,1% alho + 0,5% sal. As barras são os desvios padrão de três determinações.

alho e sem adição de sal apresentaram valores de pentanal e hexanal menores que as amostras controle somente até o dia 60, porém, no final do período de 90 dias de armazenamento as concentrações de ambos os aldeídos foram maiores que o controle. As amostras com alho e sal apresentaram valores superiores ao controle durante todo o período. Este comportamento pró-oxidante do alho foi verificado durante o armazenamento tanto das amostras cruas, quanto das amostras grelhadas.

3.4. Colesterol e Formação de Óxidos de Colesterol

O teor médio de colesterol encontrado no presente trabalho foi 38 ± 2 mg/100g para o peito de frango cru e 40 ± 3 mg/100g para o peito de frango grelhado, sendo estes valores semelhantes aos descritos para peito de frango na literatura (Hamm & Ang, 1984; Bonoli, Caboni, Rodriguez-Estrada, & Lercker, 2007), embora teores mais elevados também já tenham sido reportados anteriormente (Bragagnolo & Rodriguez-Amaya, 1992; Maraschiello, Esteve, Regueiro, & García, 1998; Grau et al., 2001; Conchillo, Ansorena, & Astiasarán, 2005; Mariutti, Nogueira, & Bragagnolo, 2008). Estas diferenças podem ser explicadas devido à existência de variações naturais entre as aves influenciadas pela alimentação, linhagem, idade e sistema de criação, entre outros fatores. Para eliminar o efeito de perda de água, causado pelo aquecimento, na análise das possíveis alterações causadas pelo tratamento térmico e pelo armazenamento, os teores de colesterol foram comparados em base seca (**Tabela 3**) e desta forma, não foram verificadas

Tabela 3 Teores de óxidos de colesterol ($\mu\text{g/g}$, base seca), colesterol ($\text{mg}/100\text{g}$, base seca) e taxa de oxidação do colesterol (COP/colesterol) (%) em peito de frango durante o armazenamento a -18°C por 90 dias

Amostra	Dia	7-ceto	7 β -OH	7 α -OH	colesterol	oxidação do colesterol
Controle cru sem sal	0	$2,62 \pm 0,16^l$	nd ⁿ	nd ^r	138 ± 2^a	$0,19 \pm 0,01^p$
	30	$7,09 \pm 0,82^i$	$3,61 \pm 0,61^k$	$18,77 \pm 2,57^i$	144 ± 2^a	$2,04 \pm 0,28^l$
	60	$8,20 \pm 0,21^h$	$9,53 \pm 0,50^h$	$24,05 \pm 0,19^h$	142 ± 8^a	$2,93 \pm 0,06^h$
	90	$5,15 \pm 0,24^j$	$12,33 \pm 1,30^g$	$24,50 \pm 2,78^h$	141 ± 6^a	$2,99 \pm 0,09^h$
Controle grelhado sem sal	0	$4,99 \pm 0,60^j$	$5,54 \pm 0,12^j$	$27,95 \pm 0,10^g$	145 ± 5^a	$2,66 \pm 0,04^j$
	30	$6,47 \pm 0,04^i$	$3,62 \pm 0,31^k$	$24,91 \pm 0,19^h$	144 ± 6^a	$2,43 \pm 0,01^j$
	60	$10,34 \pm 0,29^g$	$10,73 \pm 0,68^g$	$33,53 \pm 1,28^e$	144 ± 6^a	$3,80 \pm 0,12^f$
	90	$9,78 \pm 0,33^g$	$19,74 \pm 0,91^f$	$38,06 \pm 0,39^d$	144 ± 5^a	$4,69 \pm 0,01^e$
Sálvia cru sem sal	0	$0,80 \pm 0,08^n$	nd ⁿ	nd ^r	141 ± 8^a	$0,06 \pm 0,01^p$
	30	$1,49 \pm 0,05^m$	nd ⁿ	nd ^r	144 ± 11^a	$0,10 \pm 0,00^p$
	60	$2,08 \pm 0,05^m$	$1,02 \pm 0,08^m$	$1,23 \pm 0,16^q$	145 ± 2^a	$0,30 \pm 0,01^p$
	90	$1,84 \pm 0,03^m$	$2,18 \pm 0,03^l$	$1,38 \pm 0,05^q$	145 ± 4^a	$0,37 \pm 0,01^p$
Sálvia grelhado sem sal	0	$2,45 \pm 0,04^l$	$2,71 \pm 0,02^l$	$5,19 \pm 0,19^n$	150 ± 5^a	$0,69 \pm 0,01^o$
	30	$2,66 \pm 0,09^l$	$2,30 \pm 0,09^l$	$5,57 \pm 0,48^n$	150 ± 2^a	$0,70 \pm 0,03^o$
	60	$4,58 \pm 0,02^j$	$6,95 \pm 0,26^i$	$8,43 \pm 0,50^m$	156 ± 5^a	$1,28 \pm 0,02^m$
	90	$7,73 \pm 0,58^i$	$12,06 \pm 0,35^g$	$12,56 \pm 0,15^l$	149 ± 2^a	$2,18 \pm 0,07^k$
Alho cru sem sal	0	$2,49 \pm 0,08^l$	nd ⁿ	nd ^r	138 ± 1^a	$0,18 \pm 0,01^p$
	30	$7,35 \pm 0,78^i$	$2,03 \pm 0,05^l$	nd ^r	139 ± 7^a	$0,68 \pm 0,06^o$
	60	$10,16 \pm 0,73^g$	$10,73 \pm 0,03^g$	$9,39 \pm 1,72^m$	136 ± 4^a	$2,23 \pm 0,18^k$
	90	$11,82 \pm 1,20^f$	$12,55 \pm 1,28^g$	$17,76 \pm 0,55^i$	138 ± 11^a	$3,06 \pm 0,05^g$
Alho grelhado sem sal	0	$3,81 \pm 0,21^k$	$4,63 \pm 0,09^j$	$29,29 \pm 4,00^f$	150 ± 2^a	$2,52 \pm 0,28^j$
	30	$5,79 \pm 0,15^j$	$4,43 \pm 0,19^j$	$29,94 \pm 0,73^f$	$146 \pm 0,3^a$	$2,74 \pm 0,07^j$
	60	$19,46 \pm 1,69^d$	$16,22 \pm 1,13^f$	$39,58 \pm 1,37^d$	150 ± 21^a	$5,02 \pm 0,13^e$
	90	$21,11 \pm 0,51^d$	$18,46 \pm 0,24^f$	$38,75 \pm 0,36^d$	151 ± 4^a	$5,19 \pm 0,07^e$
Controle cru com sal	0	$2,59 \pm 0,21^l$	nd ⁿ	nd ^r	143 ± 5^a	$0,18 \pm 0,01^p$
	30	$10,51 \pm 0,52^g$	$12,75 \pm 1,26^g$	$16,51 \pm 1,37$	143 ± 11^a	$2,79 \pm 0,03^j$
	60	$12,02 \pm 1,73^f$	$15,78 \pm 1,78^f$	$35,05 \pm 2,68^e$	141 ± 12^a	$4,47 \pm 0,19^e$
	90	$8,75 \pm 0,36^h$	$23,14 \pm 1,57^e$	$36,60 \pm 3,64^e$	134 ± 11^a	$5,10 \pm 0,36^e$
Controle grelhado com sal	0	$38,97 \pm 2,34^b$	$52,26 \pm 2,56^d$	$44,81 \pm 2,23^c$	147 ± 3^a	$9,25 \pm 0,17^d$
	30	$40,39 \pm 0,25^b$	$52,80 \pm 3,33^d$	$49,88 \pm 0,31^b$	156 ± 7^a	$9,19 \pm 0,21^d$
	60	$41,56 \pm 6,81^b$	$69,51 \pm 1,64^c$	$60,62 \pm 1,66^a$	158 ± 3^a	$10,88 \pm 0,43^b$
	90	$51,36 \pm 0,56^a$	$87,01 \pm 5,48^a$	$60,02 \pm 4,68^a$	155 ± 13^a	$12,77 \pm 0,62^a$
Sálvia cru com sal	0	$1,03 \pm 0,03^n$	nd ⁿ	nd ^r	142 ± 1^a	$0,07 \pm 0,00^p$
	30	$9,26 \pm 1,13^h$	$1,42 \pm 0,10^m$	$2,16 \pm 0,13^p$	144 ± 6^a	$0,89 \pm 0,06^n$
	60	$9,69 \pm 0,46^h$	$3,52 \pm 0,41^k$	$3,90 \pm 0,23^o$	$141 \pm 0,2^a$	$1,21 \pm 0,01^p$
	90	$9,33 \pm 0,36^h$	$5,97 \pm 0,23^j$	$3,96 \pm 0,05^o$	$141 \pm 0,8^a$	$1,37 \pm 0,04^n$
Sálvia grelhado com sal	0	$11,83 \pm 0,43^f$	$29,17 \pm 2,11^e$	$10,85 \pm 0,32^m$	144 ± 2^a	$3,59 \pm 0,14^g$
	30	$15,49 \pm 0,07^e$	$29,50 \pm 1,33^e$	$14,33 \pm 0,43^k$	149 ± 4^a	$3,99 \pm 0,06^f$
	60	$15,15 \pm 0,32^e$	$29,87 \pm 1,95^e$	$16,93 \pm 0,50^j$	150 ± 12^a	$4,14 \pm 0,14^f$
	90	$15,20 \pm 0,76^e$	$31,41 \pm 0,64^e$	$16,72 \pm 2,08^j$	148 ± 12^a	$4,29 \pm 0,13^e$
Alho cru com sal	0	$2,43 \pm 0,03^l$	nd ⁿ	nd ^r	145 ± 11^a	$0,17 \pm 0,00^p$
	30	$18,77 \pm 2,68^d$	$4,17 \pm 0,08^j$	$2,74 \pm 0,51^o$	140 ± 9^a	$1,83 \pm 0,16^l$
	60	$19,76 \pm 1,17^d$	$5,84 \pm 0,26^j$	$16,27 \pm 0,71^j$	138 ± 1^a	$3,04 \pm 0,16^g$
	90	$23,48 \pm 0,05^d$	$29,72 \pm 2,45^e$	$27,03 \pm 1,91^g$	$141 \pm 0,3^a$	$5,70 \pm 0,31^e$
Alho grelhado com sal	0	$34,87 \pm 0,80^c$	$77,28 \pm 1,87^b$	$43,88 \pm 4,89^c$	154 ± 3^a	$10,12 \pm 0,39^c$
	30	$37,54 \pm 1,16^b$	$73,08 \pm 9,63^b$	$51,21 \pm 4,05^b$	153 ± 7^a	$10,56 \pm 0,44^b$
	60	$38,12 \pm 2,94^b$	$73,51 \pm 7,01^b$	$59,53 \pm 1,12^a$	154 ± 6^a	$11,14 \pm 0,57^b$
	90	$40,10 \pm 1,96^b$	$80,51 \pm 3,21^a$	$60,33 \pm 0,84^a$	151 ± 13^a	$11,96 \pm 0,03^a$

Valores expressos como a média de duas determinações $\pm$ desvio padrão; nd – não detectado (limite de detecção: 7 β -OH e 7 α -OH= 0,02 $\mu\text{g/g}$). Letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

diferenças significativas ($p>0,05$) entre as amostras após o tratamento térmico ou durante o armazenamento.

Os óxidos de colesterol encontrados foram o 7-cetocolesterol, 7 β - e 7 α -hidroxicolesterol e 5,6 α - e 5,6 β -epoxicolesterol, sendo que os epóxidos foram detectados apenas através de espectrometria de massas em todas as amostras durante todo o período de armazenamento devido ao fato de estarem presentes em concentrações inferiores aos limites de quantificação do método utilizado para a quantificação (10,62 μ g/g para o 5,6 α -epoxicolesterol e 9,88 μ g/g para o 5,6 β -epoxicolesterol). Os produtos de oxidação da cadeia lateral, como o 20 α -, 22*R*-, 22*S*-, 24*S*-, 25-, e 25*R*-hidroxicolesterol, e o colestanoltriol não foram detectados em nenhuma das amostras.

O 7 β -hidroxicolesterol foi encontrado em maiores concentrações nas amostras com sal cruas e grelhadas, com exceção do controle cru com sal, e na amostra crua com sálvia e sal. Por outro lado, o seu isômero α foi o óxido de colesterol encontrado em maiores concentrações nas amostras sem sal, cruas e grelhadas, com exceção das amostras com sálvia. A mesma proporção de 7 α - e 7 β -hidroxicolesterol foi verificada na amostra grelhada com sálvia. A predominância de 7 α -hidroxicolesterol sobre seu isômero β já foi reportada anteriormente em carne de frango (Maraschiello et al., 1998; Echarte et al., 2003), carne suína (Park & Addis, 1987; Rudzinska, Flaczyk, Amarowicz, Wasowicz, & Korczak, 2007), vitela (Pie, Spahis, & Seillan, 1991) e em ovo desidratado (Obara, Obiedzinski, & Kolczak, 2006; Mazalli & Bragagnolo, 2007). Entretanto, este fenômeno não é

consistente com a oxidação do colesterol mediada por radicais livres, sugerindo a possibilidade da existência de outro mecanismo de oxidação ocorrendo em paralelo (Maraschiello et al., 1998).

O 7-cetocolesterol foi o óxido encontrado em maior abundância no peito de frango cru no dia 0, com concentrações variando entre 0,80 µg/g e 2,62 µg/g (base seca), não havendo diferenças entre as amostras com e sem sal. O 7β- e o 7α-hidroxicolesterol não foram detectados nas amostras cruas no dia 0. A menor concentração de 7-cetocolesterol foi encontrada na amostra com sálvia mostrando um efeito protetor da sálvia em relação ao preparo da amostra, ou seja, à ruptura dos tecidos causada pela trituração da amostra e à manipulação para moldagem dos hambúrgueres. A partir do dia 30, verificou-se a formação de 7β- e 7α-hidroxicolesterol nas amostras cruas, com exceção das amostras com sálvia sem sal, onde estes óxidos foram detectados apenas a partir do dia 60, e do 7α-hidroxicolesterol na amostra com alho sem sal. Durante o armazenamento das amostras cruas ocorreu um aumento nos teores de óxidos de colesterol total (**Figura 7**), com exceção da amostra com adição de sálvia sem sal, cujos teores de óxidos de colesterol total (COP total) não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$). A adição de sálvia foi capaz de minimizar a oxidação do colesterol no peito de frango cru durante o armazenamento a -18 °C por 90 dias, mesmo na presença de sal, enquanto o alho não apresentou nenhum efeito, apresentando os mesmos teores ($p>0,05$) de COP total que as amostras controle.

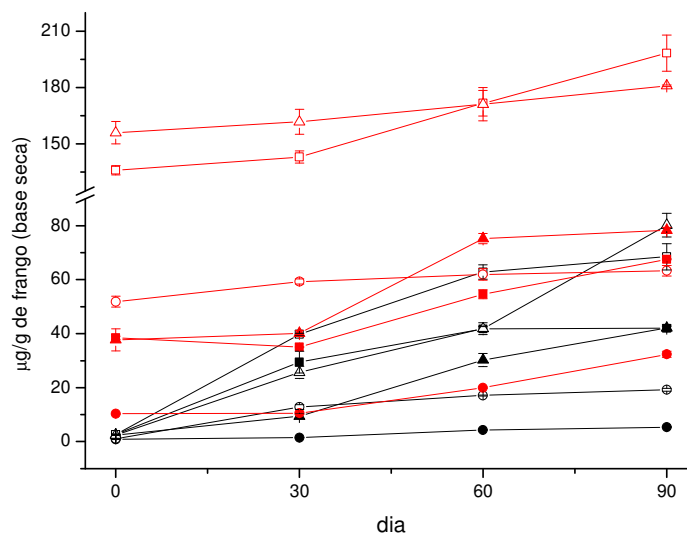


Fig. 7. Óxidos de colesterol totais ($\mu\text{g/g}$, base seca) durante o armazenamento de peito de frango a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 dias. Legenda: amostras cruas, linha e símbolo pretos; amostras grelhadas, linhas e símbolos vermelhos; -●- controle, -●- 0,1% sálvia, -▲- 0,1% alho, -□- 0,5% sal, -○- 0,1% sálvia + 0,5% sal, -△- 0,1% alho + 0,5% sal.

O tratamento térmico resultou no aumento da concentração de 7-cetocolesterol e na formação de 7β - e 7α -hidroxicoolesterol em todas as amostras, sempre em maior intensidade nas amostras com sal. O aumento médio de COP total (**Figura 7**) após as amostras terem sido grelhadas foi de 18 e 66 vezes nas amostras controle e com alho, sem e com adição de sal, respectivamente, e de 15 e 55 vezes nas amostras com sálvia, sem e com adição de sal, respectivamente. Os valores reportados na literatura variam em função do tipo de tratamento térmico, corte do frango, presença de outros ingredientes e conteúdo inicial de COP total. Em cortes de frango inteiros foram verificados aumentos de 4 e de 4,5 vezes no teor de COP total em peito assado a 220°C por 20 minutos e grelhado a 180°C por

3 minutos, respectivamente (Conchillo et al., 2003); de 6 a 129 vezes, em coxa de frango cozida em sacos de polietileno em banho de água a 85°C por 50 minutos (Maraschiello et al., 1998) e de 1,5 a 4 vezes, em coxas de frango desossadas embaladas a vácuo em saco de polietileno e cozidas em panela de pressão a 80°C por 35 minutos (Grau et al., 2001). Hambúrgueres disponíveis no comércio apresentaram um aumento de 6 vezes quando preparados em microondas e de 2,5 vezes quando fritos em azeite de oliva, contudo, a formulação destes produtos não está descrita para que possa ser feita uma avaliação da influência de outros ingredientes na oxidação do colesterol (Echarte et al., 2003). Aumentos na ordem de 2 a 2,4 vezes foram observados em uma mistura de peito e coxa de frango triturado submetida à irradiação de até 2 kGy e posteriormente assada em forno elétrico, porém, a concentração inicial de COP total nestas amostras foi de 21 a 120 vezes superior às concentrações reportadas no presente estudo (Lee et al., 2001).

Durante o armazenamento das amostras grelhadas, ocorreu o aumento nos teores de COP em todas as amostras e verificou-se que a sálvia apresentou grande atividade antioxidante, mesmo quando houve adição de sal, enquanto o alho não apresentou efeito algum. A taxa de oxidação de colesterol foi expressa como a porcentagem de óxidos de colesterol totais em relação à concentração de colesterol na amostra. As amostras grelhadas controle e com alho apresentaram as maiores taxas de oxidação do colesterol, em torno de 11 a 12%. O armazenamento sob congelamento de produtos cárneos após tratamento térmico não é suficiente para inibir a oxidação do colesterol, sendo que alguns autores

verificaram que o teor de COP total após três meses de armazenamento a -20°C pode representar o dobro do valor inicial (Pie et al., 1991). O aumento no teor de COP durante o armazenamento sob baixa temperatura deve estar associado à presença de radicais livres iniciadores de reações em cadeia, como os hidroperóxidos e outros compostos formados pela oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados.

3.5. Degradação da Vitamina E

A presença de vitamina E em tecidos animais influencia a estabilidade dos lipídios na carne durante o armazenamento. Os tocoferóis são capazes de atuar como antioxidantes, neutralizando os radicais livres e protegendo os fosfolipídios e o colesterol da oxidação (Gray et al., 1996). As amostras grelhadas apresentaram uma redução significativa nos teores de α -tocoferol e γ -tocoferol e essa diminuição continuou durante todo o período de armazenamento (**Figura 8**), sendo mais pronunciada após o dia 60. Não foi encontrado δ -tocoferol em nenhuma das amostras. A redução nos teores de α -tocoferol e γ -tocoferol foi menor nas amostras com sálvia.

Os resultados encontrados são semelhantes aos verificados pela adição de outros antioxidantes naturais, como o alecrim e o *dittany*, sobre a degradação de vitamina E durante o armazenamento refrigerado em almôndegas de frango pré-cozidas em embalagens permeáveis ao oxigênio e em almôndegas de frango submetidas à alta pressão (Racanicci et al., 2004; Bragagnolo et al., 2005). Os condimentos

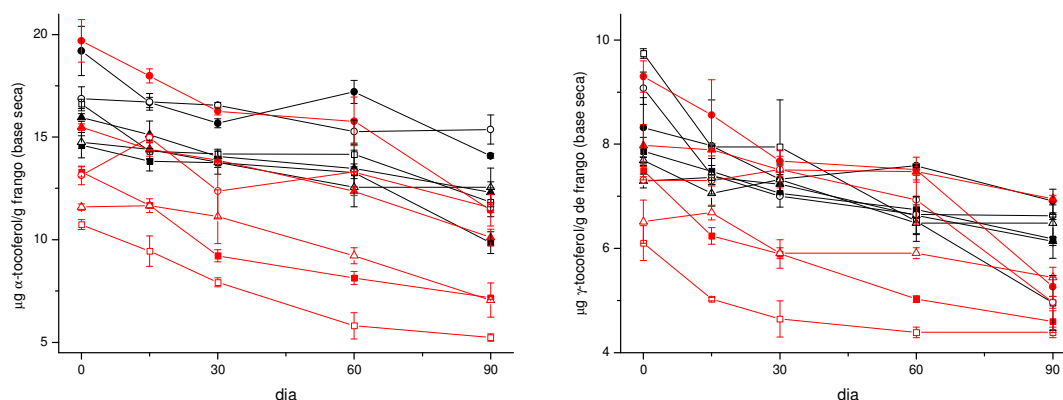


Fig. 8. Concentração de α -tocoferol e de γ -tocoferol ($\mu\text{g/g}$) durante o armazenamento de peito de frango a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 dias. Legenda: amostras cruas, linha e símbolo pretos; amostras grelhadas, linhas e símbolos vermelhos; -■- controle, -●- 0,1% sálvia, -▲- 0,1% alho, -□- 0,5% sal, -○- 0,1% sálvia + 0,5% sal, -△- 0,1% alho + 0,5% sal.

podem ser considerados agentes protetores da vitamina E, atuando através de um mecanismo de regeneração do α -tocoferol pelos polifenóis presentes nos condimentos. Por outro lado, não foram observadas alterações significativas nos teores de vitamina E após a aplicação de alta pressão e subsequente armazenamento a 4°C por 15 dias em carne de frango adicionada de sálvia e alho (Mariutti, Orlie, Bragagnolo, & Skibsted, 2008).

3.6. Influência do Cloreto de Sódio

O cloreto de sódio ou sal de cozinha é adicionado à carne por várias razões, como proporcionar sabor e inibir o crescimento microbiano. Entretanto, um efeito de aceleração da oxidação lipídica pela adição de sal tem sido verificado em carnes (Ellis, Currie, Thornton, Bollinge, & Gaddis, 1968; Barbut et al., 1985; Lee, Mei, & Decker, 1997; El-Alim et al., 1999; Hernandez, Park, & Rhee, 2002; Bragagnolo,

Danielsen, & Skibsted, 2006; Racanicci, Danielsen, & Skibsted, 2008). A **Tabela 4** apresenta a composição dos minerais presentes no sal (NaCl) utilizado no presente estudo, ficando evidente que o efeito pró-oxidante do sal não ocorreu devido à presença de microelementos contaminantes como o cobre e o ferro, uma vez que estes minerais não foram detectados. Este fato não suporta o mecanismo proposto por alguns autores para a aceleração da oxidação lipídica catalisada pelo sal (Barbut et al., 1985; El-Alim et al., 1999).

Tabela 4 Teor de minerais no cloreto de sódio

Minerais (mg/100g)	
Cálcio	0,96 ± 0,06
Cobre	nd < 0,2
Ferro	nd < 0,1
Fósforo	nd < 6
Magnésio	3,8 ± 0,2
Manganês	nd < 0,1
Potássio	5,0 ± 0,3
Sódio	41652 ± 432
Zinco	nd < 0,1

Valores expressos como média ± estimativa de desvio padrão. nd - Não detectado.

Embora Ellis et al. (1968) não tenham atribuído o efeito pró-oxidante do sal ao íon cloreto, Osinchak, Hultin, Zajicek, Kelleher, & Huang (1992) identificaram o cloreto como o componente ativo do sal em um sistema modelo de lipossomos e sugeriram que este é o responsável pela liberação de ferro da ferritina ou pela

modificação da organização da bicamada. Além disso, cátions bivalentes agem mais rapidamente que cátions monovalentes em concentrações equivalentes até 0,22M de cloreto (Osinchak et al., 1992). Outra hipótese provável é a do aumento da oxidação lipídica promovido pela liberação de íons ferro ligado a proteínas (Kanner et al, 1991).

3.7. Correlação Entre os Métodos Utilizados Para Determinar a Atividade Antioxidante da Sálvia e do Alho em Carne de Frango

Através da análise dos resultados obtidos pelo uso de diferentes métodos para verificação da atividade antioxidante da sálvia e do alho em carne de frango (**Tabela 5**), torna-se evidente a necessidade da determinação de mais de um parâmetro de oxidação lipídica para a garantia da forma de ação do condimento, principalmente no caso de condimentos com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, ou até mesmo uma pequena atividade pró-oxidante, como o alho.

Desta forma, fica evidente o motivo da existência dos dados conflitantes encontrados na literatura quanto à ação anti ou pró-oxidante do alho (Jurdi-Haldeman et al., 1987; Aguirrezabal et al., 2000; Sun et al., 2000; Wong & Kitts, 2002; Yin & Cheng, 2003; Sallam et al., 2004; Iqbal & Bhanger, 2007; Mariutti, Orlie, Bragagnolo, & Skibsted, 2008).

A sálvia atuou como antioxidante, minimizando a formação de diversos compostos oriundos da oxidação lipídica, frente a fatores pró-oxidantes como o processamento mecânico, presença de cloreto de sódio, tratamento térmico e armazenamento a -18°C por 90 dias.

Todos parâmetros de oxidação lipídica analisados apresentaram correlações significativas ($p < 0,05$) entre si para as amostras cruas. Por outro lado, para as amostras grelhadas diversas correlações não foram significativas ($p > 0,05$) (**Tabela 6**).

4. Conclusão

A adição de 0,1 % de sálvia à carne de peito de frango é comprovadamente um método eficaz para minimizar e retardar a oxidação dos lipídios e do colesterol durante o processamento térmico e o armazenamento a -18°C , sendo capaz de contrapor parcialmente os efeitos pró-oxidantes da adição de 0,5 % de sal. Por outro lado, a adição de 0,1 % de alho, nas mesmas condições, apresentou comportamento variável de acordo com a metodologia analítica utilizada para medir a oxidação lipídica, confirmando os resultados controversos encontrados na literatura e sugerindo que o alho não tenha efeito como antioxidante, podendo até mesmo acelerar a oxidação lipídica da carne de frango durante o armazenamento a -18°C .

Tabela 5 Correlação entre o método utilizado para medida da oxidação lipídica em peito de frango e a ação antioxidante dos condimentos

Método	preparo da amostra		cocção		armazenamento cru (90 dias)		armazenamento grelhado (90 dias)	
	sálvia	alho	sálvia	alho	sálvia	alho	sálvia	alho
TBARS	antioxidante	sem efeito	antioxidante	antioxidante	antioxidante	sem efeito	antioxidante	antioxidante
malonaldeído	sem efeito	sem efeito	antioxidante	sem efeito	antioxidante	pró-oxidante	antioxidante	sem efeito
hexanal	sem efeito	sem efeito	sem efeito	sem efeito	antioxidante	pró-oxidante	antioxidante	pró-oxidante
pentanal	sem efeito	sem efeito	antioxidante	sem efeito	antioxidante	pró-oxidante	antioxidante	pró-oxidante
COP	antioxidante	sem efeito	antioxidante	sem efeito	antioxidante	sem efeito	antioxidante	sem efeito
ácidos graxos	sem efeito	sem efeito	antioxidante	pró-oxidante	antioxidante	pró-oxidante	antioxidante	sem efeito

Tabela 6 Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros para determinação da oxidação lipídica em peito de frango

Cru	TBARS	hexanal	pentanal	malonaldeído	COP total	7-ceto	7β-OH	7α-OH	α-tocoferol	γ-tocoferol
TBARS		0,78	0,81	0,77	0,71	0,45	0,73	0,67	-0,73	-0,66
hexanal	0,78		0,96	0,77	0,64	0,46	0,73	0,53	-0,54	-0,54
pentanal	0,81	0,96		0,75	0,65	0,46	0,76	0,53	-0,52	-0,59
malonaldeído	0,77	0,77	0,75		0,94	0,70	0,93	0,85	-0,70	-0,68
COP total	0,71	0,64	0,65	0,94		0,74	0,95	0,94	-0,71	-0,68
7-ceto	0,45	0,46	0,46	0,70	0,74		0,65	0,51	-0,52	-0,48
7β-OH	0,73	0,73	0,76	0,93	0,95	0,65		0,86	-0,65	-0,63
7α-OH	0,67	0,53	0,53	0,85	0,94	0,51	0,86		-0,70	-0,66
α-tocoferol	-0,73	-0,54	-0,52	-0,70	-0,71	-0,52	-0,65	-0,70		0,70
γ-tocoferol	-0,66	-0,54	-0,59	-0,68	-0,68	-0,48	-0,63	-0,66	0,70	
Grelhado										
TBARS		NS	NS	NS	0,69	0,68	0,68	0,62	-0,41	NS
hexanal	NS		0,95	NS	0,43	0,40	NS	0,51	-0,67	-0,55
pentanal	NS	0,95		NS	0,40	NS	NS	0,45	-0,67	-0,63
malonaldeído	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS
COP total	0,69	0,43	0,40	NS		0,98	0,97	0,91	-0,72	-0,61
7-ceto	0,68	0,40	NS	NS	0,98		0,95	0,86	-0,69	-0,59
7β-OH	0,68	NS	NS	NS	0,97	0,95		0,79	-0,62	-0,56
7α-OH	0,62	0,51	0,45	NS	0,91	0,86	0,79		-0,77	-0,60
α-tocoferol	-0,41	-0,67	-0,67	NS	-0,72	-0,69	-0,62	-0,77		0,90
γ-tocoferol	NS	-0,55	-0,63	NS	-0,61	-0,59	-0,56	-0,60	0,90	

NS- não significativo (p>0,05).

5. Referências

- Aguirrezabal, M. M., Mateo, J., Dominguez, M. C., & Zumalacarregui, J. M. (2000). The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat Science*, 54, 77-81.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of the analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 16. ed. Washington: AOAC, 1997.
- Aubourg, S. P. (1993). Interaction of Malondialdehyde with Biological Molecules - New Trends About Reactivity and Significance - Review. *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 323-335.
- Baggio, S. R., & Bragagnolo, N. (2006a). Cholesterol oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage. *LWT - Food Science Technology*, 95, 611-619.
- Baggio, S. R., & Bragagnolo, N. (2006b). Fatty acids, cholesterol oxides and cholesterol in Brazilian processed chicken products. *Italian Journal of Food Science*, 18, 199-208.
- Barbut, S., Josephson, D. B., & Maurer, A. J. (1985). Antioxidant properties of rosemary oleoresin in turkey sausage. *Journal of Food Science*, 50, 1356-1363.
- Beltran, E., Pla, R., Yuste, J., & Mor-Mur, M. (2003). Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science*, 64, 19-25.
- Bonoli, M., Caboni, M. F., Rodriguez-Estrada, M. T., & Lercker, G. (2007). Effect of feeding fat sources on the quality and composition of lipids of precooked ready-to-eat fried chicken patties. *Food Chemistry*, 101, 1327-1337.

- Bragagnolo, N., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1992). Teores de colesterol em carne de frango, *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, 28, 122-131.
- Bragagnolo, N., Danielsen, B., & Skibsted, L. H. (2005). Effect of rosemary on lipid oxidation in pressure-processed, minced chicken breast during refrigerated storage and subsequent heat treatment. *European Food Research and Technology*, 221, 610-615.
- Bragagnolo, N., Danielsen, B., & Skibsted, L. H. (2006). Combined effect of salt addition and high-pressure processing on formation of free radicals in chicken thigh and breast muscle. *European Food Research and Technology*, 223, 669-673.
- Buttkus, H. (1967). The reaction of myosin with malonaldehyde. *Journal of Food Science*, 32, 432-434.
- Buttkus, H. (1969). Reaction of cysteine and methionine with malonaldehyde. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 46, 88-93.
- Cantor, A. H., Decker, E. A., & Collins, V. P. (2008). Fatty acids in poultry and egg products. In *Fatty acids in foods and their health implications*, C. K. Chow, 3rd Ed. CRC Press, Boca Raton. e-book, disponível em www.foodnetbase.com, acessado em 15/10/2008.
- Chipault, J. R., Mizuno, G. R., & Lundberg, W. O. (1956). The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technology*, 10, 209-211.

Conchillo, A., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2003). Combined effect of cooking (grilling and roasting) and chilling storage (with and without air) on lipid and cholesterol oxidation in chicken breast. *Journal of Food Protection*, 66, 840-846.

Conchillo, A., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). The effect of cooking and storage on the fatty acid profile of chicken breast. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 301-306.

Conchillo, A., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2005). Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 141-146.

Department of Health. (1994). Report on health and social subjects nº 46. *Nutritional aspects of cardiovascular disease*. Her Majesty's Stationery Office, London.

Echarte, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2003). Consequences of microwave heating and frying on the lipid fraction of chicken and beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5941-5945.

El-Alim, S. S. L. A., Lugasi, A., Hóvári, J., & Dworschák, E. (1999). Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 277-285.

Ellis, R., Currie, G. T., Thornton, F. E., Bollinge, N. C., & Gaddis, A. M. (1968). Carbonyls in Oxidizing Fat 2. Effect of Pro-Oxidant Activity of Sodium Chloride on Pork Tissue. *Journal of Food Science*, 33, 555-561.

Erickson, M. Lipid oxidation of muscle foods. In: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. C. C. Akoh and D. B. Min, Ed. 2nd edition. Marcel Dekker Inc., New York, 2002. Disponível em: www.foodnetbase.com. Acessado em: 15/10/2008.

- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11, 81-128.
- FAO. Food and Agricultural Organization. (1994). *Fats and oils in human nutrition*. Roma, FAO. Disponível em: www.fao.org. Acessado em: 02/12/2008.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Galvin, K., Morrissey, & P. A., Buckley, D. J. (1997). Influence of dietary vitamin E and oxidised sunflower oil on the storage stability of cooked chicken muscle. *British Poultry Science*, 38, 499 - 504.
- Gardner, H. W. (1989). Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 65-86.
- Grau, A., Guardiola, F., Grimpà, S., Barroeta, A. C., & Codony, R. (2001). Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: influence of dietary fat and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poultry Science*, 80, 1630-1642.
- Gray, J. I., Goma, E. A., & Buckley, D. J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43, S111-S123.
- Gray J. I., & Monahan, F. J. (1992). Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 3, 315–319.
- Hamm, D.; & Ang, C. Y. W. (1984). Effect of sex and age on proximate analysis, cholesterol and selected vitamins in broiler breast meat. *Journal of Food Science*, 49, 286-287.

- Hernandez, P., Park, D., & Rhee, K. S. (2002). Chloride salt type/ionic strength, muscle site and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in pork. *Meat Science*, 61, (4), 405-410.
- Iqbal, S., & Bhanger, M. I. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100, 246-254.
- Jahan, K., Paterson, A., & Spickett, C. M. (2004). Fatty acid composition, antioxidants and lipid oxidation in chicken breasts from different production regimes. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 443-453.
- Jensen, C., Guidera, J., Skovgaard, I. M., Staun, H., Skibsted, L. H., Jensen, S. K., Møller, A. J., Buckley, J., & Bertelsen, G. (1996). Effects of dietary α -tocopheryl acetate supplementation on α -tocopherol deposition in porcine *m. psoas major* and *m. longissimus dorsi* and on drip loss, colour stability and oxidative stability of pork meat. *Meat Science*, 45, 491–500.
- Joseph, J. D., & Ackman, R. G. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.
- Jurdi-Haldeman, D., Macneil, J. H., & Yared, D. M. (1987). Antioxidant Activity of Onion and Garlic Juices in Stored Cooked Ground Lamb. *Journal of Food Protection*, 50, 411-413.
- Kanner, J., Harel, S., & Jaffe, R. (1991). Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1017-1021.
- Lai, S., Gray, J. I., Smith, D. M., Booren, A. M., Crackel, R. L., & Buckley, D. J. (1991). Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. *Journal of Food Science*, 56, 616-620.

- Lee, S. K., Mei, L., & Decker, E. A. (1997). Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. *Meat Science*, 46, 349-355.
- Lee, J. I., Kang, J., Ahn, D. U., & Lee, M. (2001). Formation of cholesterol oxides in irradiated raw and cooked chicken meat during storage. *Poultry Science*, 80, 105-108.
- Maraschiello, C., Esteve, E., Regueiro, J., & García, A. (1998). Cholesterol oxidation in meat from chickens fed α -tocopherol- and β -carotene supplemented diets with different unsaturation grades. *Lipids*, 33, 705-713.
- Mariutti, L. R. B., Orlie, V., Bragagnolo, N., & Skibsted, L. H. (2008). Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. *European Food Research and Technology*, 227, 337-344.
- Mariutti, L. R. B., Nogueira, G. C., & Bragagnolo, N. (2008). Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides extraction in chicken meat using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2913-2918.
- Mazalli, M. R., & Bragagnolo, N. (2007). Effect of storage on cholesterol oxide formation and fatty acid alterations in egg powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2743-2748.
- Mc Carthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B., & Buckley, D. J. (2001). Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*, 57, 177-184.
- Nissen, L. R., Mansson, L., Bertelsen, G., Huynh-Ba, T., & Skibsted, L. H. (2000). Protection of dehydrated chicken meat by natural antioxidants as evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5548-5556.

- Nissen, L. R., Byrne, D. V., Bertelsen, G., & Skibsted, L. H. (2004). The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Science*, 68, 485-495.
- Nogueira, G. C., Mariutti, L. R. B., & Bragagnolo, N. (2007). Relação entre o método de cozimento e a composição de ácidos graxos em peito de frango. *Anais do XII Congresso Latino-Americano de Óleos e Gorduras*. CD, 15: 1-6.
- Obara, A., Obiedzinski, M., & Kolczak, T. (2006). The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray- and freeze-dried egg powders. *Food Chemistry*, 95, 173-179.
- Osinchak, J. E., Hultin, H. O., Zajicek, O. T., Kelleher, S. D., & Huang, C. H. (1992). Effect of NaCl on Catalysis of Lipid Oxidation by the Soluble Fraction of Fish Muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 12, 35-41.
- Park, S. W., & Addis, P. B. (1987). Cholesterol oxidation products in some muscle foods. *Journal of Food Science*, 52, 1500-1503.
- Pie, J. E., Spahis, K., & Seillan, C. (1991). Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 250-254.
- Pizzocaro, F., Senesi, E., & Babbini, G. (1994). Effetto protettivo di salvia e rosmarino freschi su hamburger surgelati di carne bovina. *Industrie Alimentari*, 33, 289-294.
- Poste, L. M., Willemot, C., Butler, G., & Patterson, C. (1986). Sensory aroma scores and TBA values as indices of warmed-over flavour in pork. *Journal of Food Science*, 51, 886-888.
- Racanicci, A. M. C., Danielsen, B., Menten, J. F. M., Reginato-d'Arce, M. A. B., & Skibsted, L. H. (2004). Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chill-storage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *European Food Research and Technology*, 218, 521-524.

- Racanicci, A. M. C., Danielsen, B., & Skibsted, L. H. (2008). Mate (*Ilex paraguariensis*) as a source of water extractable antioxidant for use in chicken meat. *European Food Research and Technology*, 227, 255-260.
- Rudzińska, M.; Flaczyk, E.; Amarowicz, R.; Wąsowicz, E.; & Korczak, J. (2007). Antioxidative effect of crackling hydrolysates during frozen storage of cooked pork meatballs. *European Food Research and Technology*, 224, 293-299.
- Sallam, K. I., Ishloroshi, M., & Samejima, K. (2004). Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 37, 849-855.
- Shahidi, F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an Indicator of the Flavor Deterioration of Meat and Meat-Products. *Lipids in Food Flavors*, 558, 256-279.
- Sharma, D. P., Panda, P. C., & Ahlawat, S. S. (2005). Effect of additives and microwave cooking on quality of spent chicken meat patties. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 42, 35-39.
- Simopoulos, A. P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 560S–569S.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of *omega*-6/*omega*-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 365-379.
- Simopoulos, A. (2006). Evolutionary aspects of diets, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60, 502-507.
- Sørensen, G., & Jørgensen, S. S. (1996). A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A.*, 202, 205–210.

- Stoick, S. M., Gray, J. I., Booren, A. M., & Buckley, D. J. (1991). Oxidative stability of restructured beef steaks processed with oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate. *Journal of Food Science*, 56, 597-600.
- Sun, Y. M., Ockerman, H. W., & Marriott, N. G. (2000). Garlic in Chinese sausage. *Journal of Muscle Foods*, 11, 35-43.
- Vyncke, W. (1970). Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichm*, 72, 1084-1087.
- Vyncke, W. (1975). Evaluation of direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). *Fette Seifen Anstrichm*, 77, 239-240.
- Wong, J. W., Hashimoto, K., & Shibamoto, T. (1995). Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2707-2712.
- Wong, P. Y. Y., & Kitts, D. D. (2002). The effects of herbal pre-seasoning on microbial and oxidative changes in irradiated beef steaks *Food Chemistry*, 76, 197-205.
- Yin, M. C., & Cheng, W. S. (2003). Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science*, 63, 23-28.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1 Composição centesimal e composição de micronutrientes da ração fornecida as aves

Composição centesimal da ração		
	Inicial	Engorda
Proteína bruta (g/100g)	21,55	20,45
Extrato etéreo (g/100g)	3,92	5,98
Fibra bruta (g/100g)	3,28	2,95
Matéria mineral (g/100g)	4,86	5,01
Cálcio (g/100g)	0,96	1,01
Fósforo (g/100g)	0,63	0,64
Sódio (g/100g)	0,23	0,2
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.050	3.200
Antioxidante (BHT 99%) (g/100g)	0,01	0,01
Agentes anticoccidianos		
Nicarbazina 98% (g/100g)	0,011	-
Surmax 100 (g/100g)	0,010	0,010
Coxistac 12% (g/100g)	-	0,055
Violeta de genciana (g/100g)	0,0030	0,0030

Tabela Suplementar 2 Teor de aditivos na ração
fornecida às aves

Aditivos ^a	Inicial	Engorda
Vitamina A (U.I./kg)	7.500.000	6.000.000
Vitamina D3 (U.I./kg)	2.500.000	2.000.000
Vitamina E (mg/kg)	18.000	12.000
Vitamina K3 (mg/kg)	1.200	800
Tiamina (mg/kg)	1.500	1.000
Riboflavina (mg/kg)	5.500	4.500
Piridoxina (mg/kg)	2.000	1.500
Vitamina B12 (µg/kg)	12.500	12.000
Niacina (mg/kg)	35.000	30.000
Ácido pantotênico (mg/kg)	10.000	10.000
Biotina (µg/kg)	67	50
Antioxidante (mg/kg)	5.000	5.000
Manganês (mg/kg)	120.000	120.000
Ferro (mg/kg)	60.000	60.000
Cobre (mg/kg)	13.000	13.000
Zinco (mg/kg)	100.000	100.000
Iodo (mg/kg)	2.500	2.500
Selênio (mg/kg)	500	500

^a Enriquecimento por kg de produto

Tabela Suplementar 3 Composição de ácidos graxos de peito frango cru durante armazenamento a -18 °C por 90 dias

Ácido Graxo (mg/100g de matéria seca)	Peito de frango cru						Peito de frango cru com adição de 0,5% de sal					
	Dia 0			Dia 90			Dia 0			Dia 90		
	controle	0,1% sálvia	0,1% alho	controle	0,1% sálvia	0,1% alho	controle	0,1% sálvia	0,1% alho	controle	0,1% sálvia	0,1% alho
14:0	20±0,1	21±0,2	27±0,8	21±1	20±0,6	26±0	21±2	19±1	27±1	20±0,5	20±1	24±0,8
15:0	3,1±0,1	3,0±0,0	3,9±0,2	3,2±0,1	3,2±0,1	3,7±0,1	2,9±0,1	3,1±0,1	3,4±0,3	3,1±0,1	3,2±0,3	3,5±0,5
16:0	1417±78	1490±67	1509±89	1387±54	1413±79	1512±18	1425±23	1467±8	1397±107	1447±74	1479±32	1495±131
17:0	7,4±0,1	7,5±0,7	7,5±0,5	7,5±0,1	7,4±0,3	7,5±0,3	7,9±0,1	7,2±0,1	7,4±0,0	7,4±0,3	7,0±0,0	7,5±0,6
18:0	437±16	453±22	533±30	428±11	447±16	505±7	486±9	433±40	539±16	463±49	445±18	539±43
20:0	3,5±0,5	3,9±0,1	3,9±0,3	3,5±0,4	3,6±0,1	3,8±0,4	3,8±0,1	3,7±0,3	3,9±0,3	3,8±0,3	3,4±0,1	3,6±0,4
22:0	4,9±0,0	5,7±0,3	5,4±0,3	5,0±0,1	5,4±0,2	5,5±0,3	5,6±0,0	5,6±0,0	5,4±0,3	5,5±0,5	5,5±0,3	5,7±0,3
14:1 n-9	3,0±0,2	2,6±0,2	2,8±0,1	2,5±0,1	2,6±0,1	2,2±0,1	3,3±0,0	2,6±0,5	2,9±0,1	2,4±0,0	2,6±0,0	2,2±0,1
16:1 n-7	109±1	127±0,1	113±0,0	106±0,5	125±0,7	109±0,7	109±6	126±7	113±0,3	100±0,9	121±1	98±0,9
18:1 n-9	1444±20	1481±58	1415±13	1393±8	1480±31	1387±2	1343±21	1439±37	1318±8	1291±6	1456±44	1269±18
tr 18:1 n-9	11±1	10±0,2	13±0,3	9,6±0,1	9,5±0,2	9,4±1,2	10±0,1	10±0,7	13±0,5	9,8±0,3	8,5±0,1	9,8±0,3
18:2 n-6	1299±22	1319±76	1338±45	1212±18	1277±16	1111±17	1298±30	1311±107	1298±63	1003±5	1108±144	953±7
18:3 n-3	65±3	84±0,7	62±1	58±3	84±0,5	55±0,2	61±2	78±2	59±0,2	46±3	71±0,6	48±3
18:3 n-6	6,1±0,2	5,7±0,1	6,1±0,3	6,0±0,0	5,7±0,1	5,7±0,1	6,3±0,4	5,8±0,1	6,2±0,1	5,5±0,3	5,9±0,1	5,9±0,0
20:1 n-9	12±0,8	11±0,4	9,5±0,0	11±0	12±0,1	9,6±0,2	12±0,1	12±0,1	11±0,3	11±0,1	11±0,1	9,8±0,3
20:2 n-6	24±0,4	31±1	22±0,1	22±0,2	30±0,3	20±0,1	21±2	31±4	21±0,5	21±0,8	29±1	19±0,5
20:3 n-6	31±0,5	29±0,3	28±0,7	29±0,4	29±0,3	25±0,3	29±0,1	30±1	27±0,7	27±0,3	29±0,7	22±0,2
20:4 n-6	147±1	152±0	144±0,2	141±6	152±0,8	141±3	135±2	156±3	151±3	130±2	149±0,7	147±1
20:5 n-3	6,3±0,0	6,9±0,0	6,3±0,1	6,2±0,0	6,9±0,2	6,3±0,1	6,3±0,4	7,2±0,3	6,3±0,2	6,3±0,1	7,0±0,0	6,3±0,3
22:6 n-3	32±3	29±0,5	31±0,4	28±0,5	29±0,6	29±0,6	31±0,8	29±0,6	31±1	29±0,2	28±0,2	29±0,8
24:1 n-9	25±0,2	29±0,0	29±1	23±0,2	28±0,1	27±2	25±0,7	29±0,8	28±0,9	24±1	28±0,6	26±0,8

Valores expressos como média ± desvio padrão de três determinações. tr- traços (menor que 1 mg/100g).

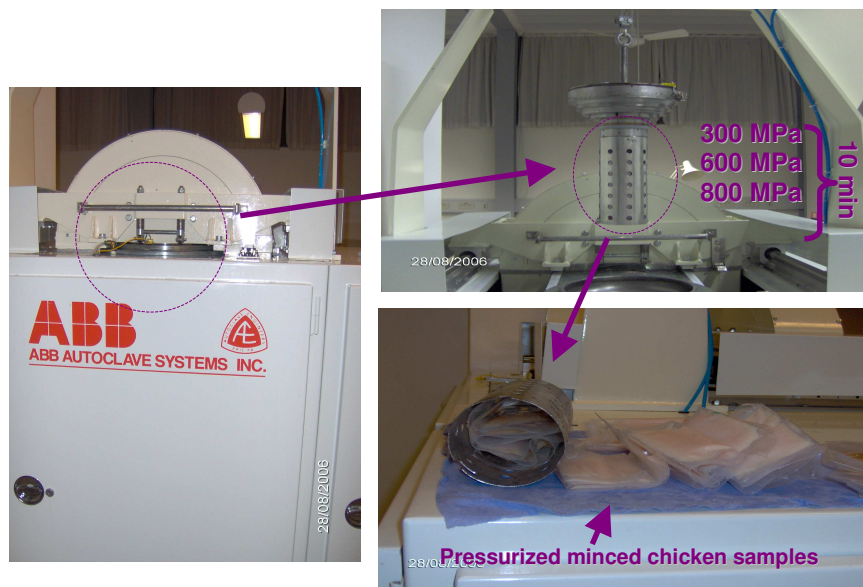
Tabela Suplementar 4 Composição de ácidos graxos de peito de frango grelhado durante armazenamento a -18 °C por 90 dias

Ácido Graxo (mg/100g de matéria seca)	Peito de frango grelhado						Peito de frango grelhado com adição de 0,05% de sal					
	Dia 0			Dia 90			Dia 0			Dia 90		
	controle	0,1% sálvia	0,1% alho	controle	0,1% sálvia	0,1% alho	controle	0,1% sálvia	0,1% alho	controle	0,1% sálvia	0,1% alho
14:0	20±1	23±0,0	21±0,9	20±2	22±0,0	20±1	24±0,8	22±1	25±0,9	24±1	22±0,2	23±0,8
15:0	3,6±0,3	3,6±0,5	3,8±0,5	3,5±0,1	3,8±0,4	3,5±0,3	3,6±0,5	2,8±0,1	2,6±0,1	3,7±0,1	2,8±0,3	2,6±0,5
16:0	1418±21	1366±56	1469±7	1433±48	1460±11	1458±35	1323±29	1355±33	1468±62	1380±30	1389±16	1398±13
17:0	7,2±0,3	7,4±0,4	7,7±0,1	7,1±0,2	7,4±0,1	7,7±0,4	7,0±0,9	7,2±0,3	7,1±0,2	7,0±0,2	7,2±0,2	7,4±0,2
18:0	412±5	447±60	417±39	433±6	444±21	438±44	490±0,4	437±1	524±2	480±31	466±30	528±23
20:0	3,9±0,3	3,8±0,1	4,0±0,8	3,6±0,4	3,6±0,1	3,9±0,1	3,9±0,1	3,3±0,4	3,4±0,1	3,6±0,2	3,8±0,3	3,6±0,2
22:0	5,8±0,2	6,0±0,1	5,7±0,1	5,7±0,4	5,6±0,2	5,8±0,3	5,4±0,2	5,9±0,2	5,5±0,0	5,3±0,2	5,9±0,2	5,6±0,5
14:1 n-9	2,6±0,2	2,5±0,3	2,3±0,1	1,6±0,1	2,3±0,1	1,7±0,2	tr	2,3±0,1	1,6±0,1	tr	2,0±0,1	1,2±0,2
16:1 n-7	106±0,7	128±1	104±0,1	96±1	120±0,7	88±0,5	101±0,8	122±0,0	100±1	85±0,7	115±0,3	81±2
18:1 n-9	1459±32	1439±7	1342±38	1318±6	1422±13	1205±8	1269±17	1386±14	1067±108	1014±16	1278±30	872±25
18:1 n-9	10±0,7	11±1	12±0,4	4,5±0,1	5,5±0,3	4,1±0,2	3,3±0,1	3,2±0,1	3,7±0,7	tr	tr	tr
18:2 n-6	1188±66	1243±44	1161±80	840±23	1149±54	882±8	1107±97	1131±68	888±90	641±18	994±9	552±5
18:3 n-3	62±4	84±0,9	63±0,6	51±0,7	78±0,5	50±1	54±0,7	77±1	45±3	41±0,8	71±0,6	33±0,5
18:3 n-6	5,6±0,8	6,6±0,1	5,6±0,5	5,2±0,2	6,3±0,2	5,1±0,1	5,4±0,1	6,3±0,02	4,2±0,4	4,2±0,1	6,0±0,0	3,6±0,6
20:1 n-9	9,8±0,7	10±1	9,6±0,3	8,4±0,1	11±0,5	8,2±0,1	10±2	9,9±0,5	5,4±0,7	4,6±0,1	7,6±0,1	3,6±0,1
20:2 n-6	24±0,5	32±0,5	20±0,0	20±0,3	29±0,5	18±0,6	23±0,5	23±0,8	18±1	16±0,3	20±0,2	13±0,4
20:3 n-6	28±0,1	30±0,5	28±0,1	24±0,7	29±0,2	25±0,1	26±0,2	31±0,5	21±0,9	20±0,6	27±0,6	15±0,1
20:4 n-6	142±2	151±3	138±1	132±1	147±1	125±1	137±0,3	150±2	123±1	128±2	143±0,3	107±7
20:5 n-3	6,2±0,2	6,8±0,0	6,0±0,3	6,1±0,0	6,6±0,0	5,7±0,1	4,7±0,3	7,1±0,2	4,5±0,1	4,4±0,1	6,9±0,2	3,7±0,1
22:6 n-3	26±0,2	30±1	26±0,5	25±2	29±0,4	23±0,8	21±0,1	31±2	25±0,6	19±0,5	30±0,7	18±0,5
24:1 n-9	8,0±0,1	17±0,4	16±1	5,7±0,6	15±0,06	8,8±0,8	8,2±0,3	15±0,4	6,2±1	2,8±0,6	13±0,7	tr

Valores expressos como média ± desvio padrão de três determinações. tr- traços (menor que 1 mg/100g).

CAPÍTULO 5

EFFECT OF SAGE AND GARLIC ON LIPID OXIDATION IN HIGH-PRESSURE PROCESSED CHICKEN MEAT



"With kind permission from Springer Science+Business Media: 1. Mariutti, L. R. B.; Orlie, V.; Bragagnolo, N.; Skibsted, L. H., Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. *European Food Research and Technology* **2008**, 227, (2), 337-344, © Springer-Verlag 2007."

Abstract

Sage was found to protect minced chicken breast processed with high hydrostatic pressure up to 800 MPa for 10 min against lipid oxidation during subsequent chill storage for 2 weeks. Garlic showed prooxidative effects especially at moderate high pressure around 300 MPa, an effect partly counteracted by simultaneous addition of sage. From the rate of lipid oxidation, measured as thiobarbituric acid reactive substances, apparent volume of activation for pressure-induced lipid oxidation during subsequent chill storage was estimated, which showed that the prooxidative effect of garlic and pressure-induced lipid oxidation were additive. Based on electron spin resonance (ESR) spectroscopy radical formation was measured in pressurized lipid and aqueous phases of minced chicken thighs, and a high radical scavenging capacity of sage in the lipid phase was identified as most important for the protective effect of sage.

Introduction

The concept of hurdle technology based on the application of combined preservative factors (hurdles) in order to ensure microbial safety, chemical stability, and sensorial and nutritional qualities of food products was introduced by Leistner [1]. Among the new physical processing procedures applied in food industry as part of such a preservation strategy, high-pressure processing has been the most successful. Low pH foods, including jams, fruit juices, jellies, sauces, fruit, yogurts, ingredients for ice-creams, dressings, guacamole, and a few high pH foods such as packed sliced meats preserved by high hydrostatic pressure have now captured niche markets for high-quality products [2]. Generally, high-pressure treatment results in inactivation of microorganisms and causes only minor changes in taste and flavor. However, negatively side effects such as changes in colour, texture and structure have been recognized, and high-pressure treatment may also induce lipid oxidation in meat depending on processing time and especially on the pressure level applied [3-6].

The use of natural antioxidants from herbs and spices in meat products has been shown to minimize pressure-induced lipid oxidation in various meat products [7]. Rosemary was found an effective antioxidant in salted, high-pressure treated (600 MPa) chicken breast during cold storage (5 °C for 9 days in the dark) and subsequently heat-treated to mimic cooking, when measured as formation of the secondary lipid oxidation products hexanal and pentanal and of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Rosemary was also found to protect tocopherols

against degradation compared to pressure-processed chicken meat without rosemary added [8]. Pressure-processed chicken breast and thigh with rosemary added also showed lower rates of oxygen consumption and a lower tendency of free radical formation as early events in lipid oxidation compared to pressure-processed chicken meat without rosemary added [9]. Other antioxidants, such as rosemary extract, EDTA, and egg white powder have been shown to protect pressure-processed (300 and 500 MPa) chicken meat slurries against lipid oxidation during subsequent chilled storage [4].

Other spices used for chicken dishes in traditional cooking also deserve to be explored for a potential use as antioxidants in high-pressure processed chicken meat. Sage and garlic are such spices [10-12], and in order to evaluate sage and garlic as natural antioxidants in combination with pressure treatment of chicken meat, the effect of working pressure on lipid oxidation in whole chicken meat with or without sage and garlic and with the spices in combination was investigated. Moreover, in order to establish the mechanisms behind any antioxidant effect of sage and garlic, the effect of spice addition and working pressure on radical formation in chicken meat lipid phase and chicken meat aqueous phase was investigated by electron spin resonance (ESR) spectroscopy.

Materials and methods

Preparation of chicken meat samples

Frozen chicken breast was obtained from Rose Poultry A/S (Vinderup, Denmark) and was thawed for 48 hours at 5 °C. The chicken breasts were minced in an

electric mincer after removing connective and adipose tissues. The minced meat was divided into four portions. The first portion was mixed with 0.1 g of dried sage leaves/100 g of meat, the second was mixed with 0.1 g of dried garlic/100 g of meat, the third was mixed with 0.1 g of dried sage leaves/100 g of meat plus 0.1 g of dried garlic/100 g of meat, and the fourth was a control with no spice added. The sage was a fresh Brazilian product from which the leaves were separated from the plant and dried at 40 °C for 65 h. The dried garlic was a commercial Brazilian product. Both spices were stored at –18 °C until use and grounded in a mortar just before addition to the minced meat, from which meat balls each weighing 30.0 ± 0.5 g were formed and vacuum-packed in polyethylene bags at 99% vacuum and immediately submitted to high-pressure treatment.

High-pressure processing

The vacuum-packed meat samples were submerged in the pressurizing chamber of a QUINTUS Food Processing Cold Isostatic Press QFP-6 (Avure Technologies AB, Västerås, Sweden) with water thermostated at 5 °C as the pressure transmission fluid. The meat samples were exposed to hydrostatic pressures at 300, 600, and 800 MPa for 10 min. During high-pressure treatment, the temperature in the pressure chamber increased and the maximum temperatures reached were 22.6 °C at 300 MPa, 40.2 °C at 600 MPa and 49.7 °C at 800 MPa, as measured by a build-in thermocouple. The depressurizing was automatically after 10 min and instantly resulting in a decrease in temperature to approximately 5 °C.

Packaging and storage

The pressurized meat samples were repacked in polyethylene bags and stored at 5 °C in the dark for 14 or 15 days, with sampling on day 1, 3, 7, 9, 11, and 14 or day 2, 4, 8, 10, 13, and 15 for the two storage periods, respectively, and analyzed for thiobarbituric acid reactive substances, and color was measured. Vitamin E determinations were conducted at the first and last days of storage.

Analysis of thiobarbituric acid reactive substances

The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined in 5.00 ± 0.05 g samples of homogenized meat according to the method of Vyncke [13, 16] with some modifications [15]. TBARS were expressed in μmol malonaldehyde (MDA) per kg of dry matter using a standard curve (concentration range from 0.10 to 8.0 $\mu\text{mol/L}$, $y=0.0779x+0.0034$, $R^2=0.9999$) established using 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP, Merck, Darmstadt, Germany). The reported values are means of duplicate measurements each on two different samples exposed to the same treatment.

Color measurements

The color measurements were performed using a Color guide 450 (Gardner, Columbia, USA). The L^* -, a^* - and b^* - values were measured five times on the surface of the meat product.

Vitamin E determination

Analysis of α - and γ -tocopherol content in chicken meat were performed as previously described [16]. Vitamin E was expressed as mg α - and γ -tocopherol per kg of meat using an external standard curve (concentration range from 0.5 to 10 mg/L, $y=24.891x-2.002$, $R^2=0.9995$ for α - tocopherol (Merck, Darmstadt, Germany), and $y=77.373x-10.117$, $R^2=0.9994$ for and γ -tocopherol (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany)). The reported values are means of duplicate measurements each on two different samples exposed to the same treatment.

Preparation of lipid and aqueous phase systems

Chicken thighs were thawed for 24 h at 5 °C and minced in an electric mincer after the removal of bones and connective and adipose tissues. The aqueous and lipid phases were cold-extracted based on the method for total lipid determination described by Folch et al. [17]. Minced thigh meat was extracted twice with a chloroform-methanol solution (2:1, v/v) (analytical grade, Merck, Darmstadt, Germany), and partition was performed in a tube by centrifugation with a 1.0 mM calcium chloride (analytical grade, Merck, Darmstadt, Germany) aqueous solution to separate the lipid phase (chloroform phase) and the aqueous phase. Chloroform was removed from the lipid phase in a rotation evaporator at 45 °C, and the aqueous phase was filtered. Both phases were stored at –18 °C until used. Before high-pressure application, the spin trap N-*t*-butyl- α -phenyl nitron (PBN, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) was dissolved in the aqueous phase in order to give a concentration of 56.4 mM. Sage or garlic was added to two aqueous PBN

solutions to yield a concentration of 0.10 g of spice/100 mL, and the solutions were mixed for 15 min and filtered. The lipid phase was diluted (1:1, w/w) with MCT oil (medium chain triglycerides oil, Brøste A/S, Lyngby, Denmark) to yield a final PBN concentration of 56.4 mM. Sage or garlic was added to two MCT-PBN solutions to yield 0.10 g of spice/100g, and the solutions were vortexed for 1 min and after resting for 15 min subjected to high-pressure treatment. Plastic bottles with screw caps were filled with these solutions based on the lipid phase and the aqueous phase with no headspace and vacuum-packed in polyethylene bags and immediately submitted to high-pressure treatment.

High-pressure processing

The vacuum-packed bottles containing the aqueous phase or the lipid phase were pressurized at 300, 600, and 800 MPa in a high-pressure chamber at 7 °C for 10 min (PISKA Pressure Systems, Stanford, UK) with castor oil as the pressure transmission fluid. The depressurizing was automatically after 10 min and instantly resulting in a decrease in temperature to approximately 5 °C.

ESR spectroscopy

The ESR measurements were made in a JEOL FR 30 ESR spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at room temperature and using manganese as internal standard. The ESR measurements were made immediately after the high-pressure treatment for both the lipid and aqueous phases. For the aqueous phase, the measurements were carried out using the following settings: internal manganese

standard, 600; microwave power, 4 mV; center field, 336.390 mT; sweep width, 5 mT; sweep time, 2 min; modulation width, 0.2 mT; amplitude, 630; and conversion time, 0.3 sec. For the lipid phase, the measurements were carried out using the following settings: internal manganese standard, 750; microwave power, 4 mV; center field, 335.718 mT; sweep width, 5 mT; sweep time, 2 min; modulation width, 0.2 mT; amplitude, 630; and conversion time, 0.3 sec. The trapping of radicals in the aqueous and lipid phases by PBN resulted in an ESR-spectrum with six lines in both experiments. The signal height of the second line of the centre field doublet was used to quantify the relative concentration of radical adducts in the samples. The reported values are means of triplicate measurements each on three different samples exposed to the same treatment.

Free radical scavenging capacity of the spices extracts

50 mL of solvent (water or hexane) was added to 10 g of spice and sonicated for a duration of 20 min. The extract was filtered under vacuum and the solid residue was extracted and filtered twice, using the same procedure with 20 mL of solvent. The filtrates were combined and conveniently concentrated or diluted. The extracts of garlic and sage in water and hexane were evaluated for their capacity as antioxidants using two different radicals. The ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) acid, diammonium salt, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) radical cation decolorization assay was carried out based on a method developed by Re et al. [18]. Since the maximum absorption wavelength of the radical was observed at 750 nm, the absorbance of the extracts and

standard reactions were measured at 750 nm, instead of 734 nm as described in the original method. The decrease in absorbance was determined after 0 and 30 min at room temperature for each extract. The activities of samples of spice extracts were calculated from a dose-response curve of Trolox (6-hidroxy-2,5,7-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) and expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) radical assay was performed according to the method of Brand-Williams et al. [19]. Aliquots of increasing volumes of the spice extracts were added to 3.0 mL of a $6.0 \cdot 10^{-5}$ M DPPH methanolic solution. The decrease in absorbance was determined at 515 nm after 0 and 30 min at room temperature. The concentration of spice (EC_{50} = g dried spice/mmol DPPH) necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% was determined for the two spices each extracted with water and hexane and the results were expressed as the antiradical power ($ARP = 1/EC_{50}$). All reactions were carried out in triplicate.

Total phenolic analysis

The total phenolic contents of sage and garlic extracts were measured by the Folin-Ciocalteu reagent assay described by Singleton et al. [20] using 80% aqueous methanol (analytical grade, Labsynth, São Paulo, Brazil). The results were expressed as mg of gallic acid (Extrasynthèse, Genay, France) equivalent (GAE)/100 g of dried spice.

Statistical analysis

The results were submitted to analyses of variance and the means were classified by LSD ("least square difference" at $p < 0.05$). The adjusted means were calculated by multiple regression by the General Linear Model (GLM) procedure. All the calculations were performed using the software Statistica for Windows 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) [21].

Results and discussion

The effect of sage, garlic, and of sage plus garlic on lipid oxidation induced by high-pressure treatment (300, 600, and 800 MPa) during chill storage at 5 °C for up to 15 days was investigated using TBARS as a measure of the extent of lipid oxidation (Fig. 1). Lipid oxidation induced by pressure was found to vary with the pressure level as may be seen from the different extent of lipid oxidation development in meat without spice addition. From the TBARS-values it is directly seen that sage is very effective in protecting chicken meat, since pressure treatment did not induce significant lipid oxidation during the entire storage period for chicken meat with sage added, as the level of TBARS was below 11 $\mu\text{mol/kg}$ dry matter and comparable to the TBARS-values for the control meat without spice addition and not subjected to pressure treatment. In contrast, garlic has a prooxidative effect in the pressurized meat, as lipid oxidation was most significant for chicken meat with garlic added and subjected to pressure even at 300 MPa, and increasingly for 600 and 800 MPa. The treatment at the moderate high

pressure of 300 MPa resulted for chicken with garlic added in the same high level of lipid oxidation as seen for the meat without spice addition pressurized at 600 or at 800 MPa. Interestingly, sage counteracts, but only to some extent, the prooxidative effect of garlic in the chicken meat as seen from the product with addition of both sage and garlic compared to the products with one of the spices added. Oxidative damage is seen to be initiated for pressure treatment between 300 and 600 MPa, thus the critical pressure for induction of lipid oxidation is between 300 and 600 MPa in agreement with previous findings [3, 4, 22]. Small changes in the processing procedure or small variation in the quality of the raw material may have large effects on lipid oxidation at pressures close to this critical pressure, since Bragagnolo et al. [8] found that chicken breast pressure-processed at 600 MPa showed little development in TBARS values during chilled storage. Vacuum packaging of chicken breast [3], chicken thigh [4], and minced turkey thigh [23] pressurized at 500 MPa was also found to minimize the pressure effects on lipid oxidation during subsequent storage.

Garlic is clearly prooxidative in the analysed product, and prooxidative effects of garlic in meat products have previously been reported by Wong et al. [24] for irradiated beefsteaks after 4 weeks of storage at 4 °C. On the other hand, organosulfur compounds isolated from garlic were shown to be even better antioxidants than α -tocopherol in ground beef during

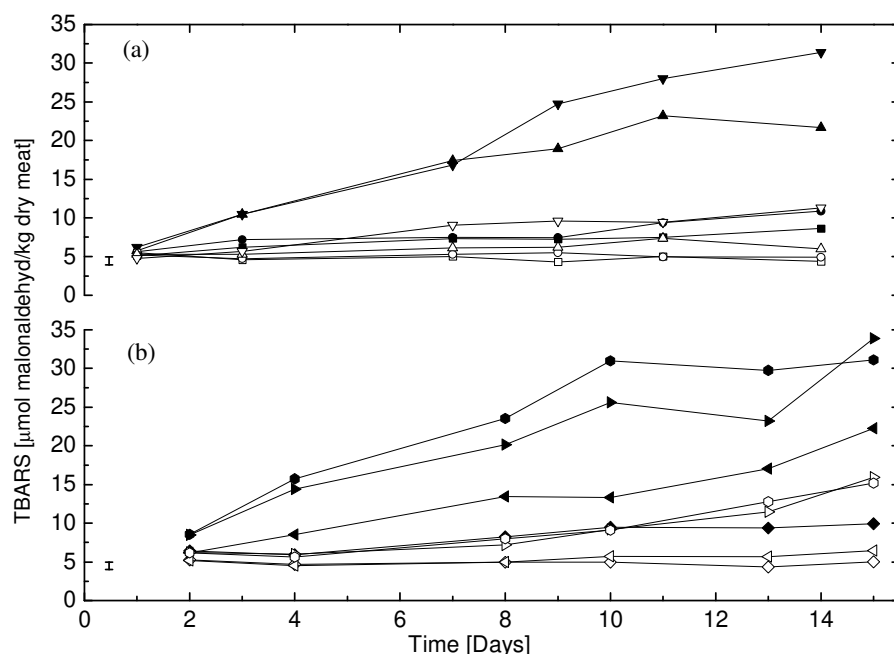


Fig. 1 Formation of secondary lipid oxidation products (TBARS) in non-pressurized or pressurized minced chicken meat with and without spice addition during subsequent chill storage in the dark: **a** *Filled square* non-pressurized without spice, *filled circle* 300 MPa without spice, *filled up triangle* 600 MPa without spice, *filled down inverted triangle* 800 MPa without spice, *open square* non-pressurized with sage, *open circle* 300 MPa with sage, *open up triangle* 600 MPa with sage, *open down inverted triangle* 800 MPa with sage, and **b** *Filled diamond* non-pressurized with garlic, *filled left triangle* 300 MPa with garlic, *filled right triangle* 600 MPa with garlic, *filled circle* 800 MPa with garlic, *open diamond* non-pressurized with sage and garlic, *open left triangle* 300 MPa with sage and garlic, *open right triangle* 600 MPa with sage and garlic, *open hexagon* 800 MPa with sage and garlic. Bar is standard deviation.

storage at 15 °C [25], and also fresh garlic, garlic powder and garlic oil showed comparable or even better antioxidant activity than BHA in raw chicken sausages stored at 3 °C [26].

A quantitative assessment of the effect of the two spices on the progression of lipid oxidation in pressure-treated chicken meat was obtained from the statistical analysis based on the adjusted means of the $\ln(\text{TBARS}/t)$ values from Fig. 1, and resulted in the following increasing order of the rate TBARS/t: sage < sage + garlic << no spice < garlic. The adjusted means yield the average rate by which TBARS changes with time in each product, and the effect of the spices on this rate is shown in Fig. 2 for increasing pressure. In conclusion, garlic acted as a prooxidant in pressure-processed chicken meat during chilled storage, while sage acted as an antioxidant.

$\ln(\text{TBARS}/t)$ increases linearly with pressure during subsequent chilled storage as seen in Fig. 2. A similar correlation was previously demonstrated for turkey meat [23], while Orlie et al. [3] established 500 MPa as a threshold pressure for whole chicken breast fillet with respect to lipid oxidation, and identified cellular membrane damage during pressure treatment as initiator of lipid oxidation. However, in the present study the mincing prior to pressure processing had already induced cellular damage in effect making the meat more prone to oxidation also at lower pressure as previously suggested by Beltran et al. [22]. It should also be noted, that the breast muscle is less oxidative in character compared to the thighs, explaining the greater importance of cellular damage for initiation of oxidation in breast muscles.

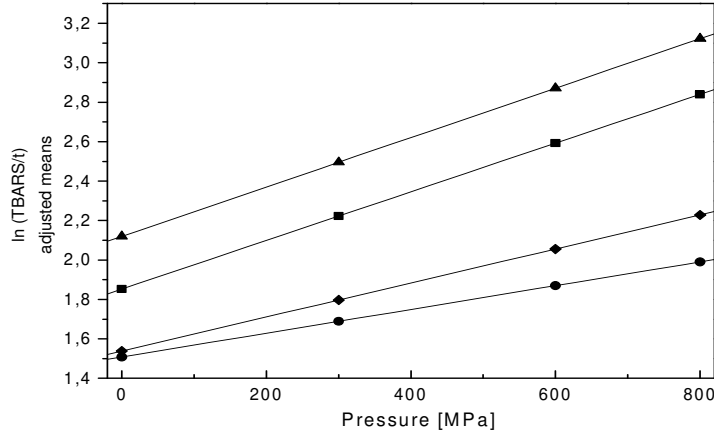


Fig. 2 Rate of development of lipid oxidation expressed as $\ln(\text{TBARS}/t)$ (adjusted means of TBARS/ t in $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) as a function of working pressure. The following relationships were obtained using linear regression analysis: *filled square* $\ln(\text{TBARS}/t) = 1.23 \cdot 10^{-3} P + 1.85$ for meat without spice, *filled circle* $\ln(\text{TBARS}/t) = 0.602 \cdot 10^{-3} P + 1.51$ for meat with sage addition, *filled up triangle* $\ln(\text{TBARS}/t) = 1.25 \cdot 10^{-3} P + 2.12$ for meat with garlic addition, and *filled diamond* $\ln(\text{TBARS}/t) = 0.862 \cdot 10^{-3} P + 1.54$ for meat with both sage and garlic addition

From the linear relationship between the logarithm of the rate of development of lipid oxidation and the pressure established (Fig. 2), the apparent volume of activation for pressure-induced lipid oxidation was obtained from [3]:

$$\ln(\text{TBARS}/t) = \text{constant} - \frac{\Delta V_{app}^{\#}}{RT} P \quad (1)$$

yielding the volume $\Delta V_{app}^{\#} = -2.8$ mL/mol for the meat without spice addition, $\Delta V_{app}^{\#} = -1.4$ mL/mol for the meat with sage addition, $\Delta V_{app}^{\#} = -2.8$ mL/mol for the meat with garlic addition, and $\Delta V_{app}^{\#} = -2.0$ mL/mol for the meat with both sage and garlic addition. The observed effects of spices on the apparent volume of activation for lipid oxidation, i.e. that sage makes $\Delta V_{app}^{\#}$ less negative, while garlic has little if any effect on $\Delta V_{app}^{\#}$, can at present not be assigned to specific elementary reactions during lipid oxidation. However, it should be noted that the prooxidative effect of garlic is not enhanced by pressure, rather is the effect of pressure and garlic additive as indicated by the same apparent volume of activation (parallel lines in Fig. 2 but different intercepts). In contrast, sage reduces both the oxidation at ambient pressure and the effect of pressure on lipid oxidation resulting in less negative $\Delta V_{app}^{\#}$ and less positive intercept. In the product with both sage and garlic present, sage reduces lipid oxidation at ambient pressure and counteracts completely the prooxidative effect of garlic, while sage only partly counteracts the effect of pressure in the presence of garlic.

High-pressure treatment of the chicken meat resulted in an altered appearance and all pressurized samples were lighter and had higher L^* values. The pressurized samples were also less red and had lower a^* values, while b^* values were not affected irrespective of presence of spices, the applied pressure, or storage time (data not shown).

α -Tocopherol and γ -tocopherol are the most important antioxidants present in chicken meat, and the content of α - and γ -tocopherol were measured prior to storage and at the last day of storage in order to evaluate the interaction between the tocopherols and added spices in the pressure-processed meat product and had values of (7.29 ± 0.02) mg/100 g meat and (0.79 ± 0.01) mg/100 g meat, respectively, for raw meat. No significant changes in the α - and γ -tocopherol contents occurred in the meat samples during the entire period of storage, except for a small decrease in the contents from the first day to the last day for α -tocopherol in chicken meat added sage and pressurized at 800 MPa, and a small decrease in the content of γ -tocopherol in chicken meat added garlic and not pressure-processed and in chicken meat added garlic and pressurized at 300 MPa (results not shown). A slightly higher initial content of α -tocopherol in the products with sage added was noted and may be caused by α -tocopherol present in sage [27].

In order to identify the mechanism behind protection of high-pressure processed chicken meat by sage and behind the prooxidative effect of garlic, the lipids and the aqueous phase of chicken meat were separated and both added spices and subsequently pressurized followed by measurement of radical formation as an early event in lipid oxidation. The tendency of radical formation was investigated in the two fractions in the presence and absence of sage and garlic by ESR spectroscopy using the spin trapping method with PBN as spin trap. The development in signal intensities of the PBN spin adducts is proportional to the concentration of radicals formed, and Fig. 3 shows the extent of pressure-induced

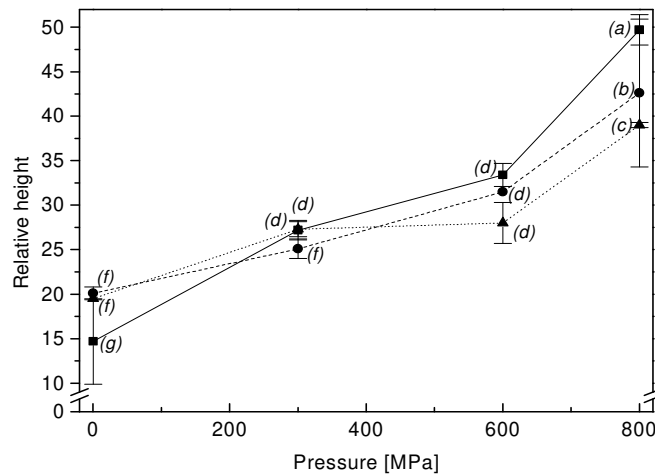


Fig. 3 The relative height of the PBN spin adducts (second line of center field doublet) in chicken lipid phase extract from meat with or without spice addition and subsequently pressurized: *filled square* meat without spice, *filled circle* meat with sage addition, and *filled triangle* meat with garlic addition. Mean values $\pm$ standard deviation of two samples. Means with different letter were significantly different ($p < 0.05$)

radical formation in the lipid phase separated from chicken meat and added sage or garlic or without spice addition and subsequently pressure-treated. Surprisingly, the addition of spice increased the amount of radicals in the non-pressurized lipid phase, an effect which could be assigned to the formation of stabilized antioxidant radicals. The pressure increased radical formation already for treatment at 300 MPa and increasingly so for higher pressures. However, no clear effect of pressure on the radical formation was observed at the intermediate pressures at 300 and 600 MPa as hardly any difference between the radical formation in the lipid phase with and without spice addition was observed. For high-pressure treatment at 800 MPa, radical formation increased significantly and resulted in significant differences

in the extent of radical formation in lipids from meat with and without spice addition as lesser formation of radicals was seen in lipids with sage or garlic added. The radical scavenging effect of spices added to the lipid phase isolated from meat and subsequently pressurized was most significant for garlic as compared to sage, suggesting that some lipophilic compounds present in garlic may act as radical scavenger during pressure-induced oxidative stress in the separated lipid phase. These compounds are apparently ineffective as antioxidants in the whole meat system or may be counteracted by oxidative events induced by garlic in the aqueous phase.

In order to establish any antioxidative and prooxidative effects of sage and garlic in the aqueous phase extracted from chicken meat and subsequently added spices and pressurized, an index was calculated as the height of the ESR signal of the PBN spin adduct for the three aqueous extracts each for different pressure-treatments relative to the height of the ESR signal for the aqueous extract without spice addition and not pressurized. As seen in Fig. 4 pressure treatment at 800 MPa induces radical formation in the aqueous extract of meat without spice addition. No clear effect of garlic is identified except for treatment at 800 MPa, where garlic reduces radical formation. Sage is clearly prooxidative in the aqueous phase independently of pressure treatment and especially at ambient pressure. Notably, the ESR spin trapping method as applied to the two types of extracts measures radical formation in the lipids and in the aqueous phase. Radical formation is significant in the lipid phase at 800 MPa and at this pressure both garlic and sage limit the radical formation in the lipid phase. However, in the

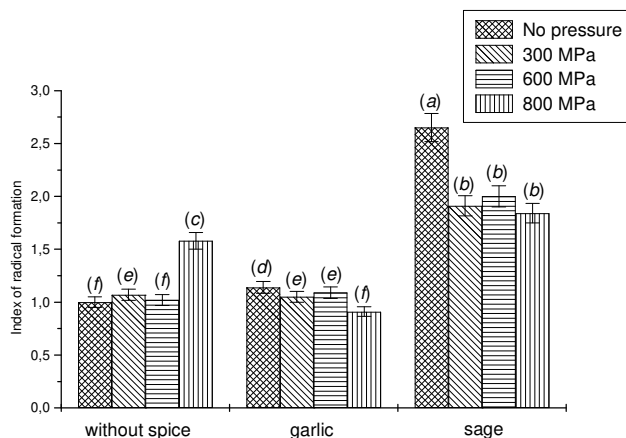


Fig. 4 Index of radical formation in the aqueous phase extracted from chicken meat and with or without addition of spices to the extracts and subsequently pressurized. The index is relative to the non-pressurized aqueous extract of meat without spice addition. Mean values $\pm$ standard deviation of three samples. Means with different letter were significantly different ($p < 0.05$).

aqueous phase, sage addition increases radical formation more than pressure treatment, while garlic has little if any effect.

The radical scavenging effect of lipophilic and hydrophilic compounds of garlic and sage were determined for hexane and aqueous extracts, respectively. The hexane extract of sage showed a good antioxidant capacity corresponding to 195 mmol DPPH/g dry sage and 103 TEAC/g dry sage when ABTS was used, while garlic extracts had almost no antioxidant capacity with 0.65 mmol DPPH/g dry garlic and 11 TEAC/g dry garlic for ABTS. For the aqueous extract, sage showed an even better radical scavenging than for the hexane extract with 246 mmol DPPH/g dry sage and 168 TEAC/g dry sage, while garlic had 0.48 mmol DDPH/g dry garlic and

no detectable TEAC. The total phenolic content of the sage and garlic was found to be 30.5 ± 0.8 and 6.60 ± 0.09 mg GAE/g dry spice, respectively. The higher phenolic content in sage seems to be due to water soluble compounds, since the aqueous extract had the highest TEAC in contrast to garlic, where TEAC is highest for the hexane extract. The effects of the two spices on the meat product and on the two extracts are summarized in Table 1. The transfer from antioxidative activity of sage in the chicken meat to prooxidative activity of aqueous extract with sage addition could be caused by a high concentration of water-soluble chlorophyll degradation products such as chlorophyllins from sage in the aqueous extract. A similar change to a prooxidative effect has been found for a green tea extract rich in chlorophyll constituents added to marine oils [28], while the same extract showed antioxidant effects in mackerel white muscles [29].

The pressure-induced lipid oxidation in meat muscle systems has been assigned to two main factors, iron released from haemoproteins or membrane disruption. However, iron release was not detected after high-pressure treatment of chicken breast muscle [3], and can accordingly not account for the increased lipid oxidation. Furthermore, no increased catalytic activity of metmyoglobin on lipid oxidation in model systems was found, indicating that pressure-induced changes in the metmyoglobin conformation, facilitating access to the catalytic heme group, is unlikely to cause increased lipid oxidation [3]. Lipid oxidation proceeds by a free radical mechanism and the membrane disruption seems to induce radical formation maybe through enzyme contact with an oxidation substrate. The pattern seen in Table 1 may help to identify the mechanism behind antioxidative protection

of lipids in high-pressure processed meat. Both garlic and sage act as radical scavengers in the isolated lipid phase at high pressure. In the aqueous phase sage act as a prooxidant, while garlic has no effect in agreement with the absence of water soluble radical scavengers in garlic. Pressure was previously concluded to initiate radical formation in the aqueous phase [3], however, the protection of the lipids depends on the lipid phase. Sage has a sufficient radical scavenging capacity available for the lipid phase in contrast to garlic. The prooxidative activity of sage in the aqueous phase seems to be less important for the meat product in which sage clearly protects the lipids against pressure-induced oxidation.

Table 1 Effect of sage and garlic on pressure-induced oxidation in chicken meat.

		Sage	Garlic
Total phenolic content (mg GAE/g dry spice)		30.5 ± 0.8	6.60 ± 0.09
Radical scavenging (TEAC/g dry spice)	Water	246	0
	Hexane	103	11
Pressure-processed meat product during storage		Antioxidant	Prooxidant
Pressure treatment of extract of meat subsequently added spice	Aqueous phase	Prooxidant	No effect
	Lipid phase	Antioxidant	Antioxidant

References

1. Leistner L (1978). Downey WK edn. In Food Quality and Nutrition. Applied Science Publishers, London, pp 153
2. Leistner L, Gould GW (2002) Hurdle technologies – combination treatments for food stability, safety and quality. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York
3. Orlie V, Hansen E, Skibsted LH (2000) Eur Food Res Technol 211:99-104
4. Beltran E, Pla R, Yuste J, Mor-Mur M (2004) Meat Sci 66:719-725
5. Wiggers SB, Kröger-Ohlsen MV, Skibsted LH (2004) Eur Food Res Technol 219:167-170
6. Bragagnolo N, Danielsen B, Skibsted LH (2006) Eur Food Res Technol 223:669-673
7. Madsen HL, Bertelsen G (1995) Trends Food Sci Technol 6:271-277
8. Bragagnolo N, Danielsen B, Skibsted LH (2005) Eur Food Res Technol 221:610-615
9. Bragagnolo N, Danielsen B, Skibsted LH (2007) Innovative Food Sci Emerging Technol 8:24-29
10. Okada Y, Tanaka K, Sato E, Okajima H (2006) Org Biomol Chem 4:4113 – 4117
11. Yang GC, Yasaei PM, Page SW (1993) J Food Drug Anal 1: 357–364
12. Moreno FJ, Corzo-Martínez M, Castillo MD, Villamiel M (2006) Food Res Int 39:891–897
13. Vyncke, W (1970) Fette Seifen Anstrichm 72:1084–1087
14. Vyncke, W (1975) Fette Seifen Anstrichm 77:239–240
15. Sørensen G, Jørgensen SS (1996) Z Lebensm Unter Forsch 202:205–210

16. Jensen C, Guidera J, Skovgaard IM, Staun H, Skibsted LH, Jensen SK, Møller AJ, Buckley J, Bertelsen G (1997) *Meat Sci* 45:491–500
17. Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) *J Biol Chem* 226:497-509
18. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237
19. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) *Lebensm Wiss Technol* 28:25-30.
20. Singleton, VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) *Meth Enzymol* 299:152-178
21. StatSoft, Inc. (2000) *STATISTICA for Windows* [Computer program manual].
<http://www.statsoft.com>
22. Beltran E, Pla R, Yuste J, Mor-Mur M (2003) *Meat Sci* 64:19-25
23. Dissing J, Bruun-Jensen L, Skibsted LH (1997) *Z Lebensm Unters Forsch A* 205:11-13
24. Wong PYY, Kitts DD (2002) *Food Chem* 76:197-205
25. Yin MC, Cheng WS (2003) *Meat Sci* 63:23-28
26. Sallam KI, Ishloroshi M, Samejima K (2004) *Lebensm Wiss Technol* 37:849-855
27. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2006) *USDA Data Base for Standard Reference – Release 19. Nutrient Data Laboratory Home Page*.
<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndll>
28. Wanasundara UN, Shahidi F (1998) *Food Chem* 63:335-342
29. He Y, Shahidi F (1997) *J Agric Food Sci* 45:4262-4266

CONCLUSÃO GERAL

A utilização de planejamentos experimentais sequenciais possibilitou o desenvolvimento e a otimização da metodologia para a determinação simultânea de colesterol e 11 óxidos de colesterol (COP) em frango, empregando um pequeno número de experimentos. Na aplicação da metodologia, os óxidos de colesterol 22*R*-, 24*S*- e 22*S*-hidroxicolesterol foram detectados pela primeira vez em peito de frango preparado através de diferentes métodos de cocção: cozido em água, frito em óleo de soja, assado em forno convencional e em forno elétrico giratório. Além destes, foram detectados o 7-cetocolesterol, 5,6β-epoxicolesterol, 7β-, 7α- e 25-hidroxicolesterol, sendo que a confirmação de identidade de todos os óxidos foi realizada por HPLC-APCI-MS. Os teores de COP total encontrados no peito de frango foram mais elevados que os previamente encontrados na literatura, sugerindo que a ingestão de óxidos de colesterol pode estar sendo subestimada e que estudos são necessários para estimar os valores reais de COP ingeridos.

A metodologia para determinação de hexanal, pentanal e malonaldeído por microextração em fase sólida (SPME) utilizando fibras DVB/CAR/PDMS foi otimizada para monitorar a oxidação lipídica de carne de frango crua e grelhada durante o armazenamento a -18°C por 90 dias. Os coeficientes de variação obtidos com a utilização do método otimizado foram baixos para este tipo de técnica, 12,5% para o malonaldeído, 9,6% para o pentanal e 8,9% para o hexanal.

A metodologia otimizada é simples, rápida e não requer o uso de solventes para a extração dos aldeídos voláteis.

A adição de 0,1% de alho em peito de frango apresentou comportamento variável de acordo com a metodologia analítica utilizada para a avaliação da oxidação lipídica, sugerindo que o alho não tem efeito antioxidante nesta matriz, podendo até mesmo acelerar a oxidação lipídica durante o armazenamento a -18°C. Nesta mesma concentração, o alho agiu como fator pró-oxidante em peito de frango submetido à alta pressão durante o armazenamento a 5°C por 15 dias.

A adição de 0,1% de sálvia em peito de frango foi eficaz em minimizar e retardar a oxidação dos lipídios e do colesterol durante o processamento térmico e o armazenamento a -18°C, sendo capaz de reduzir os efeitos pró-oxidantes da adição de 0,5% de sal. Nesta mesma concentração, a sálvia também teve ação antioxidante em peito de frango submetido à alta pressão durante o armazenamento a 5°C por 15 dias. Quando 0,1% de sálvia foi usada em conjunto com 0,1% de alho em peito de frango submetido à alta pressão e armazenado a 5°C por 15 dias, a sálvia foi capaz de contrapor parcialmente a ação pró-oxidante do alho.

Utilizando a espectroscopia de ressonância paramagnética (ESR) para avaliar a formação de radicais livres em sistema modelo de carne de frango com sálvia e alho submetidos à alta pressão foi possível verificar que o principal mecanismo do efeito protetor da sálvia é a sua capacidade de desativar os radicais livres na fase lipídica.