

FABÍOLA ALIAGA DE LIMA
Bacharelado e Licenciatura Plena em Ciências Biológicas

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE URUCUM E COENTRO NA
FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL DURANTE O
TRATAMENTO TÉRMICO E ARMAZENAMENTO DE PESCADA
BRANCA**

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

Orientadora: Prof. Dra. Neura Bragagnolo

CAMPINAS
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

L628i Lima, Fabíola Aliaga
Influência da adição de urucum e coentro na formação de óxidos de colesterol durante o tratamento térmico e armazenamento de pescada branca / Fabíola Aliaga Lima. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

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

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

(cars/fea)

Titulo em inglês: Influence of the addition of coriander and annatto in the formation of cholesterol oxides during thermal treatment and storage of white hake

Palavras-chave em inglês (Keywords): Cholesterol oxides, Storage, Thermal treatment, Natural Antioxidants, White hake

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Neura Bragagnolo

Lílian Regina Barros Mariutti

Adriana Zerlotti Mercadante

Data de defesa: 29/03/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMIDADORA

Profa. Dra. Neura Bragagnolo
(orientadora)

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
(Membro Titular)

Dra. Lilian Regina Barros Mariutti
(Membro Titular)

Profa. Dra. Mônica Roberta Mazalli
(Membro Suplente)

Profa. Dra. Sueli Regina Baggio
(Membro Suplente)

Dedico este trabalho

Aos meus amados

Pais Helena e Antonio Flavio (in memória),

Irmãos Fabrício, Fabiana e Fabiele,

Sobrinho querido Huguinho e

Namorado Reinaldo

AGRADECIMENTOS

A Deus pela Sua presença viva em minha vida.

À minha mãe querida pelas orações dedicadas a mim, por seu amor e incentivo. E ao meu querido pai, em memória, por todo bom exemplo que deixou para mim de honestidade, amor e perseverança.

Aos meus irmãos Fabrício, Fabiana e Fabiele, cunhados Ana e Arnaldo e meu amado sobrinho Huguiño pelo amor, apoio e solidariedade.

Ao meu querido namorado Reinaldo por todo apoio nos momentos mais difíceis e também nos momentos alegres, por todo amor e companheirismo em minha vida.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e especialmente ao Laboratório de Química de Alimentos, onde desenvolvi este trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Neura Bragagnolo pela orientação, pela amizade e por todo incentivo e motivação ao longo desses dois anos.

À banca examinadora pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Adriana Zerlotti Mercadante e a Lilian Regina Barros Mariutti pelo apoio, amizade e contribuição para o meu desenvolvimento científico.

À querida Gislaine por todo apoio, aprendizado, paciência e amizade.

À minha grande amiga Renata com quem partilhei os melhores momentos deste mestrado e também as grandes dificuldades nas bancadas e fora a delas também.

Aos queridos amigos de laboratório Viviane, Poliana, Marcela, Adélia, Méry, Renan, Gabriel, Bruno, Fernanda, Naira, Elizeu, Ana Augusta, Aline, Milena, Lilian, Leila, Michele, Rosemar, Karla e a todos que passaram pelas bancadas desta 'vida de laboratório' e deixaram sua marca.

À Graciela minha querida amiga que me apoiou e incentivou durante a elaboração da dissertação e pelos ótimos momentos que partilhamos em nosso convívio diário.

Aos meus amigos Ewerton, Gustavo, Madla, Bruno, Pablo, Cinthia, Aline, Ana Luiza, Evandro, Grethel, Adrielly, Vanessa, Lilian (Lilica), Ricardo, Fred, Álvaro que sempre estiveram ao meu lado e compartilharam os momentos bons e àqueles nem tão bons.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho

Muito obrigada.

Fabíola A. Lima

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo.”
Fernando Pessoa

RESUMO

Pescados são alimentos ricos em ácidos graxos poli-insaturados, os quais são extremamente suscetíveis à oxidação, originando principalmente radicais livres e hidroperóxidos que aceleram o processo oxidativo do colesterol, ocasionando a formação de óxidos de colesterol. Estes óxidos são mais prejudiciais à saúde do que o próprio colesterol, pois aumentam o risco do aparecimento de doenças cardiovasculares e ainda favorecem uma série de efeitos biológicos indesejáveis tais como inflamações, artrite reumatóide e citotoxicidade. O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar o efeito protetor de antioxidantes naturais na oxidação do colesterol em pescada branca (*Cynoscion spp*). O filé de pescada adquirido no comércio local de Campinas foi moído em processador doméstico até a obtenção de uma massa homogênea, a qual foi pesada e dividida em quatro partes. Uma parte foi considerada controle sem adição de antioxidantes e as outras três foram adicionadas de 0,1% de urucum, 0,5% de coentro e 0,1% de urucum mais 0,5% de coentro. Foram moldadas almôndegas de 50 ± 2 g, embaladas em filmes de polietileno de baixa densidade (6 μm de espessura) e congeladas em freezer a -18 °C por 120 dias e analisadas nos dias zero, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 de armazenamento. Uma parte das amostras foi analisada crua e outra após o cozimento em água fervente a 96 ± 2 °C por 30 minutos, até que a temperatura interna atingisse 91 ± 2 . As análises de óxidos de colesterol e de colesterol durante o armazenamento e após o tratamento térmico foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detectores de UV e índice de refração. A identificação dos óxidos de colesterol foi feita por (HPLC) e a confirmação desses óxidos realizada por detector de espectrometria de massas (HPLC-MS/MS). Foi realizada a análise dos teores de lipídios totais no tempo zero para caracterizar a amostra e de umidade em todos os tempos para expressar os resultados em base seca. Três óxidos de colesterol, 7-cetocolesterol, 7 β -hidroxicolesterol e 7 α -hidroxicolesterol foram identificados e quantificados durante o armazenamento e tratamento térmico, além disso foram identificados os epóxidos 5,6 α - e 5,6 β -epoxicolesterol pelo HPLC-MS/MS. O tratamento térmico não alterou os teores de óxidos de colesterol. Durante o armazenamento, as amostras adicionadas de condimentos e controle apresentaram um aumento no teor de óxidos de colesterol. No entanto, não houve diferença significativa

entre as amostras controle e tratadas, indicando que a oxidação foi equivalente em todas as amostras.

Palavras-chave: pescada branca, antioxidantes naturais, óxidos de colesterol, tratamento térmico, armazenamento.

SUMMARY

Fish meat is a good source of polyunsaturated fatty acids, which are compounds extremely susceptible to oxidation. This process originates free radicals and peroxides, which can accelerate the oxidative process of cholesterol, causing formation of cholesterol oxides. These compounds are more harmful than cholesterol regarding heart diseases, and are also related to some biological effects like inflammation, rheumatoid arthritis and cytotoxicity. The main goal of the present study was the evaluation of the protective effect of natural antioxidants on cholesterol oxidation in white fish (*Cynoscion* spp). Fish fillet was acquired in a local store in Campinas and was grinded in a domestic food processor to obtain a homogeneous mass. The fish was then weighted and divided in four portions: control without any spice, spiced with annatto (0.1%), spiced with coriander (0.5%) and spiced with both [annatto (0.1%) plus coriander (0.5%)]. Fish meatballs of 50 ± 2 g were molded, packed in low density polyethylene film (thickness 6 μ m) and stored frozen at -18 °C for 120 days. Samples were analysed at 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 days of storage. Part of the samples was analyzed raw and another part after cooking in boiling water at 96 ± 2 °C for 30 minutes, until the core temperature reached 91 ± 2 °C. Cholesterol oxides analysis during storage and after heat treatment was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to UV and refractive index detectors. Cholesterol oxides identification was performed by HPLC and the confirmation of these oxides was analyzed by high-performance liquid chromatography with a mass spectrometer detector (HPLC-MS/MS). Total lipids were determined at day zero in order to characterize the sample, and moisture content was assayed at all times to express the results in dry weight. Three cholesterol oxides, 7-cetocholesterol, 7 β -hydroxycholesterol and 7 α -hydroxycholesterol were identified and quantified during storage and heat treatment, and also, epoxides 5,6 α - and 5,6 β -epoxicholesterol were identified by HPLC-MS/MS. Heat treatment did not change cholesterol oxides content. During storage, spicy and control samples have presented an increase of cholesterol oxides content. However there was no statistical significant difference among control and treated groups, indicating that all samples have oxidized equally.

Key words: white hake, natural antioxidant, cholesterol oxides, thermal treatment, storage.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Composição da carne de peixe	3
2.2. Colesterol e óxidos de colesterol	7
2.3. Efeito do tratamento térmico na formação de óxidos de colesterol	13
2.4. Influência do armazenamento em produtos marinhos	16
2.5. Antioxidantes	18
2.5.1. Coentro	20
2.5.2. Urucum	23
2.5.3. Antioxidantes em peixes	25
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. MATERIAL	26
4.1.1. Preparo das amostras	26
4.1.2. Reagentes	27
4.2. MÉTODOS	27
4.2.1. Caracterização do coentro	27
4.2.2. Determinação de bixina	29
4.2.3. Teor de lipídios totais e umidade	30
4.2.4. Quantificação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol	30
4.2.5. Análise estatística dos dados	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Caracterização do coentro	32

5.2. Comportamento da bixina durante o armazenamento e tratamento térmico em pescada branca	33
5.3. Teores umidade e de lipídios totais	36
5.4. Colesterol	38
5.5. Efeito do armazenamento e tratamento térmico na formação dos óxidos de colesterol	42
6. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma extensa área geográfica litorânea e continental e é reconhecido pela riqueza de sua biodiversidade aquática. Dados fornecidos pelo IBAMA estimam que a produção de pescado no país em 2007 foi de 1.072.226 toneladas correspondendo a 3.603.726.475,00 reais. Do ano de 2006 para 2007 o país apresentou um crescimento relativo na produção de pescado em torno de 2%, porém a balança comercial registrou saldo negativo de 251,1 milhões de dólares resultado da diferença entre as exportações e as importações (IBAMA, 2007).

De acordo com os dados do IBAMA (2007) os principais países que importam pescado do Brasil são Estados Unidos, França, Espanha, Portugal e Japão. A Noruega, Chile, Argentina, Uruguai e Marrocos estão entre os principais fornecedores de pescado ao Brasil. Estes dados revelam o paradoxo entre a vasta diversidade brasileira de pescados e produtos marinhos e a deficiência em se utilizar este recurso de forma sustentável a conseguir que esta atividade pesqueira aumente o PIB (Produto Nacional Bruto) brasileiro através da sua exportação e estimulação do consumo interno.

O consumo de peixe recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) é de 14 kg/ano/habitante, sendo que no Brasil, este valor não ultrapassa 7 kg/ano/habitante, porém, houve um pequeno aumento do consumo per capita de pescado (7,29%) que passou de 6,29 kg/habitante em 2006 para 6,75 kg/habitante em 2007 (FAO, 2002; IBAMA, 2007). Esta distribuição é bastante heterogênea em todas as regiões do país, as cidades costeiras são as que apresentam maior consumo pela facilidade de obtenção do produto fresco. O custo do pescado ainda é alto e isto é mais um desincentivo ao consumo em muitas regiões brasileiras. Embora, a Secretaria Especial da Aquicultura e Pesca em 2005 tenha negociado com os fornecedores para promover a semana nacional do peixe, na qual o preço alcançou um real o quilo com descontos de até 50% do valor de mercado com o objetivo de estimular o consumo do pescado no país.

Atualmente o governo federal está implementando a inserção do peixe e produtos marinhos no cardápio da rede pública de ensino devido às propriedades funcionais destes produtos. O peixe é uma fonte proteica de qualidade pelo seu alto valor nutritivo possibilitando o acesso dos aminoácidos ao organismo. Também é uma

rica fonte de ácidos graxos poli-insaturados que fornece muitos benefícios à saúde como a diminuição do risco de doenças cardíacas, a prevenção do desenvolvimento de alguns cânceres, e o fortalecimento do sistema imunológico (OKLAND et al, 2005; ZAMARIA, 2004). No entanto, os ácidos graxos são compostos muito instáveis devido a suas moléculas apresentarem ligações duplas que se tornam suscetíveis à oxidação provocada pela luz, calor, oxigênio, metais e enzimas oxidativas, iniciando o processo de autooxidação e/ou oxidação enzimática.

O colesterol participa da composição dos produtos marinhos e como tal, é um componente importante da membrana celular, participa do metabolismo de hormônios esteróides e da síntese de sais biliares e de vitaminas lipossolúveis no organismo animal, assim como no metabolismo humano. O colesterol pode estar na forma livre ou esterificado com ácidos graxos insaturados e saturados tanto de cadeia curta como longa (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007; WASOWICZ, 2003) e apresenta em sua estrutura uma insaturação que pode, assim como nos ácidos graxos, oxidar formando os óxidos de colesterol, pela via enzimática ou autocatalítica. Os produtos da oxidação do colesterol oferecem riscos à saúde, devido seu alto potencial carcinogênico, aterogênico, mutagênico e citotóxico (BÖSINGER; LUF; BRANDL, 1993). As doenças coronarianas têm sido relacionadas a níveis elevados do colesterol na forma LDL-colesterol oxidado no plasma sanguíneo, desencadeando um processo de ateroma do vaso sanguíneo (GUARDIOLA et al., 1995)

O tratamento térmico e a armazenagem sob refrigeração ou congelamento podem contribuir para a formação dos produtos de oxidação do colesterol. O aquecimento é um dos fatores que mais contribui para a oxidação de acordo com o trabalho de Shozen, Ohshima e Ushio (1995), embora o armazenamento seja um fator importante a ser considerado (SALDANHA et al., 2006). Os principais óxidos de colesterol detectados em peixes são os provenientes da cadeia lateral 20 α -hidroxicolesterol, 22R-hidroxicolesterol, 22S-hidroxicolesterol, 24-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e 26-hidroxicolesterol e os originados do núcleo esteróide 7 β -hidroxicolesterol, 7 α -hidroxicolesterol, 5,6 α -epoxicolesterol, 5,6 β -epoxicolesterol, 7-cetocolesterol, colestanoetriol e 19-hidroxicolesterol (SALDANHA et al., 2006; SHOZEN; OHSHIMA; USHIO, 1995).

A utilização de antioxidantes tem sido uma das medidas mais promissoras para se evitar o processo oxidativo, porém os antioxidantes sintéticos apresentam alto custo, dificuldade de solubilização no alimento, podem modificar o sabor dos produtos, e ainda há indícios que possam causar efeitos nocivos à saúde humana (WITSCHI; LOCK, 1978). Por esses motivos, a indústria de alimentos tem buscado alternativas para minimizar estas desvantagens ocasionadas pelos aditivos sintéticos fazendo uso de antioxidantes naturais obtidos de especiarias e ervas. Dessa forma são atendidas as exigências dos consumidores que optam por hábitos mais saudáveis através do consumo de produtos naturais.

Tendo em vista a importância do peixe na dieta devido às suas propriedades funcionais bem como sua suscetibilidade à oxidação lipídica, a qual pode interferir nestas propriedades, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito dos antioxidantes naturais, urucum e coentro sobre o colesterol em pescada branca frente à oxidação e consequente formação dos seus produtos da oxidação provocada pelo armazenamento em freezer e subsequente tratamento térmico.

Os objetivos específicos foram: (1) Acompanhar o efeito dos condimentos, urucum, coentro, e a combinação destes no processo oxidativo da pescada submetida ao armazenamento a -18°C e cozimento em água fervente monitorando a formação de óxidos de colesterol e a degradação do colesterol; (2) Identificar os produtos de degradação do colesterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e confirmar a identidade desses compostos por espectrometria de massas (HPLC-MS/MS); (3) Verificar a ação sinérgica entre urucum e coentro como antioxidantes; (4) Determinar o teor de umidade e lipídios totais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Composição da carne de peixe

O músculo de peixe é uma fonte de aminoácidos e proteínas facilmente digeríveis. Os aminoácidos livres apresentam um papel fundamental no metabolismo do peixe, assim como na pressão osmótica e como uma fonte energética (VENUGOPAL; CHAWLA; NAIR, 1996).

O músculo de peixes comparativamente ao músculo de animais terrestres apresenta menos fibras musculares, pois a sua estrutura necessita apenas ser suportada pela massa de água (HULTIN, 1985). Dessa forma, as proteínas dos peixes apresentam alta capacidade de retenção de água, o que lhes possibilita a habilidade de manter-se na água contra a força gravitacional (OKLAND et al., 2005). A maciez da carne de peixe é atribuída a menores quantidades de tecido conectivo em sua composição (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

A composição proteica nos músculos varia de acordo com o tipo de tecido muscular que pode ser estriado, liso ou cardíaco. O músculo estriado é o mais comum em peixe o qual proporciona a sua forma. O músculo pode ainda ser caracterizado como carne branca e carne escura (SUZUKI, 1981). A carne branca contém menos lipídios que a carne escura e apresenta em sua composição de 18 a 23% de proteína dependendo da espécie e da maneira como foi pescado (SUZUKI, 1981). A variação no conteúdo proteico é observada entre as espécies, e há uma relação entre a composição e a profundidade em que se encontra, pois animais que vivem em ambientes de maior profundidade a mais de 2000m apresentam maior teor de N-óxido de trimetilamina (TMAO) que neutralizam a pressão hidrostática nos tecidos mantendo a integridade muscular (YANCEY; BLAKE; CONLEY, 2002). Okland et al. (2005) ao analisar o perfil proteico de peixes encontraram a lisina como aminoácido majoritário e quantidades significativas de asparagina, glutamina, arginina e leucina.

Há diferença na composição de ácidos graxos poli-insaturados em peixes de água doce e peixes marinhos. Esta diferença é atribuída possivelmente à alimentação a que estes peixes têm acesso, pois os peixes de água doce se alimentam de vegetais que lhes estão disponíveis, enquanto que os peixes marinhos se alimentam do plâncton que é constituído de fitoplâncton e zooplâncton, ricos em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (OSMAN; SURIAH; LAW, 2001). As microalgas são fontes ricas em AGPI, principalmente o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Assim, os peixes que se alimentam dessas algas apresentam em sua constituição esses AGPI, e o homem como parte desta cadeia alimentar, consegue obter esses ácidos graxos através da ingestão de peixes marinhos (BROWN et al., 1997).

Shirai, Terayama e Takeda (2002) verificaram que o perfil lipídico de peixes, está intimamente relacionado com a sazonalidade e o consumo do plâncton, uma vez que observaram que o perfil lipídico de sardinha japonesa (*Sardinops melanostictus*) variou ao longo de cada época do ano, sendo o mês de fevereiro (inverno) o que apresentou o menor teor de lipídios (1,8%), e o maior teor (7,2%) foi encontrado no verão (julho a setembro). Também observaram que a composição dos ácidos graxos nestas sardinhas no mês de julho foi muito semelhante a composição de ácidos graxos presentes no plâncton no mesmo período. O conteúdo de histidina livre no músculo de sardinha japonesa foi maior quando o teor lipídico também foi maior, isto sugere que a composição de ácidos graxos no músculo de peixe e a alta concentração de aminoácidos livres sejam influenciados pela ingestão e pela variação sazonal da composição do plâncton.

Os peixes são fontes ricas em ácidos graxos poli-insaturados, principalmente da família ômega-3 (n-3), EPA e DHA. Estes oferecem benefícios à saúde prevenindo doenças como aterosclerose, diabetes, hipertensão e o desenvolvimento de alguns tumores (BURR, 1992; ZAMARIA, 2004). Okland et al. (2005) analisaram peixes elasmobrânquios e teleósteos e observaram que o EPA e DHA representaram cerca de 32-52% do total de ácidos graxos das espécies estudadas, sendo que o DHA representou de 30 a 40% da gordura total dos peixes. Os autores ainda observaram que dos ácidos graxos da família ômega-6 (n-6), o ácido araquidônico foi o predominante. A razão entre os AGPI n-3 (EPA e DHA) e os ácidos graxos pertencentes à família n-6 variou de 5,5 a 7,5 dentre as espécies estudadas, sugerindo como ótima fonte nutricional pela constituição lipídica dos peixes marinhos.

Os ácidos graxos essenciais como o ácido linoleico e linolênico são importantes na dieta humana, pois afetam a fluidez, a flexibilidade e permeabilidade das membranas, e ainda são precursores de eicosanóides como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, atuam como mensageiros das células e participam da regulação metabólica (GIL, 2002).

Entre os lipídios estudados por Okland et al. (2005) os fosfolipídios foram predominantes nas dez das espécies avaliadas, dentre elas, peixes cartilagosos e teleósteos. Porém, foram observados diferenças entre os teleósteos e cartilagosos.

Os teleósteos apresentaram maior teor de ácidos graxos livres e colesterol que os cartilagenosos. A presença desse alto teor de ácidos graxos livres pode ser proveniente da degradação lipídica.

Ackman (1989) sugere que os peixes sejam agrupados de acordo com o teor lipídico em sua composição: magro (< 2%), baixo teor de gordura (2-4%), médio teor de gordura (4-8%) e alto teor de gordura (> 8%). Segundo Shozen, Ohshima e Ushio (1995), os peixes gordurosos apresentam altos teores de triacilglicerídeos, enquanto que os peixes magros apresentam maior quantidade de fosfolipídios em sua musculatura. A pescada branca se enquadra na categoria de peixes com baixo a médio teor de gordura, pois apresenta teor de lipídios de 4,6% como descrito na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006) (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição centesimal, cálcio e colesterol de pescada branca por 100 g de parte comestível.

Pescada	Umidade (g)	Energia (kcal)	Energia (kJ)	Proteína (g)	Lipídio (g)	Colesterol (mg)	Cinzas (g)	Cálcio (mg)
Crua	79,6	111	464	16,3	4,6	51	0,9	16
Frita	57	223	933	27,4	11,8	165	3,2	378

Referência: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006).

O teor de colesterol em peixes pode variar de acordo com as partes analisadas como as víceras (1080 mg/100g), peles (2414 mg/100g), ovas (111 mg/100g), músculo escuro (1247 mg/100g) rico em mioglobina e músculo branco (15 a 265 mg/100g) (TESHIMA,1992). Os minerais tais como, fósforo, cálcio e ferro estão presentes na composição dos peixes sendo que o fósforo estão em maior concentração em peixes magros (250 g/100g de tecido). As vitaminas A e D são encontradas em altos níveis na musculatura dos peixes de alto teor de gordura (acima de 15%), enquanto nos demais peixes estas vitaminas são mais elevadas somente no fígado (GERMANO; GERMANO; OLIVEIRA, 2008).

2.2 Colesterol e óxidos de colesterol

No reino animal o colesterol é o principal lipídio esteróide, embora possa estar presente em algas e em pequenas quantidades em plantas (WASOWICZ, 2003). Este esterol é produzido de forma endógena no fígado, no córtex adrenal, no intestino, nos testículos, na aorta, na pele ou é adquirido pela via exógena pela alimentação. A biossíntese do colesterol envolve muitas etapas e reações, onde o colesterol é sintetizado pela ação da enzima acil-CoA-colesterol-aciltransferase a partir da molécula de acetil-CoA (2C), a qual se converte em mevalonato (6C) pela HMG-redutase. O mevalonato, após sucessivas reações, é convertido em unidades de isoprenos ativados que polimerizam formando uma estrutura de 30C, o escaleno, o qual sofrerá ciclização e formará os quatro anéis do núcleo esteróide através de uma série de reações, incluindo oxidações, remoção e migração de grupos metila, finalizando com a formação do colesterol. A biossíntese é responsável por 75% do colesterol presente nos níveis plasmáticos enquanto apenas 25% são oriundos a partir da dieta (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007).

Este esterol é imprescindível à sobrevivência do organismo, visto que está presente em quase todas as membranas das células animais e intimamente associado aos fosfolipídios (PANIANGVAIT et al., 1995), participa da síntese dos sais biliares que facilita a absorção de gordura no intestino, apresenta-se como um precursor de hormônios esteróides produzidos no córtex da glândula supra-adrenal (cortisol e aldosterona), hormônios sexuais (progesteronas) e da vitamina D (BRAGAGNOLO, 2009), além de participar do metabolismo das vitaminas lipossolúveis (K, A, D, E).

As lipoproteínas se ligam ao colesterol e exercem a função de transportá-lo do sangue para os tecidos e vice-versa. As principais lipoproteínas existentes no organismo são as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que transportam o colesterol para o sangue e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) que fazem o caminho inverso, retirando o colesterol da corrente sanguínea para os tecidos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007). Doenças coronarianas como a aterosclerose, muito provavelmente são desencadeadas pela LDL-colesterol oxidada (GUARDIOLA et al., 1995).

O colesterol ($C_{27}H_{46}O$) apresenta um núcleo esteróide formado pela união de quatro anéis policíclicos (A, B, C, D) com uma insaturação no anel B na posição C5 e C6, uma função álcool (-OH) na posição C3 do anel A, grupos metilas (-CH₃) nas posições C10 e C13, e uma cadeia alifática no C17, comumente denominada cadeia lateral enumerada do C20 ao C27 constituída de 8 carbonos (Figura1).

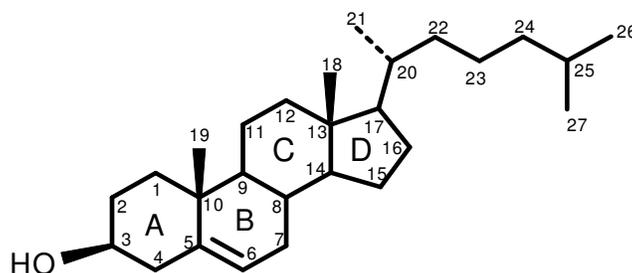


Figura 1 – Estrutura do colesterol

A insaturação no anel B entre os C5 e C6 torna a molécula do colesterol suscetível à oxidação pela ação de agentes físicos e químicos, tais como, o oxigênio, a luz, o calor, a presença de metais, de fotossensibilizadores e radicais livres (SMITH,1987; WASOWICZ, 2003), bem como os carbonos terciários C20 e C25. A oxidação do colesterol é muito similar à oxidação lipídica e ocorre preferencialmente no C7 alílico à ligação dupla do anel B, pois esta reação é favorecida devido à menor energia de ativação para a abstração do hidrogênio (WASOWICZ, 2003). Outros produtos de oxidação podem ser formados a partir da molécula do colesterol tanto no anel A como na cadeia lateral (PANIANGVAIT et al., 1995; SMITH, 1996). Já foram descritos 80 diferentes produtos de oxidação do colesterol (PANIANGVAIT et al., 1995; SMITH, 1996).

Além disso, em humanos e animais pode ocorrer a oxidação deste esterol através da ação de enzimas inerentes ao metabolismo. Desta forma, o mecanismo de oxidação do colesterol pode acontecer pela autooxidação e/ou pela via enzimática e os principais produtos formados são apresentados nas Figuras 2 e 3. Os óxidos de colesterol formados são muito similares a estrutura do próprio colesterol com adição de

grupos hidroxila, cetona ou epóxido no núcleo do esterol, e/ou grupos hidroxila na cadeia lateral (WASOWICZ, 2003).

Os hidroperóxidos 7 α -hidroperoxicolesterol (7 α -HPC) e 7 β -hidroperoxicolesterol (7 β -HPC) são os primeiros radicais a se formar durante a oxidação do colesterol, pois o carbono C7 é muito suscetível à oxidação. Quando o colesterol é submetido a temperaturas elevadas por muito tempo (160°C por horas) o 7-cetocolesterol (7-ceto) é o óxido predominante a ser formado. Os 7-hidroxicolesteróis (7 β -OH e 7 α -OH) são formados dos seus hidroperóxidos correspondentes, 7 α -HPC e 7 β -HPC (Smith, 1987) (Figura 2).

Os epímeros 5,6 α -epóxicolesterol e 5,6 β -epóxicolesterol são formados a partir do ataque das espécies reativas de oxigênio (ROS) como radicais peroxila (ROO \cdot), alcoxila (RO \cdot) e hidroxila (HO \cdot), ozônio (O₃) e peróxidos de hidrogênio (H₂O₂) à ligação dupla do colesterol (ROSE-SALLIN et al., 1996; SMITH, 1996). Lercker e Rodriguez-Estrada (2002) sugerem que a formação do 5,6 β -epóxi prevalece sobre o 5,6 α -epóxi devido ao impedimento estérico do grupo OH na posição C3. O colestanoetriol pode ser formado a partir da hidratação dos epoxicolesteróis em meio ácido (OHSHIMA et al., 1996) (Figura 2).

A oxidação da cadeia lateral gera hidroperóxidos na posição 20, 24, 25 e 26 e seus correspondentes produtos de decomposição 20 α -OH, 24-OH, 25-OH e 26-OH como descrito por Smith (1987) (Figura 3).

A oxidação enzimática é um processo que ocorre naturalmente no metabolismo envolvendo enzimas oxidativas para a formação dos óxidos de colesterol, que são produtos intermediários da síntese de sais biliares e de hormônios sexuais (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007). As enzimas do citocromo P-450 são as principais enzimas envolvidas na oxidação do colesterol no fígado. A síntese dos sais biliares é mediada pelas enzimas colesterol-7 α -hidroxilase e 26-hidroxilase, esta última, apresenta-se ativa em diversas células como fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, cerebrais e do fígado. Na biossíntese da aldosterona, hormônio esteróide-C-21 formam-se os óxidos da cadeia lateral 20 α -OH e 22-OH e o colestanoetriol (WASOWICZ, 2003).

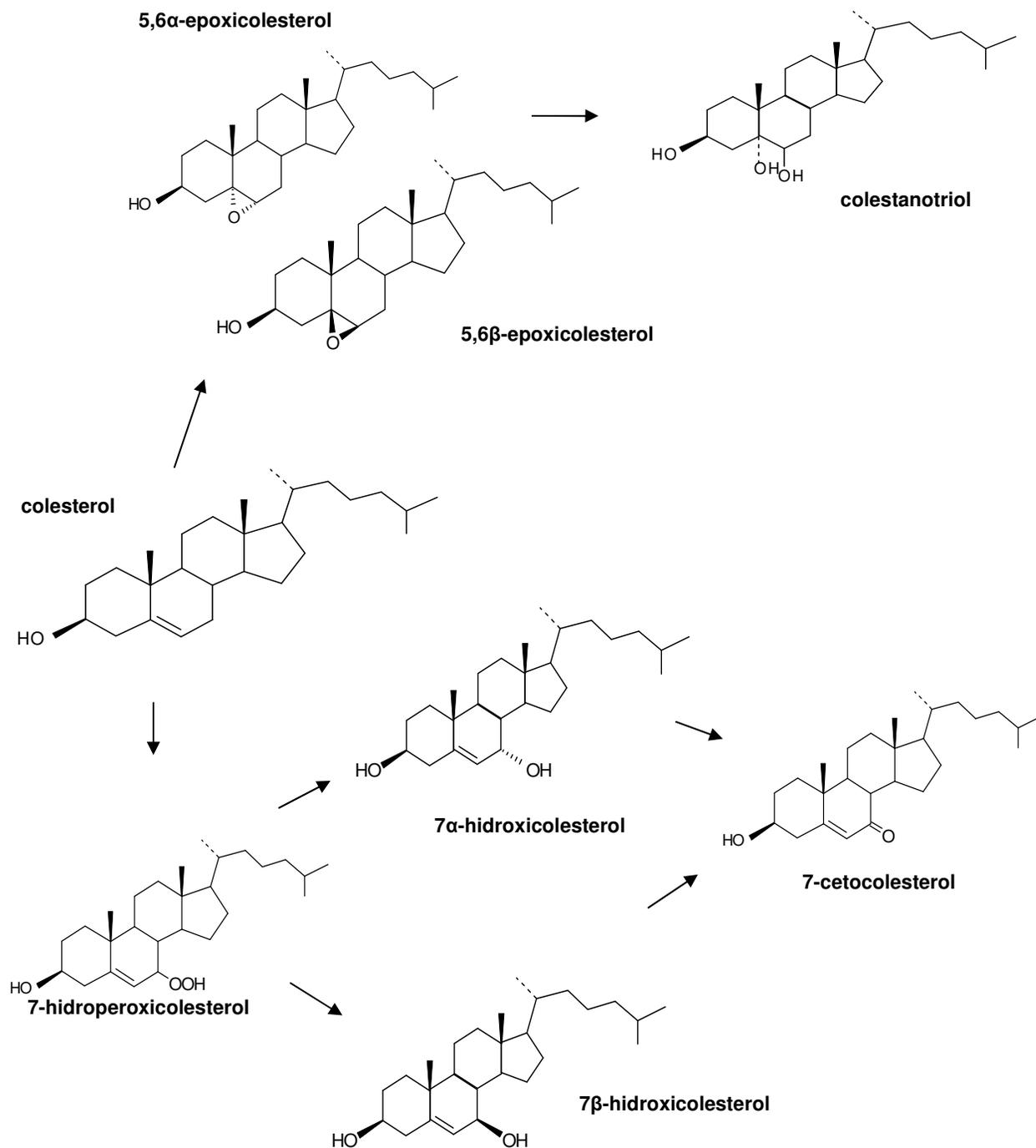


Figura 2 – Formação de óxidos de colesterol

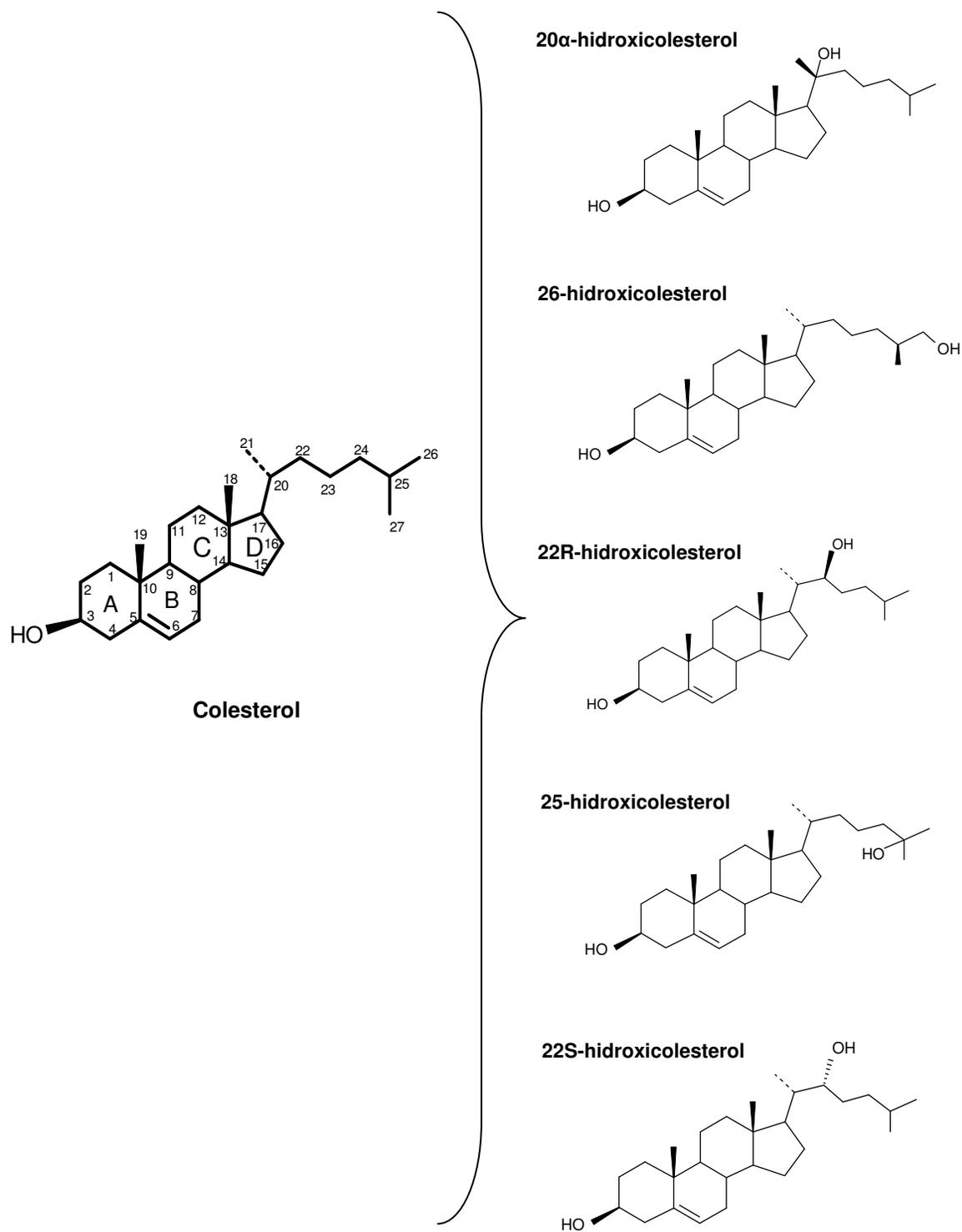


Figura 3 – Principais óxidos de colesterol formados a partir da cadeia lateral

Segundo Smith (1987), outras enzimas como as desidrogenases e oxidases podem formar os produtos da oxidação do colesterol, 7β -OH e 7α -OH, 25-OH, 26-OH, 20α -OH e 22R-OH. Guardiola et al. (2002) relatam que o 7α -OH, 25-OH e 26-OH são metabólitos endógenos do colesterol na produção dos ácidos biliares, enquanto que 20α -OH e 22R-OH estão envolvidos na biossíntese de hormônios esteróides. O 7α -OH pode ser convertido pela desidrogenase do fígado em 7α -hidroxicolesterol-3-cetona, a qual está envolvida na biossíntese de ácido cólico. Esta cetona é um produto da oxidação do colesterol, bem como um metabólito endógeno direto do ácido biliar e da biossíntese de estanois. A isomerização enzimática de hidroperóxidos da cadeia lateral do colesterol e dos epímeros epóxidos é mediada por hidrolases e epoxidases (SMITH, 1987).

Diversos autores descreveram inúmeros efeitos causados pelos óxidos de colesterol na saúde humana atribuindo a estes compostos a promoção da citotoxicidade celular (NAWAR, 1996), aterogênese (GARCIA-CRUISET et al., 2002) e carcinogênese devido a capacidade de alterar as propriedades das membranas celulares (GUARDIOLA et al., 1996) e de agirem como inibidores da síntese de esteróis através da inativação da HMG redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A) (KANDUTSCH; CHEN, 1973; ZHANG; DRICU; SJÖVALL, 1997).

Kandutsch e Chen (1973) em estudos *in vitro* observaram a capacidade dos óxidos 7α -OH, 7β -OH e 7-ceto de inibirem a HMG-CoA redutase, enzima que participa na síntese do colesterol. Porém há muita discussão sobre a possível regulação do metabolismo do colesterol por estes óxidos, pois sua ação regulatória sobre a enzima não se limita em apenas inibir a sua atividade, mas também a sua expressão gênica na transcrição. Sendo assim, estes óxidos reduzem a transcrição do RNA redutase e consequentemente a síntese protéica, dessa forma modificam a ancoragem da enzima na membrana do retículo endoplasmático liso (EDWARDS; ERICSSON, 1999; ZHANG; DRICU; SJÖVALL, 1997).

Guardiola et al. (1996) descreveram a forma como os óxidos contribuem para desencadear o processo da aterosclerose. O processo se inicia com a perda do equilíbrio entre as quantidades de lipoproteínas plasmáticas, devido ao aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) na corrente sanguínea e redução da

lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) plasmática. Os óxidos estão envolvidos na formação de placas de ateroma, pois contribuem para a modificação a permeabilidade do endotélio, que tem a função de uma barreira funcional (GOLDSTEIN; KITA; BROWN et al., 1983). A deposição de LDL-colesterol modifica a seletividade da parede do endotélio e permite que plaquetas se agreguem juntamente a LDL-colesterol. Em seguida os macrófagos e monócitos são acionados para reparar o dano no endotélio ocasionado pela deposição das células que se acumulam na parede do vaso. Essas células iniciam um processo inflamatório resultando na formação de células espumosas. O colesterol e seus ésteres presentes no LDL são estocados juntos às células espumosas (ROSS, 1986; WASOWICZ, 2003). Dessa forma ocorre o acúmulo de células proliferativas da musculatura lisa, colesterol e seus ésteres, e deposição de cálcio que levam a formação de placas de ateroma que podem aumentar promovendo a oclusão do vaso levando a trombose (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007). Os óxidos de colesterol mais nocivos com relação ao processo de aterosclerose são o colestanoetriol e o 25-hidroxicolesterol (GUARDIOLA, 1996).

2.3. Efeito do tratamento térmico na formação de óxidos de colesterol

Os ácidos graxos poli-insaturados em alimentos marinhos são oxidados quando submetido a altas temperaturas a 100°C por 24h (OSADA et al., 1993). São formados os radicais livres desses ácidos graxos que oxidam o colesterol e formam os óxidos de colesterol (OHSHIMA et al.,1996). Osada et al. (1993) observaram que o colesterol quando aquecido sozinho a 100°C por 24 h não oxidou, porém ao ser aquecido nestas mesmas condições com óleo de sardinha, o colesterol foi oxidado formando os óxidos de colesterol 7-ceto, 7 α -OH, 7 β -OH, 5,6 β - e 5,6 α -epóxi e colestanoetriol, sustentando a premissa de que a oxidação do colesterol é mais pronunciada quando está presente em alimentos ricos de ácidos graxos poli-insaturados.

Candela, Astiasarán e Bello (1997) analisaram o teor de colesterol em três espécies de peixes com baixo teor de gordura, linguado (*Solea solea*), bacalhau (*Gadus morrhua*) e merluza (*Merluccius merluccius*) em amostras empanadas cruas e fritas em óleo de girassol por 5 minutos a 180°C, sendo uma parte analisada imediatamente após

a fritura e outra parte mantida numa câmara térmica por 3 horas cuja temperatura interna dos peixes alcançou a 65°C. O teor de colesterol nos três peixes após o tratamento térmico diminuiu e não houve diferença entre os tratamentos térmicos, o bacalhau diminuiu seu teor de colesterol de 365 para 313 mg/100g (base seca), a merluza, de 295 para 231 mg/100g e o linguado de 267 para 206 mg/100g.

Shozen, Ohshima e Ushio (1995) não observaram alteração no teor de colesterol em produtos marinhos processados como arenque desidratado por salga, carapau fermentado seco, bacalhau do norte desidratado por salga após grelhados em forno a gás. Mas, verificaram a formação dos seguintes óxidos: 7 β -OH, 7-ceto, 5,6 α -epóxido, 5,6 β -epóxido, colestanoetriol, e 25-OH nesses produtos marinhos. O teor de óxidos totais aumentou após a grelhagem para os peixes mais gordos que têm maior teor de triacilglicerídeos como arenque do pacífico de 137 para 156 μ g/g na base seca e badejo de 88 para 113 μ g/g na base seca. Porém os peixes magros que apresentam menor teor de triacilglicerídeos e maior teor de fosfolipídios, como carapau, bacalhau do pacífico, massa bucal de lula não apresentaram alterações ou tiveram seus teores de óxidos de colesterol totais reduzidos após o tratamento térmico. Portanto, além do teor de lipídios do peixe, descrito por Ackman (1989), o tipo de lipídio que participa de sua constituição também pode ser um indicativo da estabilidade lipídica frente às situações a que o alimento é exposto.

Osada et al. (1993) analisaram amostras frescas de lula, sardinha e ovas de pollock (peixe semelhante ao bacalhau) e não encontraram nenhum óxido de colesterol, porém, detectaram altos níveis de óxidos totais em sardinhas desidratadas (28,7 mg/100g total de óxidos), em ovas de pollock temperadas em salmoura (20,9 mg/100g), em lula desidratada (14,6 mg/100g) e em lula cozida e enlatada (11,0 mg/100g). Dentre os peixes analisados, a lula cozida e enlatada foi a que apresentou a menor taxa de oxidação do colesterol.

Al-Saghir et al. (2004) avaliaram o efeito do tratamento térmico em salmão cozido no vapor de água por 12 minutos a 67°C e frito por 6 minutos (3 minutos cada lado) a 180°C em panela sem óleo e com alguns tipos de óleos como óleo de oliva extra virgem, óleo de milho refinado e óleo vegetal parcialmente hidrogenado. Observaram que na amostra crua de salmão o teor de óxidos totais foi de 0,9 μ g/g de

lipídios totais e que após o tratamento térmico ocorreu um aumento no teor destes óxidos equivalente a 6 µg/g de óxidos totais em salmão frito em panela sem óleo, a 4 µg/g frito em óleo de oliva extra virgem, a 4,4 µg/g frito em óleo de milho, a 3,3 µg/g frito em óleo vegetal parcialmente hidrogenado e 9,9 µg/g cozido no vapor que apresentou maior aumento.

Os principais óxidos de colesterol formados em produtos marinhos após tratamento térmico são os provenientes da oxidação do anel B do colesterol, 7-ceto, 7β-OH, 7α-OH, 5,6α-EP e 5,6β-EP (AL-SAGHIR et al., 2004; OHSHIMA, 2002; OHSHIMA et al., 1996; SHOZEN; OHSHIMA; USHIO, 1995; OHSHIMA; LI; KOUZUMI, 1993). Porém, outros autores já encontraram em produtos marinhos os óxidos gerados a partir da cadeia lateral do colesterol, como 20α-OH, 22S-OH, 24S-OH, 22R-OH, 25-OH e 26-OH (SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2007; 2008; SALDANHA; BENASSI; BRAGAGNOLO, 2008).

O 7-ceto é o óxido de colesterol mais comumente encontrado nas amostras de carnes incluindo frango e produtos marinhos submetidos a tratamento térmico (MARIUTTI et al., 2008a; SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2007). Além de ser o óxido predominante em amostras termicamente processadas, o 7-ceto pode ser usado como indicador da oxidação. Saldanha e Bragagnolo (2007) confirmam esta proposição, pois não encontraram o 7-ceto no pescado do atlântico fresco, somente após o tratamento térmico e armazenamento dos filés congelados ao longo de 120 dias.

O 19-OH foi identificado pela primeira vez em peixe por Saldanha et al. (2006) e apresentou níveis superiores ao 7-ceto (SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2008; SALDANHA; BENASSI; BRAGAGNOLO, 2008). Este óxido pode ser produto da oxidação, do metabolismo enzimático ou não enzimático, a proximidade do C19 com a ligação dupla entre os C5 e C6 torna esta região suscetível ao ataque de radicais peróxidos.

Echarte, Zulet e Astiasaran (2001) analisaram amostras de salmão assado por 30 minutos a 200°C e frito em diferentes óleos por 4 minutos a 180°C e não detectaram alguns óxidos de colesterol como o 25-OH, o 5,6α-epóxido e o 7α-OH, sendo que o 7β-OH foi formado apenas nas amostras fritas em óleo de soja e assadas, e o 7-ceto foi o óxido predominante em todas as amostras de salmão termicamente

processadas. O colestanoetriol não foi detectado nas amostras cruas, apenas nas amostras de salmão fritas e assadas.

O tratamento térmico é um processo importante para a preparação dos alimentos como produtos marinhos, pois realça o sabor e lhes confere proteção contra microrganismos patógenos, porém, também pode formar compostos danosos a saúde como os óxidos de colesterol.

2.4. Influência do armazenamento em produtos marinhos

Os peixes são suscetíveis à oxidação lipídica não somente quando submetidos ao tratamento térmico, mas também durante a armazenagem em freezer comum ou a temperatura ambiente, originando os óxidos de colesterol (SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2007).

O congelamento de peixes é um dos métodos mais empregados para conservá-lo em ambos os níveis, industrial e doméstico, uma vez que permite a redução da atividade enzimática (DAMODOBAN; GOPAKAMUR, 1992) e inibe o crescimento microbiano (TROLLER, 1980). A perda da atividade pode ser atribuída à mudança na estrutura terciária da proteína que pode ser causada pela cristalização da água (HATANO, 1968). No entanto, a atividade da enzima depende da temperatura de congelamento. Han e Liston (1988) verificaram que a -10°C a hidrólise de fosfolipídios e a peroxidação lipídica de truta arco-íris foi maior do que quando os produtos foram armazenados a -40°C . Isto prediz que a enzima atua de forma mais eficaz hidrolisando os lipídios quando a temperatura de armazenamento é mais alta, favorecendo desta forma a oxidação lipídica e possível formação dos óxidos de colesterol.

Durante o armazenamento de peixes sob congelamento ocorrem alterações na textura do músculo do peixe como a formação de pontes dissulfeto na proteína (grupo-SH) durante a cristalização da água (SEN et al., 1989) que podem ser atribuídas a diminuição da solubilidade das proteínas e à interação com os lipídios formando agregados. Sarma, Reddy e Srikar (2000) verificaram que a oxidação lipídica e a hidrólise estão fortemente ligadas a diminuição da solubilidade de proteínas. Em seus estudos, ao longo de 12 meses de armazenamento a -20°C , o óleo de sardinha apresentou um aumento no teor de ácidos graxos livres de 3,11% para 11,13% do total

de lipídios, indicando uma intensa hidrólise lipídica, e além de ainda um aumento nos peróxidos formados ao longo do armazenamento de 6,56 mmol de O_2 /kg de gordura (óleo de sardinha fresco) para 37,76 mmol de O_2 /kg, demonstrando que ocorreu deterioração oxidativa dos lipídios. Observaram ainda uma correlação negativa entre a formação de ácidos graxos livres e diminuição da solubilidade de proteínas, onde a formação de ácidos graxos livres aumentou com a diminuição na solubilidade das proteínas, e acarretando na formação de agregados de proteínas durante o armazenamento.

Kussi, Nikkila e Sarolainen (1975) já relatavam que os produtos formados na oxidação de lipídios em peixes durante o armazenamento podem influenciar a solubilidade de proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares. Os lipídios oxidados interagem com aminoácidos de proteínas de peixe por ligação específica de grupos proteicos funcionais suscetíveis, como a cisteína-SH, o grupo ξ - NH_2 de lisina e o grupo N-terminal do ácido aspártico, tirosina e arginina (KUSSE; NIKKILA; SAROLAINEN, 1975), e assim aumentam a hidrofobicidade das proteínas aumentando a agregação.

As alterações ocorridas durante a armazenagem facilitam a quebra da ligação do complexo lipídio-proteína do tecido muscular do peixe levando ao aumento dos lipídios totais (BÉLTRAN; MORAL, 1990). Saldanha e Bragagnolo (2007) verificaram em pescado do atlântico um aumento de 9,4 para 12,6 g/100g de lipídios totais ao longo de 120 dias de armazenamento a $-18^\circ C$.

Siddaiah et al. (2000) avaliaram a mudança no perfil lipídico de carpa prata congelada durante 180 dias a $-18^\circ C$. O índice de peróxidos nas carpas aumentou significativamente de 16,93 para 145 mmoles de O_2 /kg de gordura, indicando que houve oxidação neste período. Ainda observaram um aumento dos ácidos graxos livres de 7,66 para 30,76% de lipídio total ao fim do armazenamento, sinalizando a ocorrência de uma intensa hidrólise lipídica.

A forma como o alimento é acondicionado para o seu congelamento e armazenamento pode influenciar na qualidade do produto. Saldanha e Bragagnolo (2008) avaliaram a oxidação do colesterol ao longo de 120 dias de armazenamento a $-18^\circ C$ em pescada do atlântico embalada em filmes de polietileno de 0,1 mm e 6 μm de espessura. A proteção do colesterol contra a oxidação ocorreu nas amostras

embaladas em filme de 0,1 mm de espessura que dificultou o fácil acesso ao oxigênio, porém após 120 dias de armazenamento houve um aumento no total de óxidos de 804%, enquanto que nas amostras embaladas com filme de 6 μm de espessura o aumento foi de 1214%. Houve diferenças entre as amostras na formação dos óxidos, sendo que as amostras embaladas com o filme de maior espessura apresentaram maior formação de 24(S) e 5,6 α -EP e nas amostras com filme mais delgado, os óxidos predominantes foram 5,6 β -OH e o 22(S)-OH.

Saldanha e Bragagnolo (2007) verificaram aumento no teor de óxidos totais em sardinhas cruas após 120 dias de armazenamento a -18°C cuja variação foi de 19,4 para 115,2 $\mu\text{g/g}$ e observaram que os óxidos de colesterol apresentaram um aumento gradual durante o armazenamento sendo a formação do 7-ceto mais pronunciada, seguido de 22(S)-OH e 24(S)-OH. Ao final de 120 dias de armazenamento o aumento dos óxidos de colesterol total foi superior a 800%, sendo que o teor de colesterol diminuiu de 278 para 152 mg/100g demonstrando que o armazenamento doméstico em freezer possibilita a oxidação do colesterol. Além disso, houve um decréscimo de 29% no conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados. Segundo os autores, o aumento nos teores de óxidos de colesterol durante a armazenagem em freezer pode ser explicado pelo alto grau de insaturação dos lipídios presentes na sardinha. Em peixes, quanto maior é o grau de insaturação dos lipídios, maior é o processo de oxidação lipídica, e, conseqüentemente mais óxidos de colesterol são formados (AL-SAGHIR et al., 2004).

2.5. Antioxidantes

Os antioxidantes são adicionados aos alimentos para melhorarem a sua conservação e aumentar a vida de prateleira, retardando desta forma a oxidação lipídica e a formação dos óxidos de colesterol.

Esses compostos são substâncias químicas que doam elétrons ou hidrogênio para radicais livres e os convertem em moléculas menos reativas (BANDYOPADHYAY; CHAKRABORTY; RAYCHAUDHURI, 2007). Podem se ligar aos radicais livres formando um produto mais estável ou apenas doam os elétrons ao composto mais reativo sem ocorrer a formação de outros produtos, logo se regeneram

e estão prontos para atuar sobre outros compostos. Os mecanismos de ação dos antioxidantes incluem sequestrar radicais livres, inativar espécies reativas de oxigênio, quelar metais ou atuam em conjunto com outros compostos de forma sinérgica potencializando a sua atividade antioxidante (BANDYOPADHYAY; CHAKRABORTY; RAYCHAUDHURI, 2007; MADHAVI; DESHPANDE; SALUNKHE, 1996; POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2001). Há duas classes de antioxidantes, os primários ou tipo 1 e os secundários ou tipo 2 (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Os antioxidantes primários são mono-hidroxifenóis ou poli-hidroxifenóis que atuam durante a iniciação do processo oxidativo doando hidrogênio ao radical livre e formando um composto mais estável. O antioxidante torna-se então um radical que poderá reagir com radicais hidroxila, peroxila ou até mesmo com outra molécula de radical antioxidante e formar dímeros, compostos mais estáveis (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002). Os antioxidantes primários sintéticos mais comuns são terc-butil-hidroxianizol (BHA), di-terc-butil-hidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG) e o di-terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e os naturais representados pelos tocoferóis e carotenóides.

Os antioxidantes secundários ou tipo 2 também são chamados de preventivos por prevenirem a oxidação lipídica através de diversos mecanismos como quelar metais e desativá-los, doar hidrogênio ao antioxidante primário, restabelecendo-o, decompor os hidroperóxidos a espécies não radicais, desativar o oxigênio singlete, absorver radiação ultravioleta e agir como sequestrante de radicais livres. Porém, não convertem radicais em compostos mais estáveis. São considerados sinérgicos por agirem em conjunto e potencializar a atividade do antioxidante primário (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002). Os antioxidantes mais comuns que apresentam efeito sinérgico são ácido cítrico, ácido ascórbico, palmitato de ascorbila, lecitina e ácido tartárico.

Há uma tendência natural dos consumidores optarem por alimentos mais saudáveis, sendo assim, a indústria de alimentos tem procurado utilizar aditivos naturais com efeito antioxidante para aumentar a vida de prateleira dos alimentos, prevenindo a oxidação lipídica. Além disso, os antioxidantes naturais são considerados seguros, enquanto que os artificiais já mostraram indícios de que possam causar efeitos deletérios à saúde (BARLOW, 1990).

Os vegetais, frutas e especiarias que são muito consumidos, apresentam-se como fontes ricas em compostos fitoquímicos identificados como flavonóides, terpenóides, lignanas, polifenólicos, vitaminas A, C e E, carotenóides, saponinas, esteróis de plantas, entre outros que podem exercer alto potencial de atividade antioxidante (BANDYOPADHYAY; CHAKRABORTY; RAYCHAUDHURI, 2007).



2.5.1. Coentro

O coentro pertence à espécie *Coriandrum sativum* da família das Apiaceae (Umbeliferae). Suas folhas e frutos são comestíveis e atribuem-se a eles propriedades medicinais, tais como, tratar o sarampo, a disenteria, as hemorróidas e a dor de dente (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2003) e alguns estudos indicam que os compostos presentes neste vegetal têm atividade antioxidante (KAUR; KAPOOR, 2002; YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNY, 2006; MARIUTTI et al., 2008b; MELO; MANCINI-FILHO; GUERRA, 2003; GUERRA; MELO; MANCINI-FILHO, 2005). Além disso, o óleo do fruto de coentro apresenta propriedades funcionais com potencial de reduzir os riscos de doenças coronárias (RAMADAN; AMER, 2008).

Esta planta é muito utilizada na culinária para temperar carnes, principalmente peixes. No Brasil, o coentro é muito cultivado, cerca de 270 toneladas de sementes de *Coriandrum sativum* foram comercializadas no país em 2001, representando um valor próximo de 2,7 milhões de reais (VIRGÍLIO, 2001). Em outros países como a Rússia, Índia, Ásia, Europa Central este vegetal é muito cultivado e consumido (RAMADAN; AMER, 2008).

Mais de 29 compostos já foram identificados nas folhas e frutos de coentro incluindo terpenóides, geraniol, borneol, α -terpineno, terpinoleno, γ -terpineno, sabineno, limoneno, β -caroteno e outros carotenóides, aldeídos, cetonas, ésteres, alcoóis, éter, hidrocarbonetos aromáticos e sesquiterpenos (CRAIG, 1999; MSAADA et al., 2007; NEFFATI; MARZOUK, 2008). O composto volátil predominante no óleo essencial da folha de coentro é (E)-2-decenal (NEFFATI; MARZOUK, 2008). Além disso, Msaada et al. (2007) identificaram mais de 40 compostos voláteis no óleo essencial de coentro nos

diferentes estágios de desenvolvimento do fruto, dentre esses compostos o limoneno, um álcool monoterpeno, foi o composto majoritário presente no fruto. No entanto, apresentou diferentes proporções nos estágios de desenvolvimento, com 10,96% (p/p) no estágio imaturo, 76,33% no intermediário e 87,54% no maduro. O segundo composto volátil mais abundante foi o geranil acetato, um éster monoterpeno predominante no estágio inicial com 46,27% e que diminuiu bruscamente nos demais estágios (2,85% para 0,83%).

Wangensteen, Samuelsen e Malterud (2004) obtiveram 5,5 g de ácido gálico equivalente por 100 g de extrato de coentro de compostos fenólicos totais. Os autores encontraram correlação entre os fenólicos totais, a capacidade de seqüestrar radicais livres e de inibição da enzima peroxidase, pois o extrato da folha de coentro em acetato de etila apresentou alta eficiência como sequestrante de radicais livres (valor de IC_{50} de 147 $\mu\text{g/mL}$) e também excelente inibidor da enzima lipoxigenase ($IC_{50} = 45 \mu\text{g/mL}$).

Melo, Mancini-Filho e Guerra (2003) obtiveram diferenças quantitativas de fenólicos totais em coentro nos extratos aquoso (2734 mg/100 g), etanólico (128 mg/100 g) e nenhuma quantidade de fenólicos no extrato etéreo. Também verificaram que a atividade antioxidante dos extratos etéreo e aquoso foi de 69,83% e 61,89%, respectivamente, enquanto que a do extrato etanólico foi de 40,50%. A atividade antioxidante dos compostos da folha de coentro, nos extratos aquoso e etéreo, foi praticamente a mesma. Porém, foi necessário 148 μg de fenólicos totais para ocorrer uma inibição de 75% da oxidação lipídica, enquanto que foram necessários apenas 3,11 μg de carotenóides totais para atingir essa mesma inibição. A concentração de carotenóides totais foi 47 vezes inferior a quantidade de compostos fenólicos. Portanto, a equivalência da atividade antioxidante não representa equitativamente às concentrações de carotenóides e de compostos fenólicos.

Quando combinado o extrato de etéreo de coentro contendo 3,11 μg carotenóides e o extrato aquoso com 148 μg compostos fenólicos ao BHT nas concentrações entre 25 e 150 ppm, Melo, Mancini-Filho e Guerra (2003) observaram um efeito sinérgico entre os compostos fenólicos e o BHT observando uma máxima inibição da oxidação de 90,25 a 98,34%. No entanto, para o extrato etéreo a ação

sinérgica foi fraca, pois quase não houve diferença na inibição no extrato contendo apenas carotenóide e quando combinado o carotenóide ao BHT.

Guerra, Melo e Mancini-Filho (2005) identificaram e quantificaram os seguintes carotenóides em extrato etéreo de folha de coentro o β -caroteno (328,2 μ g/g), β -criptoxantina epóxido (14,1 μ g/g), luteína-5,6-epóxido (155,4 μ g/g), violaxantina (14,3 μ g/g) e neoxantina (24,7 μ g/g) em seguida compararam a capacidade destes compostos presente no extrato etéreo de coentro associado ao BHT em seqüestrar radicais livres. A fração contendo β -caroteno no extrato etérico de coentro apresentou maior capacidade em inibir (50%) a oxidação lipídica quando comparada as demais frações de carotenóides, porém essa inibição foi inferior a inibição promovida pelo BHT (95%).

O coentro, o açafrão, a folha de curry e o espinafre, foram adicionados a 10% (p/p) a um produto denominado *sandesh* (espécie de creme de queijo temperado) para avaliar o efeito antioxidante dessas ervas pelo método ABTS (BANDYOPADHYAY; CHAKRABORTY; RAYCHAUDHURI, 2007) e comparados com uma mistura de BHA:BHT (1:1). Segundo os autores, o açafrão, o curry e o espinafre apresentaram atividade antioxidante similares a mistura de BHA:BHT enquanto o coentro exerceu baixa atividade antioxidante (0,7 mmol/L).

Kaur e Kapoor (2002) avaliaram o efeito antioxidante do coentro mediante ao método β -caroteno descrito por Miller et al. (1993) e o classificaram como antioxidante de alta atividade (> 70%).

Dentre as atividades atribuídas aos compostos presentes no coentro, este vegetal pode ser considerado um ótimo quelante de metais como cobre, ferro, chumbo, alumínio e cádmio (REN et al., 2006; WONG et al., 2006). Wong et al. (2006) trabalharam com vinte e cinco plantas medindo a atividade antioxidante e verificaram que o coentro em pó apresentou alta capacidade em reduzir o íon cobre, mais acentuadamente, do que o íon férrico.

Ren et al. (2006) também avaliaram a atividade antioxidante do coentro em quelar cádmio. Para tanto, adicionaram na ração de truta arco-íris 2% (p/p) de coentro mais 10 mg/kg de Cd artificial e verificaram que o coentro apresentou a capacidade em

reduzir este metal pesado de 20 a 30% ao longo de 12 meses em relação à população controle que foi alimentada sem o coentro.

Este condimento, muito utilizado em diversos países, pode contribuir para dar sabor aos alimentos, bem como exercer capacidade antioxidante nos alimentos e preservá-los da oxidação lipídica.



2.5.2. Urucum

O urucum é da família das Bixaceae concentradas originalmente na América Central e norte da América do Sul (MERCADANTE; PFANDER, 1998). No Brasil o urucum corresponde a 90% do consumo total de corantes naturais e no mundo esse consumo é próximo de 70% como corante em alimentos (CONTO et al., 1991).

Além do seu uso como corante e flavorizante em alimentos tais como margarinas, aves, suínos, peixes, arroz, refrigerantes e iogurtes (GALINDO-CUSPINERA; LUBRAN; RANKIN, 2002), estudos recentes têm atribuído aos constituintes presentes no urucum atividade antioxidante (CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE 2008; MARIUTTI et al. 2008b; MONTENEGRO et al., 2002; MONTENEGRO et al., 2004; RIOS; MERCADANTE; BORSARELLI, 2007).

O urucum apresenta em suas sementes mais de 107 compostos voláteis que lhe conferem aroma, entre eles, o *p*-xileno, tolueno, α -pineno, β -pineno e γ -elemeno (SCOTTER; CASTLE; APPLETON, 2001; GALINDO-CUSPINER; LUBRAN; RANKIN, 2002). Os carotenóides presentes no urucum conferem a cor característica vermelho vivo sendo representados pela bixina (composto majoritário, 80%), norbixina e outros carotenóides em quantidades minoritárias (MERCADANTE; PFANDER, 2001).

A bixina apresenta em sua estrutura 25 carbonos e grupos éster metílico e carboxílico, sendo, portanto mais polar do que os carotenóides com 40 carbonos (Figura 3). Além disso, é um dos poucos carotenóides que apresenta-se naturalmente na forma de isômero *cis*, e assim como os carotenóides em geral, apresenta eficiente capacidade em desativar oxigênio singlete (MONTENEGRO et al., 2002).

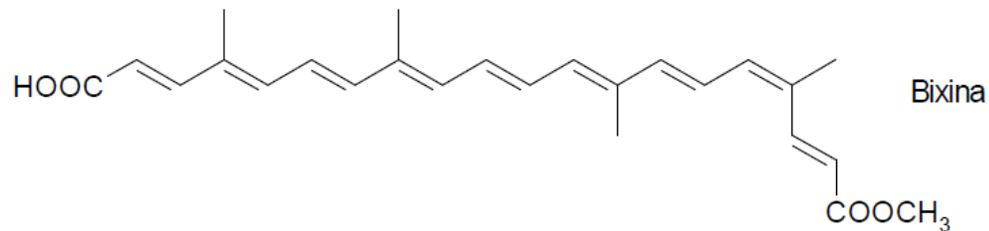


Figura 4. Estrutura da bixina

Cardarelli, Benassi e Mercadante (2008) realizaram a caracterização do extrato de urucum em solventes de diferentes polaridades e avaliaram a quantidade de bixina e de compostos fenólicos totais, bem como a sua capacidade em sequestrar radicais livres. Os autores conseguiram extrair mais bixina com acetato de etila (4,26 mg de bixina por grama de semente na base seca), enquanto que o conteúdo de fenólicos totais foi maior com metanol/água (1:1) (1,84 mg de ácido gálico equivalente por grama de semente seca). A atividade antioxidante de capturar radicais livres foi mais eficiente no solvente mais polar contendo metanol/água (1:1) (9,55 mM de equivalente de trolox por grama na base seca) e menor atividade em acetato de etila (4,14 mM de equivalente de trolox por grama na base seca), de acordo com a premissa de que os compostos fenólicos são mais eficientes em sequestrar radicais livres. Mariutti et al. (2008b) também obtiveram um baixo valor de TEAC em colorífico em extrato etanólico (2,64 mM de equivalente de trolox por grama na base seca).

Haila, Lievonen e Heinonen (1996) avaliaram os efeitos de carotenóides, entre eles a bixina, na formação de hidroperóxidos em sistema modelo contendo triacilglicerídeos exposto a luz a 25 °C por 45 dias. Observaram que nas concentrações de 30 µg/g e 60 µg/g de bixina houve uma inibição na formação de hidroperóxidos (Índice de Peróxido entre 10-15 meq/kg) em relação ao controle ausente de antioxidantes (IP de 30 meq/kg). Porém a bixina na concentração de 20 µg/g não apresentou efeito antioxidante (IP entre 25-30 meq/kg) visto que o índice de hidroperóxido foi equivalente ao controle (IP = 25 meq/kg).

O urucum é muito apreciado como aditivo em alimentos pelas suas características de cor e sabor, além disso, a bixina pode atuar como importante desativador de oxigênio singlete e sensibilizadores, portanto, presume-se que a adição deste carotenóide nos alimentos, pode ser uma alternativa para evitar a oxidação lipídica.

2.5.3. Antioxidantes em peixes

O congelamento dos produtos é uma das medidas tomadas para preservar os produtos marinhos, porém, ao longo do armazenamento esses produtos oxidam e formam compostos indesejáveis e que podem causar prejuízos à saúde, como já descrito nos itens anteriores (2.3 e 2.4.2). Portanto, os antioxidantes são utilizados como alternativa para prevenir ou desacelerar a formação dos produtos da oxidação, como os óxidos de colesterol.

Sebben et al. (2000) observaram que os hambúrgueres de carpa adicionados de 0,2 g/100 g de coentro, de 4 g/100 g de sorbitol, de 4 g/100 g de cebola, de 0,2 g/100 g de pimenta do reino entre outros ingredientes, mantiveram suas características sensoriais aceitáveis ao longo do período de 8 meses de armazenamento a -18°C, portanto provavelmente o coentro e os demais ingredientes ofereceram proteção contra a formação de compostos voláteis provenientes da oxidação lipídica que lhe confere o gosto e aroma de ranço.

Lugasi et al. (2007) estudaram o efeito da pré-emulsão de um extrato comercial de alecrim (Rosmol-P) em peixes pelágicos (*Trachurus trachurus*) inteiros e filés congelados a -20°C ao longo de 12 meses. O teor de lipídios variou entre 5 e 9 g/100g e os ácidos graxos livres aumentaram no controle e nos tratados com extrato, sendo este aumento um pouco maior para os filés do que para os peixes inteiros, porém, os peixes tratados com extrato apresentaram uma maior proteção contra a oxidação lipídica até o 9º mês de armazenamento, enquanto que no controle mantiveram seus teores de lipídios apenas até o 7º mês, e não houve formação de óxidos em nenhuma das amostras durante todo o tempo de armazenamento.

O uso de antioxidantes para a preservação dos peixes frente à oxidação lipídica se faz necessário, visto que são fontes de ácidos graxos poli-insaturados suscetíveis à oxidação.

3. OBJETIVOS

- Acompanhar o efeito dos condimentos, urucum, coentro, e, urucum e coentro no processo oxidativo da pescada durante tratamento térmico e armazenamento monitorando a formação de óxidos de colesterol e a degradação do colesterol;
- Identificar os óxidos de colesterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e confirmar a identidade desses compostos por espectrometria de massas (HPLC-MS/MS);
- Verificar a estabilidade do colesterol e óxidos de colesterol durante o armazenamento e do processamento térmico;
- Verificar a ação sinérgica entre urucum e coentro como antioxidantes;
- Determinar o teor de umidade e lipídios totais em pescada, crua e cozida, armazenada a -18°C por 120 dias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Preparo das amostras

Foram adquiridos do comércio local de Campinas, São Paulo, cerca de 12 kg de filé de pescada (*Cynoscion* spp.) fresca, provenientes do Estado do Pará, e transportadas em isopor com gelo até o momento da preparação das amostras. Foram removidos as peles remanescentes do filé de pescada e em seguida foram moídos os filés limpos em processador doméstico para obtenção de uma massa homogênea, a qual foi pesada e porcionada em quatro partes iguais. Uma dessas partes foi

considerada controle sem adição de condimentos e as demais porções foram adicionadas de 0,1% de urucum, 0,5% de coentro e 0,1% urucum mais 0,5% de coentro. O coentro foi adquirido fresco do comércio local de Campinas, São Paulo, e após ser lavado e picado foi adicionado à pescada. As sementes de urucum foram adquiridas do município de Monte Castelo, São Paulo, trituradas em processador doméstico e passadas em uma peneira de 100 'mesh', o pó foi pesado e em seguida adicionado às amostras. Foram fabricadas almôndegas de 50 ± 2 g em seguida embaladas em filmes de polietileno de baixa densidade (6 μ m de espessura) e congeladas em freezer a -18 °C por 120 dias. As almôndegas de pescada branca foram analisadas uma parte crua, e, outra parte foi cozida em água em ebulição a 95 ± 1 °C durante 30 minutos, até que a temperatura interna atingisse 91 ± 2 °C, nos tempos, zero, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias de armazenamento.

4.1.2 Reagentes

Os padrões de colesterol (5-colesten- 3β -ol) e os óxidos de colesterol: 19-hidroxicolesterol, 20α -hidroxicolesterol, $22S$ -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, $5,6\alpha$ -epoxicolesterol, $5,6\beta$ -epoxicolesterol e o 7-cetocolesterol foram adquiridos da Sigma (Milford, MA). Os padrões de óxidos de colesterol: $22R$ -hidroxicolesterol, $24S$ -hidroxicolesterol, 26-hidroxicolesterol, 7β -hidroxicolesterol e 7α -hidroxicolesterol foram comprados da Steraloids (Newport, RI). A pureza dos padrões variou de 95 a 98%. O isopropanol e o hexano foram utilizados como fase móvel para determinação do colesterol e óxidos de colesterol grau HPLC, enquanto os demais reagentes utilizados foram grau analítico.

4.2 MÉTODOS

4.2.1. Caracterização do coentro

Foram realizadas as análises de carotenóides totais, clorofila e fenólicos totais para a caracterização da folha de coentro.

Os carotenóides totais foram extraídos a partir de 5 g de folha de coentro por extração exaustiva com acetona de acordo com Rosso e Mercadante (2007). O extrato

foi transferido para éter etílico/éter de petróleo (2:1) e saponificados com KOH em metanol a 10% durante a noite no escuro à temperatura ambiente. Após a saponificação este extrato foi lavado com água até a remoção total do álcali. Para a remoção da água foi adicionado sulfato de sódio anidro ao extrato e em seguida foi concentrado em evaporador rotatório ($T < 40^{\circ}\text{C}$). Todo o procedimento foi realizado em ambiente com iluminação de baixa intensidade.

A quantificação dos carotenóides foi determinada através da medida da absorbância no comprimento de onda máximo em espectrofotômetro de arranjo de diodos (Agilent modelo 8453, Palo Alto, USA), na faixa de 260 a 600 nm. A concentração de carotenóides foi calculada utilizando o valor de absorvidade de 2592 para β -caroteno em éter de petróleo (BRITTON, 1995).

Foi realizada a extração exaustiva dos compostos fenólicos de acordo com Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos (1999). A extração foi realizada a partir de dois gramas de folha de coentro que foram adicionados de metanol/água (8:2), macerados em almofariz e filtrados em funil de Bücher a vácuo. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório com temperatura inferior a 40°C e ressuspendido em água, depois mantido em freezer por 20 minutos e centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos. Todo o procedimento foi realizado em ambiente com iluminação de baixa intensidade.

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada através da reação com o reagente Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemanha), segundo o procedimento de Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos (1999). Adicionou-se 1 mL de extrato da folha de coentro para um balão volumétrico de 25 mL contendo 9 mL de água e em seguida foi adicionado 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos foram adicionados 10 mL de solução de Na_2CO_3 a 7% e o volume completado com água. A solução foi incubada durante 90 minutos no escuro. O mesmo procedimento foi realizado para as diferentes concentrações de padrão de ácido gálico utilizadas na construção de curva de calibração. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro de arranjo de diodos (Agilent modelo 8453, Palo Alto, USA) a 765 nm. A quantificação foi realizada com base na curva padrão de ácido gálico (Extrasynthèse, Genay, França) (2,0-8,0 mg/L) e os resultados foram expressos em miligrama de equivalente de ácido gálico/100 g de amostra.

A clorofila foi extraída a partir de 1 g de folha de coentro macerada em almofariz e adicionada de 5 mL de acetona/água (8:2). O extrato bruto foi filtrado a vácuo e transferido para um balão volumétrico de 25 mL e em seguida completou-se o volume com acetona/água (8:2). A leitura da absorvância da solução foi realizada em espectrofotômetro (Agilent modelo 8453, Palo Alto, USA) nos comprimentos de onda de 647 e 663 nm.

Os teores de clorofilas totais, *a* e *b* foram calculados de acordos com as Equações 1, 2 e 3 propostas por Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofilas totais} = 7,15 (A_{663}) + 18,71 (A_{647}) \quad \text{Eq (1)}$$

$$\text{Clorofila } a = 12,25 (A_{663}) - 2,79 (A_{647}) \quad \text{Eq (2)}$$

$$\text{Clorofila } b = 21,50 (A_{647}) - 5,10 (A_{663}) \quad \text{Eq (3)}$$

onde A_{663} e A_{647} correspondem às absorvâncias a 663 e 647 nm, respectivamente. As concentrações de clorofila obtidas através da absorvância foram calculadas em $\mu\text{g/mL}$ de solução de extrato de coentro.

4.2.2. Determinação de bixina

A determinação de bixina foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Castro (2008) adaptada para as amostras de pescada cruas e cozidas adicionadas de urucum e urucum/coentro e analisadas nos tempos zero, 30, 90 e 120 dias de armazenamento.

A bixina foi extraída a partir de dois gramas de amostra com 10 mL de acetona em agitador mecânico por 30 segundos e em seguida em ultrassom por 5 minutos. Após adição de 5 mL de metanol a amostra foi novamente ao banho de ultrassom por mais 5 minutos. O extrato foi filtrado em funil de Bücher a vácuo e transferido para um funil de separação. Foram adicionados 0,5 mL de água destilada e 100 mL de solução acetato de etila/ éter etílico (1:1). O filtrado foi lavado com água destilada até remoção completa da acetona. A fase apolar contendo a bixina foi filtrada com sulfato de sódio anidro e o extrato obtido foi seco em evaporador rotatório ($<40^{\circ}\text{C}$)

que posteriormente foi transferido com diclorometano para um balão volumétrico de 10 mL.

A leitura da absorbância foi realizada a 468 nm em espectrofotômetro (Agilent modelo 8453, Palo Alto, USA) (LARA, 1984) e a concentração da bixina foi calculada em mg/g utilizando o coeficiente de absorção de 2826 (FAO/WHO, 1982). As análises foram realizadas em ambiente com incidência de luz reduzida.

4.2.3. Teor de lipídios totais e umidade

A determinação de lipídios totais foi realizado por gravimetria segundo Folch, Lees e Stanley et al. (1957) consistindo na extração dos lipídios com solução de clorofórmio/metanol na proporção 2:1.

Para realização do teor de umidade, alíquotas de $2,0 \pm 0,1$ g de amostra foram pesadas em placas de Petri previamente taradas. As amostras foram secas em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante, de acordo com metodologia da AOAC (1997). Em seguida as placas foram retiradas da estufa, colocadas em dessecador com sílica e pesadas. A umidade foi determinada pela diferença entre as massas.

4.2.4. Quantificação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol

As amostras foram homogeneizadas e submetidas à saponificação direta a frio segundo Saldanha et al. (2006). Foi pesado $1,0 \pm 0,1$ g de amostra em balão de fundo redondo de 125 mL e adicionado 6 mL de solução de KOH a 50% em água destilada e 4 mL de etanol. Foi inserido gás N_2 no balão antes de tampá-lo, em seguida agitado em mesa agitadora a 118 rpm, no escuro, por 22 horas. O conteúdo do balão foi transferido com 5 mL de água para tubo com tampa rosqueada de 90 mL. Foram realizadas quatro extrações com 10 mL de *n*-hexano, agitando o tubo em vortéx. O extrato de *n*-hexano foi seco sob N_2 , re-dissolvido na fase-móvel, filtrado em membrana Millipore de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão) com detectores UV-Visível (SPD-10 AV_{VP}) e índice de refração (RID-10 A). O detector de índice de refração foi utilizado na determinação dos 5,6 α - e 5,6 β -epóxidos,

uma vez que estes compostos, por não apresentarem ligação π , não absorvem luz na região do UV. Os demais óxidos foram determinados pelo detector UV com comprimento de onda fixado em 210 nm. A coluna analítica utilizada foi a Nova Pack CN HP (300 mm x 3,9 mm x 4 μ m, Waters). A fase móvel foi constituída de *n*-hexano: 2-propanol (97:3) na vazão de 1 mL/ minuto, de acordo com Saldanha et al. (2006). A identificação dos óxidos de colesterol foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos padrões com os tempos de retenção da amostra e por co-cromatografia. A quantificação foi feita por padronização externa de acordo com curva de seis pontos, cujas concentrações variaram de 0,5 a 100 mg/mL para os óxidos de colesterol e de 0,2 a 6 mg/mL para o colesterol. Os níveis de detecção foram de 0,06 μ g/mL para o colesterol, de 0,01 a 0,04 μ g/mL para os óxidos de colesterol detectados por UV e de 1,98 a 2,12 μ g/mL para os óxidos detectados no índice de refração (MARIUTTI, 2009). A confirmação dos óxidos de colesterol foi realizada por HPLC-APCI-MS utilizando um espectrômetro de massas (MS) Squire 4000 (Bremen, Germany), acoplado a um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japan), bomba de solventes (LC-20AD), degaseificador (DGU 20A₅) e *software* (LC Solution). Os parâmetros do MS/MS de acordo com Mariutti et al. (2008a) foram ajustados nas seguintes condições: modo positivo; temperatura da fonte de 400 °C; corona 4000 nA; gás de secagem (N₂) 300 °C; fluxo 5 l/min; nebulizador 65 psi; e escala de varredura de 80 a 450 *m/z*. Os espectros de massas obtidos dos óxidos encontrados nas amostras foram comparados com os espectros de massas dos padrões de óxidos nos correspondentes tempos de retenção.

4.2.5. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram tratados através de análise de variância pelo sistema STATISTICA (2000), versão 5.5, StatSoft Inc. e as médias comparadas pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do coentro

A Tabela 2 apresenta os compostos fenólicos, os carotenóides e a clorofila encontrados na folha de coentro.

Os teores de compostos fenólicos totais na folha de coentro foram de $0,89 \pm 0,1$ mg/g, quantidades muito semelhantes ao descrito por Kaur e Kapoor (2002) (0,82 mg/g) que verificaram capacidade antioxidante maior que 70% em sistema modelo contendo β -caroteno e ácido linoleico.

Tabela 2 - Composição de fenólicos totais, carotenóides e clorofila do coentro

Composto	M \pm DP*
Fenólicos totais (mg/g)	$0,89 \pm 0,1$
Carotenóides totais (mg/g)	$0,18 \pm 0,0$
Clorofila total (μ g/g)	$43,5 \pm 9,9$
Clorofila <i>a</i> (μ g/g)	$26,1 \pm 2,9$
Clorofila <i>b</i> (μ g/g)	$17,4 \pm 6,9$

*Média \pm estimativa de desvio padrão.

O coentro apresentou teores de $0,18 \pm 0,0$ mg/g de carotenóides totais (Tabela 2). Na literatura já foi descrito por Guerra, Melo e Mancini-Filho (2005) teores de 0,54 mg/g de carotenóides totais na base seca, e dentre os carotenóides encontrados o β -caroteno apresentou-se como composto majoritário presentes no extrato de coentro, representando cerca de 60% dos carotenóides totais. As diferenças encontradas entre as quantidades de carotenóides na folha de coentro podem ser explicadas pelas variações naturais presentes nas plantas, entre eles os cultivares, solo, região geográfica, período de coleta, maturidade da planta (MERCADANTE, 2008).

O teor de clorofila total na folha de coentro foi de $43,5 \pm 9,9$ μ g/g, de clorofila *a* equivalente a $26,1 \pm 2,9$ μ g/g e de clorofila *b* foi de $17,4 \pm 6,9$ μ g/g. Os teores de

clorofila total encontrados no presente trabalho foram muito menores que os teores obtidos por Kamat et al. (2003) em folha de coentro, cujo teor de clorofila total foi de 1770 $\mu\text{g/g}$, de clorofila *a* de 1348 $\mu\text{g/g}$ e de clorofila *b* igual 420 $\mu\text{g/g}$. A variação nos teores pode estar relacionado como método de extração e as variações dos cultivares.

Na literatura há poucas informações sobre as quantidades de clorofila nos vegetais, bem como sua discriminação entre as clorofilas *a* e *b* (MARQUEZ; SINNECKER, 2008). No entanto, já foi descrito o teor de clorofila total em folhas de couve apresentando 104-367 mg/100g (KOPSELL et al., 2004), em espinafre, 92 mg/100g (PIAGENTINI; GÜEMES; PIROVANI, 2002) e em salsa, 64 mg/100g (BOHN et al., 2004).

5.2. Comportamento da bixina durante o armazenamento e tratamento térmico em pescada branca

Os teores de bixina variaram de $1,13 \pm 0,3$ a $0,56 \pm 0,05$ mg/g na base seca entre as amostras cruas e cozidas adicionadas de urucum e de urucum mais coentro, como podem ser observados na Tabela 3.

As amostras de pescada branca adicionadas de condimentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nos teores de bixina, embora os valores aparentes sejam menores nas amostras cozidas (Figura 5). Isto sugere que o tipo de tratamento térmico empregado e o tempo de cocção não foram suficientes para degradar de forma significativa este carotenóide, visto que Castro (2008) observou em peito de frango adicionado de urucum uma redução em 19% no teor de bixina após a grelhagem.

Tabela 3 - Teores de bixina* (mg/g de almôndega de peixe, base seca) obtidos de pescada branca adicionada de urucum e de urucum mais coentro, cruas e cozidas a 97 °C em água fervente por 30 minutos.

Tratamento	urucum	urucum+coentro
crua	1,13±0,3 ^a	0,83±0,03 ^{a,b}
cozida	0,76±0,08 ^{a,b}	0,56±0,05 ^b

* Média ± estimativa de desvio padrão. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

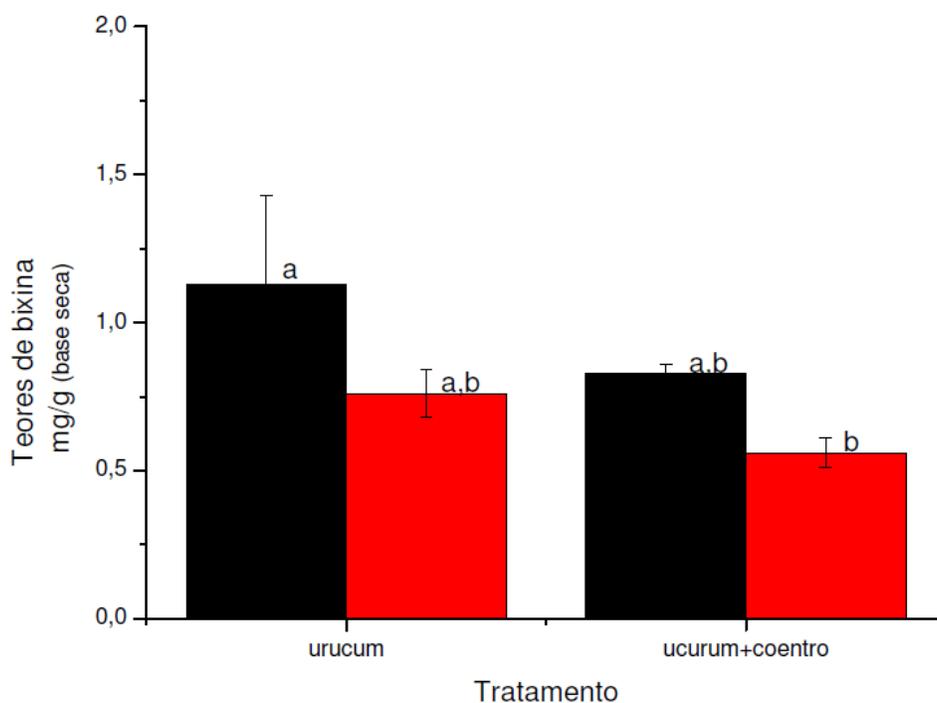


Figura 5. Teores de bixina (mg/g, base seca) em pescada branca crua e cozida. Legenda: ■ 0,1% urucum, ■ 0,1% de urucum mais 0,5% de coentro. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Os desvios padrões são determinados pelas barras.

Durante os 120 dias de armazenamento as amostras de pescada branca adicionadas de urucum apresentaram pequenas variações no teor de bixina com uma redução em 18% do seu teor inicial (Tabela 4). As amostras adicionadas de urucum mais coentro não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) em seus níveis durante os 120 dias como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 - Teores de bixina* (mg/g de almôndega de peixe, base seca) obtidos de pescada branca adicionado de urucum e de urucum mais coentro submetido a tratamento térmico após o armazenamento a -18°C.

Tempo (Dias)	Almôndega de pescada branca	
	urucum	urucum+coentro
0	0,76±0,08 ^A	0,56±0,05 ^B
30	0,66±0,01 ^{A,B}	0,73±0,06 ^A
90	0,52±0,02 ^{C,D}	0,58±0,03 ^B
120	0,62±0,04 ^{B,C}	0,60±0,04 ^{A,B}

*Média ± estimativa de desvio padrão. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

A Figura 6 apresenta os teores de bixina ao longo da armazenagem para as amostras adicionadas de urucum e de urucum mais coentro, pode-se observar que as amostras apresentaram um perfil muito semelhante não diferindo estatisticamente ($p>0,05$), porém nota-se uma pequena diferença nos teores de bixina no tempo zero que pode ser explicada pela homogeneização incompleta da amostra.

Castro (2008) também não observou grandes variações no teor de bixina em peito de frango adicionado de urucum considerando as mesmas condições de armazenamento (CASTRO, 2008).

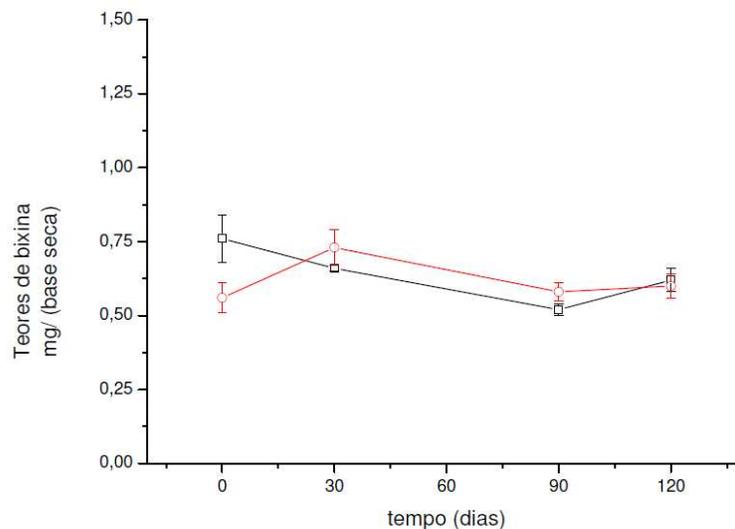


Figura 6. Teores de bixina (mg/g, base seca) em pescada branca adicionada de urucum e de urucum mais coentro submetido a tratamento térmico após o armazenamento a -18°C. Legenda: —□— 0,1% urucum, —○— 0,1% urucum mais 0,5% coentro. Os desvios padrões são determinados pelas barras.

5.3. Teores umidade e de lipídios totais

Os teores médios de umidade e de lipídios totais em pescada branca estão apresentados nas Tabelas 5 a 7.

A umidade em pescada branca crua foi de $80,2 \pm 0,4$ g/100g (Tabela 5). Esses teores estão de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006) para pescada branca. Após o tratamento térmico houve uma redução de 6% em seus teores, variando seus níveis entre as amostras de $75,9 \pm 0,1$ a $78,3 \pm 0,8$ g/100g, resultados próximos foram descritos para pescada grelhada do atlântico (70 a 75 g/100g) por Saldanha e Bragagnolo (2008).

Tabela 5 - Teores de umidade (g/100g de almôndega de peixe) e de lipídios totais (g/100g de almôndega de peixe, base seca) de pescada branca para amostras cruas e cozidas com e sem adição de condimentos*.

Análise	crua		cozida		
	controle	controle	urucum	coentro	urucum+coentro
Umidade	$80,2 \pm 0,4^a$	$76,1 \pm 0,1^d$	$77,2 \pm 0,4^c$	$78,3 \pm 0,8^b$	$75,9 \pm 0,1^d$
Lipídios totais	$16,0 \pm 0,7^a$	$13,1 \pm 1,0^{a,b}$	$12,8 \pm 0,1^b$	$14,7 \pm 1,0^{a,b}$	$14,3 \pm 0,0^{a,b}$

*Média \pm estimativa de desvio padrão. Letras minúscula iguais, na mesma linha, não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) no teste de Tukey.

Os teores de umidade ao longo de 120 dias variaram de $80,0 \pm 0,2$ a $77,1 \pm 2,5$ g/100g nas amostras cruas e de $75,9 \pm 0,1$ a $73,8 \pm 0,4$ g/100g nas amostras cozidas (Tabela 6). As amostras cruas apresentaram pequenas variações no teor de umidade, não ultrapassando a 4% nas amostras controle em 60 dias, adicionada de coentro em 15 dias e adicionada de urucum mais coentro em 120 dias.

As amostras cozidas apresentaram redução de até 8% na umidade quando comparadas as amostras cruas ao longo dos 120 dias, isto pode ser explicado pela possível perda de água no cozimento da pescada.

Tabela 6 - Teores de umidade (g/100g de almôndega de peixe) em amostras de pescada branca crua e cozida, adicionada ou não de condimentos, armazenada a -18 °C por 120 dias.

Tempo (dias)	Almôndega de pescada branca crua*			
	controle	urucum	coentro	urucum+coentro
0	80,2±0,4 ^{a,b,c,d,e,f}	80,7±0,1 ^{a,b,c,d,e}	80,9±0,1 ^{a,b,c,d}	80,0±0,2 ^{a,b,c,d,e,f,g,h}
15	79,5±0,0 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j,k}	79,5±0,2 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j,k}	77,6±0,1 ^{h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	81,7±1,0 ^{a,b}
30	81,3±0,5 ^{a,b,c}	80,2±0,2 ^{a,b,c,d,e,f}	80,2±0,2 ^{a,b,c,d,e,f}	79,4±0,5 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l}
45	79,4±0,3 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l}	80,3±0,2 ^{a,b,c,d,e,f}	80,2±0,4 ^{a,b,c,d,e,f}	79,7±0,4 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j}
60	77,6±0,5 ^{i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	78,6±1,0 ^{d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p}	79,8±0,3 ^{b,c,d,e,f,g,h,i}	82,4±0,5 ^a
90	80,2±0,2 ^{a,b,c,d,e,f}	79,5±0,5 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j,k}	79,6±0,4 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j,k}	79,1±0,1 ^{c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n}
120	79,8±0,1 ^{b,c,d,e,f,g,h,i}	80,0±0,3 ^{b,c,d,e,f,g,h}	80,3±0,2 ^{a,b,c,d,e,f}	77,1±2,5 ^{m,n,o,p,q,r,s}
Tempo (dias)	Almôndega de pescada branca cozida*			
controle	urucum	coentro	urucum+coentro	
0	76,2±0,2 ^{q,r,s,t}	77,2±0,4 ^{k,l,m,n,o,p,q,r,s}	78,3±0,3 ^{f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q}	75,9±0,1 ^{s,t,u}
15	78,9±0,1 ^{d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o}	79,4±0,1 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m}	78,5±0,3 ^{d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q}	78,3±0,1 ^{f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r}
30	78,1±0,5 ^{f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	77,6±0,2 ^{h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	78,8±0,2 ^{d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q}	77,3±0,2 ^{j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}
45	80,0±0,4 ^{a,b,c,d,e,f,g}	77,5±0,1 ^{i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	80,0±0,3 ^{b,c,d,e,f,g,h}	78,3±0,1 ^{e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q}
60	76,6±0,5 ^{o,p,q,r,s}	77,1±1,0 ^{l,m,n,o,p,q,r,s}	78,3±0,2 ^{f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r}	76,9±0,2 ^{n,o,p,q,r,s}
90	73,5±0,2 ^u	77,3±0,2 ^{k,l,m,n,o,p,q,r,s}	77,8±0,1 ^{g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s,t}	75,5±0,1 ^{s,t,u}
120	73,8±0,4 ^{t,u}	76,5±0,3 ^{p,q,r,s}	76,9±0,7 ^{o,p,q,r,s,t}	75,4±0,0 ^{s,t,u}

*Média ± estimativa de desvio padrão. Letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa (p>0,05) teste de Tukey.

O teor de lipídios totais em pescada branca crua foi de 16,0 ± 0,7 g/100g na base seca (Tabela 5), este teor lipídico foi superior ao obtido por Saldanha e Bragagnolo (2008) em amostras cruas de pescada do atlântico (8,3 g/100g, base seca).

Pode-se verificar na Tabela 5 que as amostras controle cruas comparadas as amostras controle cozidas e as adicionadas de condimentos, não apresentaram diferenças estatisticamente significativamente (p<0,05) em seus teores de lipídios totais, exceto para a amostra contendo urucum que apresentou uma redução significativa (p>0,05), mas que provavelmente esta redução seja devido a amostragem. Estudos realizados com anchovas cruas apresentaram 14,5 g/100g (base seca) de lipídios totais e ao serem grelhadas reduziram seus teores de lipídios totais pela metade (7,7 g/100g) (OHSHIMA et al.,1996). Deve-se ressaltar que inúmeros fatores como as espécies de peixes, época e mês de pesca, a profundidade e a localização onde os

peixes foram pescados podem afetar a sua composição química (GÁMEZ-MEZA et al., 1999).

A Tabela 7 apresenta os teores de lipídios totais na base seca para pescada branca cozida ao longo de 120 dias de armazenamento. A amostra controle em 90 e 120 dias reduziu os lipídios totais em 20% em relação ao tempo zero, a pescada adicionada urucum mais coentro apresentou uma diminuição de 18% nos lipídios totais e as amostras adicionadas de coentro apresentou uma redução de 20% no fim do armazenamento em relação ao tempo inicial. Essa perda de lipídios está de acordo com a redução de lipídios totais em pescada do atlântico (15%) encontrada por Saldanha e Bragagnolo (2008) durante as mesmas condições de armazenamento descritas no presente trabalho.

Tabela 7 - Teores de lipídios totais (g/100g de almôndega de peixe, base seca) de pescada cozida, adicionada ou não de condimentos, armazenada a -18°C por 120 dias.

Amostras/dias	Almôndega e pescada branca cozida*				
	Zero	30	60	90	120
controle	13,1±1,0 ^{a,b,c,d}	14,7±0,3 ^{a,b}	14,6±0,1 ^{a,b,c}	10,2±1,0 ^g	10,9±0,6 ^{f,g}
urucum	12,8±0,1 ^{b,c,d,e,f}	14,1±0,5 ^{a,b,c,d}	12,4±0,2 ^{c,d,e,f,g}	12,3±0,1 ^{d,e,f,g}	12,7±0,1 ^{b,c,d,e,f}
coentro	14,7±1,0 ^{a,b}	13,9±0,2 ^{a,b,c,d,e}	13,1±0,6 ^{b,c,d,e}	12,7±0,3 ^{b,c,d,e,f}	11,7±0,1 ^{e,f,g}
urucum+coentro	14,3±0,0 ^{a,b,c,d}	15,8±0,6 ^a	14,5±0,0 ^{a,b,c}	11,7±0,8 ^{e,f,g}	12,1±0,4 ^{d,e,f,g}

*média ± estimativa de desvio padrão. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.4. Colesterol

Os teores de colesterol em pescada branca crua e cozida expressos na base úmida estão apresentados na Tabela 8. Os teores de colesterol variaram de $46,8 \pm 0,5$ a $52,5 \pm 2,3$ mg/100g (base úmida) em pescada crua controle e adicionadas de condimentos ao longo dos 120 dias de armazenagem. As amostras cozidas apresentaram variação de $53,7 \pm 0,0$ a $61,5 \pm 1,5$ mg/100g ao final do armazenamento. Esses valores de colesterol encontrados na pescada branca estão de acordo com os

teores relatados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006) que é de 51 mg/100g (base úmida) de colesterol em pescada branca fresca.

Tabela 8 - Teores de colesterol (mg/100g de almôndega de peixe, base úmida) de pescada crua e cozida, adicionada ou não de condimentos, armazenada a -18°C por 120 dias.

Almôndega de pescada crua*				
Tempo (dias)	controle	urucum	coentro	urucum+coentro
0	49,6±3,1 ^{l,m,n,o,p,q,r,s,t}	46,8±0,5 ^{t,u,v}	47,5±1,5 ^{r,s,t,u,v}	46,3±1,3 ^{t,u,v}
15	50,5±10,1 ^{j,k,l,m,n,o,p,q,r,s,t}	49,5±2,3 ^{m,n,o,p,q,r,s,t}	49,0±0,0 ^{n,o,p,q,r,s,t}	42,7±0,6 ^{u,v}
30	47,0±1,3 ^{t,u,v}	48,7±0,9 ^{n,o,p,q,r,s,t,u}	50,4±0,3 ^{k,l,m,n,o,p,q,r,s,t}	48,1±0,2 ^{p,q,r,s,t,u,v}
45	52,0±1,5 ^{h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s,t}	48,7±1,2 ^{n,o,p,q,r,s,t,u}	48,0±1,3 ^{q,r,s,t,u,v}	48,2±1,26 ^{o,p,q,r,s,t,u}
60	54,3±0,3 ^{e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p}	49,3±0,7 ^{m,n,o,p,q,r,s,t}	49,6±1,9 ^{l,m,n,o,p,q,r,s,t}	41,9±1,9 ^v
90	49,2±1,3 ^{n,o,p,q,r,s,t}	49,1±0,3 ^{n,o,p,q,r,s,t}	49,7±0,6 ^{l,m,n,o,p,q,r,s,t}	49,2±1,1 ^{n,o,p,q,r,s,t}
120	52,5±2,3 ^{g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s,t}	48,9±0,2 ^{n,o,p,q,r,s,t,u}	49,9±2,2 ^{l,m,n,o,p,q,r,s,t}	47,8±0,4 ^{r,s,t,u,v}
Almôndega de pescada cozida*				
Tempo (dias)	controle	urucum	coentro	urucum + coentro
0	64,5±1,0 ^a	59,4±2,9 ^{a,b,c,d,e,f}	53,7±0,0 ^{f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r}	65,4±2,43 ^a
15	62,4±3,6 ^{a,b}	55,8±0,2 ^{c,d,e,f,g,h,i,j,k,l}	52,4±0,0 ^{h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s,t}	60,9±1,3 ^{a,b,c,d}
30	57,2±1,1 ^{b,c,d,e,f,g,h,i}	55,5±0,9 ^{c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m}	51,0±0,4 ^{i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s,t}	56,7±1,4 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j,k}
45	54,3±1,5 ^{e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q}	54,9±1,4 ^{d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n}	47,3±1,0 ^{s,t,u,v}	53,7±2,1 ^{f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r}
60	58,3±1,1 ^{b,c,d,e,f,g,h}	54,9±0,5 ^{d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n}	53,4±1,7 ^{f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	58,7±0,6 ^{b,c,d,e,f,g}
90	61,1±0,9 ^{a,b,c,d}	56,8±1,0 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j}	54,4±1,2 ^{e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o}	60,5±2,0 ^{a,b,c,d,e}
120	61,3±1,3 ^{a,b,c}	56,8±3,9 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,j}	54,3±0,9 ^{e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p}	61,5±1,5 ^{a,b,c}

*Média ± estimativa de desvio padrão. Letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) teste de Tukey.

A Figura 7 apresenta o efeito do tratamento térmico nos níveis de colesterol (base úmida) em pescada branca, sendo esses teores menores nas amostras cruas do que nas amostras cozidas, isto de deve a perda de água presente nas amostras que foram submetidas ao tratamento térmico. Para eliminar o efeito da água, a Tabela 9 apresenta os níveis de colesterol na base seca durante os 120 dias.

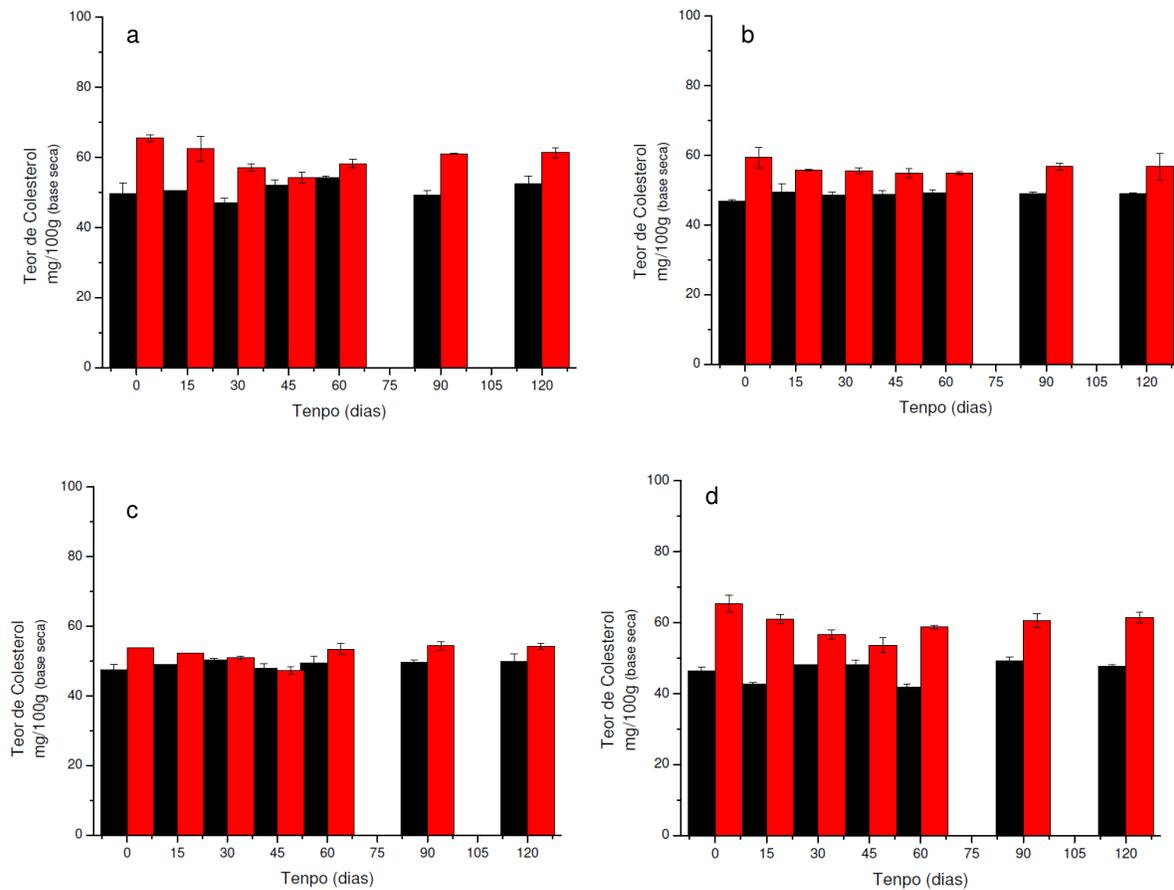


Figura 7. Concentração de colesterol (mg/100g, base úmida) em pescada branca, a) controle, b) 0,1% urucum, c) 0,5% coentro, e d) 0,1% urucum mais 0,5% coentro. Legenda: ■ amostras cruas ■ amostras cozidas. Os desvios padrões são determinados pelas barras.

A Tabela 9 apresenta os níveis de colesterol em pescada branca crua e cozida na base seca. Os teores de colesterol nas amostras cruas variaram de $231,8 \pm 2,8$ a $259,3 \pm 8,5$ mg/100g e nas amostras cozidas foram de $245,8 \pm 2,3$ a $262,7 \pm 2,3$ mg/100g ao longo de 120 dias de armazenamento entre as amostras controle e adicionadas de condimentos. Estes valores apresentaram-se dentro da variação encontrada por Saldanha e Bragagnolo (2007) em pescada do atlântico crua (223 a 337 mg/100g, base seca) e grelhada (230 a 345 mg/100g, base seca).

As amostras de pescada branca crua e cozida não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre o controle e as demais amostras contendo urucum, coentro, e urucum mais coentro ao longo de 120 dias de armazenamento.

Comparando-se as amostras cruas adicionadas de condimentos em relação ao controle, apenas as amostras contendo urucum mais coentro em 120 dias apresentaram menores níveis de colesterol (10%), sendo os demais tempos sem diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$). A pescada cozida não apresentou diferença estatística ao longo da armazenagem quando comparado o controle aos tratamentos empregados.

Tabela 9 - Teores de colesterol (mg/100g de almôndega de peixe, base seca) em pescada branca processada, crua e cozida, adicionada ou não de condimentos, armazenada a -18°C por 120 dias.

Almôndega de pescada crua*				
Tempo (dias)	controle	urucum	coentro	urucum + coentro
0	250,8±8,1 ^{a,b,c,d,e,f,g}	243,3±3,8 ^{b,c,d,e,f,g}	249±5,7 ^{a,b,c,d,e,f,g}	231,8±2,8 ^g
15	246,2±0,2 ^{a,b,c,d,e,f,g}	241±8,7 ^{c,d,e,f,g}	243,1±0,7 ^{b,c,d,e,f,g}	231,78±3,9 ^g
30	241,7±2,3 ^{c,d,e,f,g}	247,1±4,1 ^{a,b,c,d,e,f,g}	246,34±2,8 ^{a,b,c,d,e,f,g}	236,4±4,3 ^{d,e,f,g}
45	250,8±3,8 ^{a,b,c,d,e,f,g}	246,7±3,3 ^{a,b,c,d,e,f,g}	241,9±0,6 ^{c,d,e,f,g}	235±9,4 ^{e,f,g}
60	244,6±1,7 ^{b,c,d,e,f,g}	244,5±4,2 ^{b,c,d,e,f,g}	247,6±5,8 ^{a,b,c,d,e,f,g}	241,9±5,0 ^{c,d,e,f,g}
90	248,7±1,0 ^{a,b,c,d,e,f,g}	243,5±0,9 ^{b,c,d,e,f,g}	243,5±3,2 ^{b,c,d,e,f,g}	241,3±6,4 ^{c,d,e,f,g}
120	259,3±8,5 ^{a,b,c,d,e}	240,6±1,2 ^{c,d,e,f,g}	248,8±6,1 ^{a,b,c,d,e,f,g}	232,8±7,4 ^{f,g}
Almôndega de pescada cozida*				
Tempo (dias)	controle	urucum	coentro	urucum + coentro
0	268,8±14,5 ^{a,b}	258,1±10,4 ^{a,b,c,d,e,f}	245,8±2,3 ^{a,b,c,d,e,f,g}	271,4±11,9 ^a
15	260,75±15,6 ^{a,b,c,d,e}	245,6±5,3 ^{a^{b,c,d,e,f,g}}	239,5±2,6 ^{c,d,e,f,g}	252,2±4,6 ^{a,b,c,d,e,f,g}
30	258,2±2,9 ^{a,b,c,d,e}	248,4±3,5 ^{a,b,c,d,e,f,g}	240,3±2,3 ^{c,d,e,f,g}	248,7±4,2 ^{a,b,c,d,e,f,g}
45	261,7±5,7 ^{a,b,c,d}	243,6±6,4 ^{b,c,d,e,f,g}	237,1±0,9 ^{c,d,e,f,g}	248,4±10,5 ^{a,b,c,d,e,f,g}
60	249,6±12,4 ^{a,b,c,d,e,f,g}	240,2±3,1 ^{c,d,e,f,g}	245,6±4,9 ^{a,b,c,d,e,f,g}	253,7±1,48 ^{a,b,c,d,e,f,g}
90	258,5±4,1 ^{a,b,c,d,e,f}	247,1±3,7 ^{a,b,c,d,e,f,g}	250,2±2,5 ^{a,b,c,d,e,f,g}	249,5±4,4 ^{a,b,c,d,e,f,g}
120	262,7±2,3 ^{a,b,c}	247,7±15,2 ^{a,b,c,d,e,f,g}	249,7±1,5 ^{a,b,c,d,e,f,g}	256,2±3,1 ^{a,b,c,d,e,f,g}

*Média ± estimativa de desvio padrão. Letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) Teste de Tukey.

Pode-se observar na Figura 8 que o tratamento térmico não alterou os níveis do colesterol ($p>0,05$) em nenhuma das amostras estando de acordo com Shozen, Ohshima e Ushio (1995) que observaram níveis constantes de colesterol em produtos marinhos após serem grelhados.

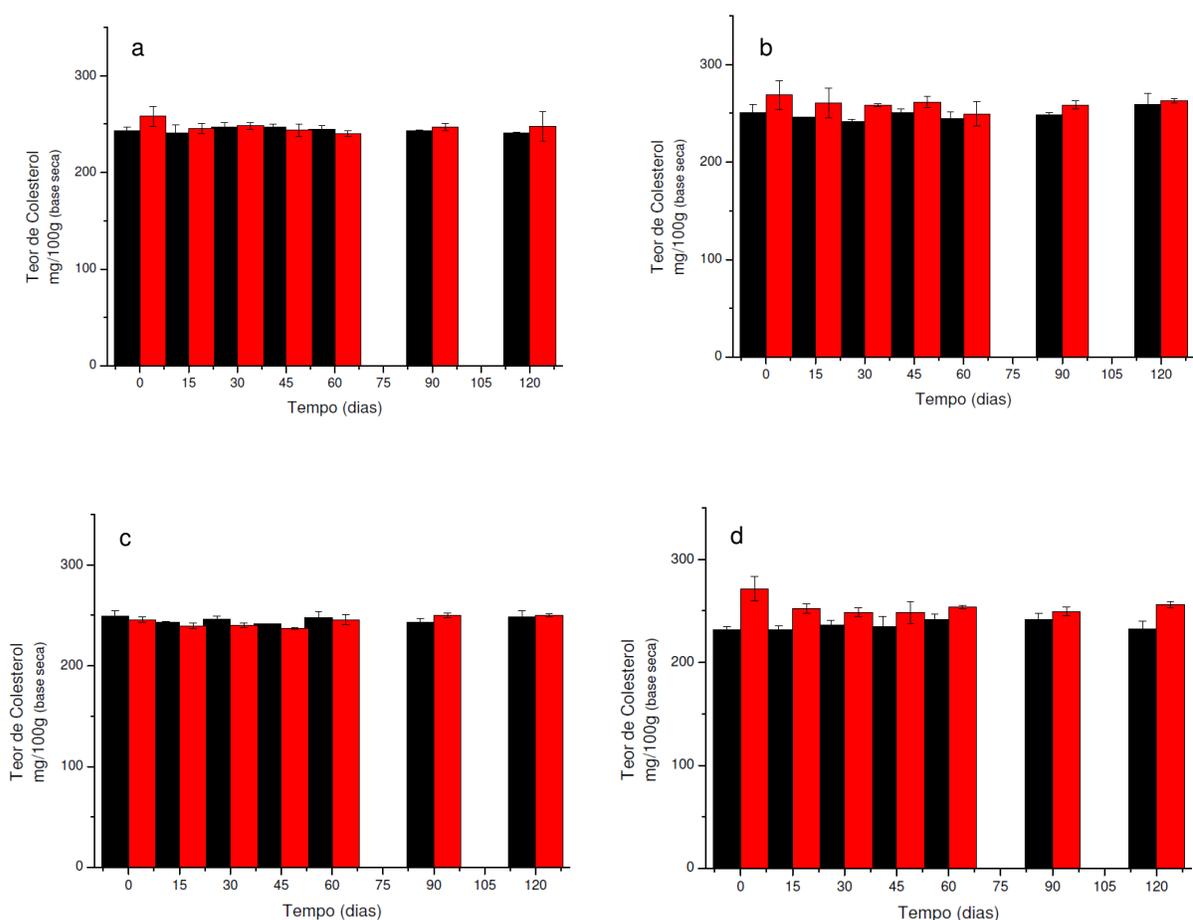


Figura 8. Concentração de colesterol (mg/100g, base seca) em pescada branca, a) controle, b) 0,1% urucum, c) 0,5% coentro, e d) 0,1% urucum mais 0,5% coentro. Legenda: ■ amostras cruas ■ amostras cozidas. Os desvios padrões são determinados pelas barras.

5.5. Efeito do armazenamento e tratamento térmico na formação dos óxidos de colesterol

Foram identificados cinco óxidos de colesterol em pescada branca, 7-cetocolesterol (7-ceto), 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH), 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OH), 5,6 α -epoxicolesterol e 5,6 β -epoxicolesterol. Destes óxidos foram possíveis quantificar o 7-ceto, o 7 β -OH e o 7 α -OH ao longo de 120 dias de armazenamento e após o tratamento térmico (Tabela 10 a 14). Os epóxidos, 5,6 α - e 5,6 β -epoxicolesterol apresentaram-se abaixo do limite de detecção para o índice de refração (2,12 e 1,98 μ g/mL, respectivamente), no entanto foram identificados no HPLC-MS/MS.

O 7-ceto é o principal óxido encontrado em alimentos depois de submetidos ao tratamento térmico (MARIUTTI, 2008a; SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2007), porém no presente trabalho foram encontrados baixos teores deste óxido em pescada branca variando de $0,74 \pm 0,03$ a $0,24 \pm 0,03$ $\mu\text{g/g}$ para as amostras cruas e de $0,82 \pm 0,05$ a $0,11 \pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$ para as amostras cozidas do início ao final do armazenamento (Tabela 10).

Durante os 120 dias de armazenamento não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) no teor de 7-ceto, ocorrendo apenas algumas variações pontuais para a amostra controle e adicionada de urucum em 45 dias e para a amostra contendo urucum mais coentro em 15 dias de armazenamento. Embora sejam as maiores médias encontradas, essas variações podem ser decorrentes a falta de homogeneização das amostras. A pescada cozida apresentou comportamento semelhante às amostras cruas, pois em geral não apresentou alterações nos teores de 7-ceto durante o armazenamento.

Saldanha, Benassi e Bragagnolo (2008) também encontraram baixos teores de 7-ceto em sardinha crua ($0,6$ $\mu\text{g/g}$, base seca) nas análises referentes ao tempo zero, porém ao final do armazenamento houve um aumento no teor deste óxido chegando a $16,7$ $\mu\text{g/g}$, muito superior ao encontrado no presente trabalho. Nas amostras de sardinha grelhada os teores de 7-ceto variaram de $2,6$ - $12,3$ $\mu\text{g/g}$ (SALDANHA; BENASSI; BRAGAGNOLO, 2008) valores estes também superiores aos teores encontrados em amostras cozidas de pescada branca. Porém já foi descrito na literatura a ausência deste óxido para amostras cruas e grelhadas de pescada do atlântico (SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2008).

Ohshima, Li e Koizumi (1993) avaliaram o teor de óxidos de colesterol em vários produtos marinhos em anchova desidratada por salga e encontraram níveis de 46 a 48 $\mu\text{g/g}$ deste óxido na base seca, em arenque os níveis foram de $7,5$ $\mu\text{g/g}$ (base seca) e em bacalhau do pacífico o teor de 7-ceto foi baixo equivalente a $2,3$ $\mu\text{g/g}$ (base seca), portanto os teores de 7-ceto dependem além de outros fatores, da espécie de peixe e do tratamento ao qual foi submetido.

Tabela 10 - Teores de 7-cetocolesterol ($\mu\text{g/g}$ de almôndega de peixe, base seca) em pescada branca crua e cozida, adicionada ou não de condimentos, armazenada a -18°C por 120 dias.

Almôndega de pescada crua*				
Tempo (dias)	controle	urucum	coentro	urucum + coentro
0	0,44±0,11 ^{g,h,i,j,k,l,m,n,o}	0,42±0,02 ^{g,h,i,j,k,l,m,n,o,p}	0,74±0,03 ^{d,e}	0,31±0,05 ^{k,l,m,n,o,p,q,r,s,t}
15	0,31±0,00 ^{l,m,n,o,p,q,r,s,t}	0,45±0,05 ^{g,h,i,j,k,l,m,n,o}	0,68±0,07 ^{d,e,f}	1,01±0,04 ^{b,c}
30	0,32±0,00 ^{k,l,m,n,o,p,q,r,s}	0,48±0,09 ^{g,h,i,j,k,l,m}	0,50±0,04 ^{f,g,h,i,j,k}	0,27±0,00 ^{n,o,p,q,r,s,t}
45	1,26±0,12 ^a	1,11±0,00 ^{a,b}	0,77±0,00 ^{d,e}	0,47±0,09 ^{g,h,i,j,k,l,m,n}
60	0,42±0,00 ^{g,h,i,j,k,l,m,n,o,p}	0,51±0,05 ^{f,g,h,i,j}	0,60±0,05 ^{e,f,g}	0,42±0,10 ^{g,h,i,j,k,l,m,n,o,p}
90	0,40±0,06 ^{h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	0,40±0,02 ^{h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r}	0,40±0,02 ^{h,i,j,k,l,m,n,o,p,q}	0,49±0,01 ^{f,g,h,i,j,k,l}
120	0,35±0,02 ^{j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	0,26±0,03 ^{o,p,q,r,s,t}	0,27±0,04 ^{o,p,q,r,s,t}	0,24±0,03 ^{p,q,r,s,t}
Almôndega de pescada cozida*				
Tempo (dias)	controle	urucum	coentro	urucum + coentro
0	0,58±0,05 ^{e,f,g,h}	0,82±0,05 ^{c,d}	0,34±0,03 ^{j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	0,38±0,09 ^{i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}
15	0,76±0,04 ^{d,e}	0,55±0,00 ^{f,g,h,i}	0,27±0,06 ^{o,p,q,r,s,t}	0,27±0,04 ^{o,p,q,r,s,t}
30	0,38±0,04 ^{i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	0,41±0,07 ^{g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q}	0,22±0,04 ^{q,r,s,t}	0,29±0,10 ^{m,n,o,p,q,r,s,t}
45	0,43±0,00 ^{g,h,i,j,k,l,m,n,o,p}	0,58±0,00 ^{e,f,g,h}	0,26±0,00 ^{o,p,q,r,s,t}	0,49±0,11 ^{f,g,h,i,j,k}
60	0,31±0,00 ^{k,l,m,n,o,p,q,r,s}	0,35±0,00 ^{j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	0,20±0,06 ^{s,t}	0,32±0,07 ^{k,l,m,n,o,p,q,r,s}
90	0,42±0,02 ^{g,h,i,j,k,l,m,n,o,p}	0,35±0,00 ^{j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}	0,30±0,00 ^{l,m,n,o,p,q,r,s,t}	0,22±0,00 ^{q,r,s,t}
120	0,11±0,01 ^t	0,21±0,00 ^{r,s,t}	0,31±0,00 ^{k,l,m,n,o,p,q,r,s}	0,32±0,03 ^{j,k,l,m,n,o,p,q,r,s}

*Média ± estimativa de desvio padrão. Letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa Teste de Tukey ($p>0,05$).

A Figura 9 apresenta os teores de 7-ceto após o cozimento das amostras, pode-se observar que para a maioria das amostras o tratamento térmico não influenciou a mudança deste óxido, embora as amostras adicionadas de coentro apresentaram algumas variações mais específicas e os teores deste óxido foram menores para as amostras cozidas em quase todos os tempos. Por outro lado, comparando-se o controle com as amostras adicionadas de coentro não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$).

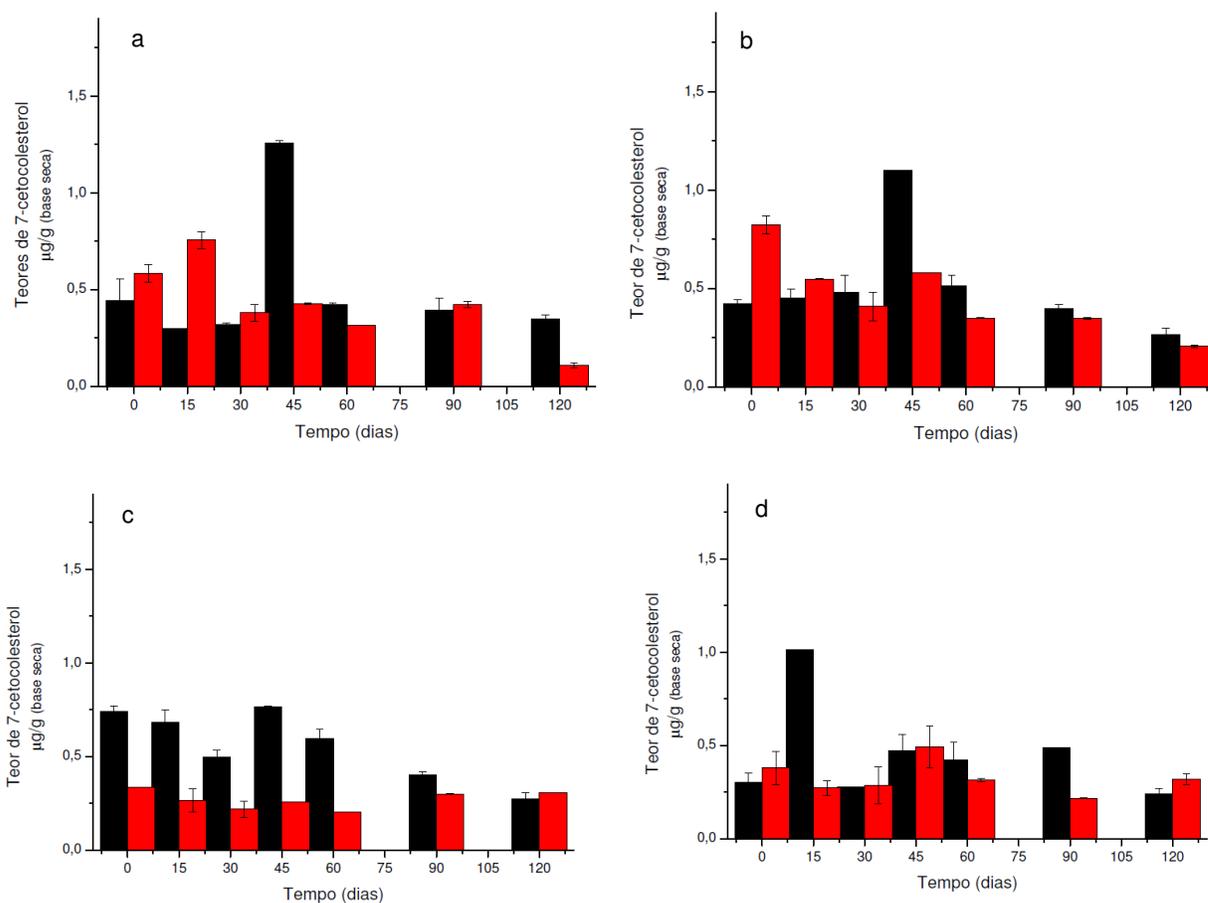


Figura 9. Concentração de 7-cetocolesterol ($\mu\text{g/g}$, base seca) em pescada branca, a) controle, b) 0,1% urucum, c) 0,5% coentro, e d) 0,1% urucum mais 0,5% coentro. Legenda: ■ amostras cruas ■ amostras cozidas. Os desvios padrões são determinados pelas barras.

O $7\beta\text{-OH}$ dentre os óxidos de colesterol encontrados em pescada branca foi o mais abundante nas amostras cruas e cozidas. Ohshima et al. (1996) também encontraram este óxido como majoritário em anchovas submetidas a tratamento térmico.

A Tabela 11 apresenta os teores de $7\beta\text{-OH}$ que variaram entre as amostras cruas de $6,80 \pm 0,40$ a $12,20 \pm 0,20 \mu\text{g/g}$ do tempo zero ao final de 120 dias e para as amostras cozidas esses teores foram de $6,74 \pm 0,02$ a $17,10 \pm 0,30 \mu\text{g/g}$ no mesmo período analisado.

No final do armazenamento, pode-se observar que as amostras cruas apresentaram um aumento no teor de $7\beta\text{-OH}$ para todas as amostras quando comparadas ao tempo zero. Durante o armazenamento houve aumento no teor deste

óxido de 72% para o controle, 70% para urucum e 67% para amostra adicionada de urucum mais coentro, porém sem diferença significativa ($p>0,05$) nas amostras adicionadas de coentro quando comparada ao tempo zero. Porém em 90 dias de armazenamento as amostras cruas condimentadas apresentaram seus maiores teores de 7β -OH quando comparadas as amostras controle no mesmo período, inclusive as amostras adicionadas de coentro que apresentou um aumento de 43%.

As amostras cozidas de pescada branca apresentaram um aumento no teor deste óxido no final da armazenagem em relação ao tempo zero, bem como ocorreu com as amostras cruas, porém as amostras cozidas adicionadas de coentro também apresentaram aumento.

Tabela 11 - Teores de 7β -hidroxicoolesterol ($\mu\text{g/g}$ de almôndega de peixe, base seca) em pescada branca crua e cozida, adicionada ou não de condimentos, armazenada a -18°C por 120 dias.

Almôndega de pescada branca crua*				
Tempo (dias)	controle	urucum	coentro	urucum + coentro
0	7,10±0,20 ^{o,p,q,r,s,t}	6,80±0,40 ^{o,p,q,r,s,t,u}	8,70±1,50 ^{j,k,l,m,n,o,p}	7,20±0,40 ^{m,n,o,p,q,r,s}
15	4,29±0,03 ^{t,u}	5,85±0,07 ^{p,q,r,s,t,u}	5,00±0,02 ^{s,t,u}	6,94±0,07 ^{o,p,q,r,s,t,u}
30	5,38±0,02 ^{q,r,s,t,u}	4,81±0,05 ^{s,t,u}	4,10±0,80 ^u	6,30±0,50 ^{p,q,r,s,t,u}
45	6,90±0,10 ^{o,p,q,r,s,t,u}	12,00±2,00 ^{f,g,h,i}	5,50±0,20 ^{q,r,s,t,u}	7,06±0,08 ^{o,p,q,r,s,t}
60	8,45±0,06 ^{l,m,n,o,p}	10,01±1,02 ^{h,i,j,k,l,m,n}	5,00±0,20 ^{r,s,t,u}	7,96±0,00 ^{l,m,n,o,p,q}
90	8,60±0,10 ^{k,l,m,n,o,p}	14,20±0,20 ^{b,c,d,e,f}	12,40±0,50 ^{f,g,h}	16,50±0,60 ^{a,b}
120	12,20±0,20 ^{f,g,h,i}	11,50±0,30 ^{f,g,h,i,j}	7,90±0,40 ^{l,m,n,o,p,q,r}	12,00±0,50 ^{f,g,h,i}
Almôndega de pescada branca cozida*				
Tempo (dias)	controle	urucum	coentro	urucum + coentro
0	11,50±0,80 ^{f,g,h,i}	6,74±0,02 ^{o,p,q,r,s,t,u}	10,30±0,60 ^{g,h,i,j,k,l}	8,10±0,90 ^{l,m,n,o,p,q}
15	8,60±0,30 ^{k,l,m,n,o,p}	5,30±0,40 ^{o,r,s,t,u}	9,47±0,20 ^{i,j,k,l,m,n,o}	9,50±0,20 ^{i,j,k,l,m,n,o}
30	7,60±0,30 ^{l,m,n,o,p,q,r,s}	5,05±0,01 ^{r,s,t,u}	7,18±0,05 ^{n,o,p,q,r,s}	10,08±0,04 ^{h,i,j,k,l,m}
45	7,10±0,50 ^{o,p,q,r,s,t}	4,20±0,30 ^{t,u}	13,00±1,80 ^{e,f,g}	14,01±0,04 ^{b,c,d,e,f}
60	8,00±0,10 ^{l,m,n,o,p,q}	6,90±2,10 ^{o,p,q,r,s,t,u}	11,40±0,10 ^{f,g,h,i,j,k}	12,20±0,20 ^{f,g,h,i}
90	15,40±0,50 ^{a,b,c,d,e}	13,00±2,00 ^{e,f,g}	13,23±1,03 ^{d,e,f}	14,10±0,20 ^{b,c,d,e,f}
120	16,17±0,06 ^{a,b,c}	16,10±0,20 ^{a,b,c,d}	13,60±0,60 ^{c,d,e,f}	17,10±0,30 ^a

*Média ± estimativa de desvio padrão. Letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) Teste de Tukey.

O cozimento da pescada branca favoreceu um aumento no teor de 7β -OH para a maioria das amostras, bem como pode ser visualizado na Figura 10. As amostras adicionadas de urucum apresentaram aumento no teor desses óxidos apenas em 120 dias, enquanto as demais amostras apresentaram aumento no teor de 7β -OH em quase todos os tempos, sendo este aumento mais pronunciado nas amostras adicionadas de coentro e urucum mais coentro.

Ohshima et al. (1996) encontraram altos teores deste óxido em anchovas após a grelhagem (64 $\mu\text{g/g}$, base seca), porém estes teores foram inferiores aos obtidos no presente trabalho. Saldanha e Bragagnolo (2007) não detectaram 7β -OH em pescada do atlântico nas amostras cruas e grelhadas.

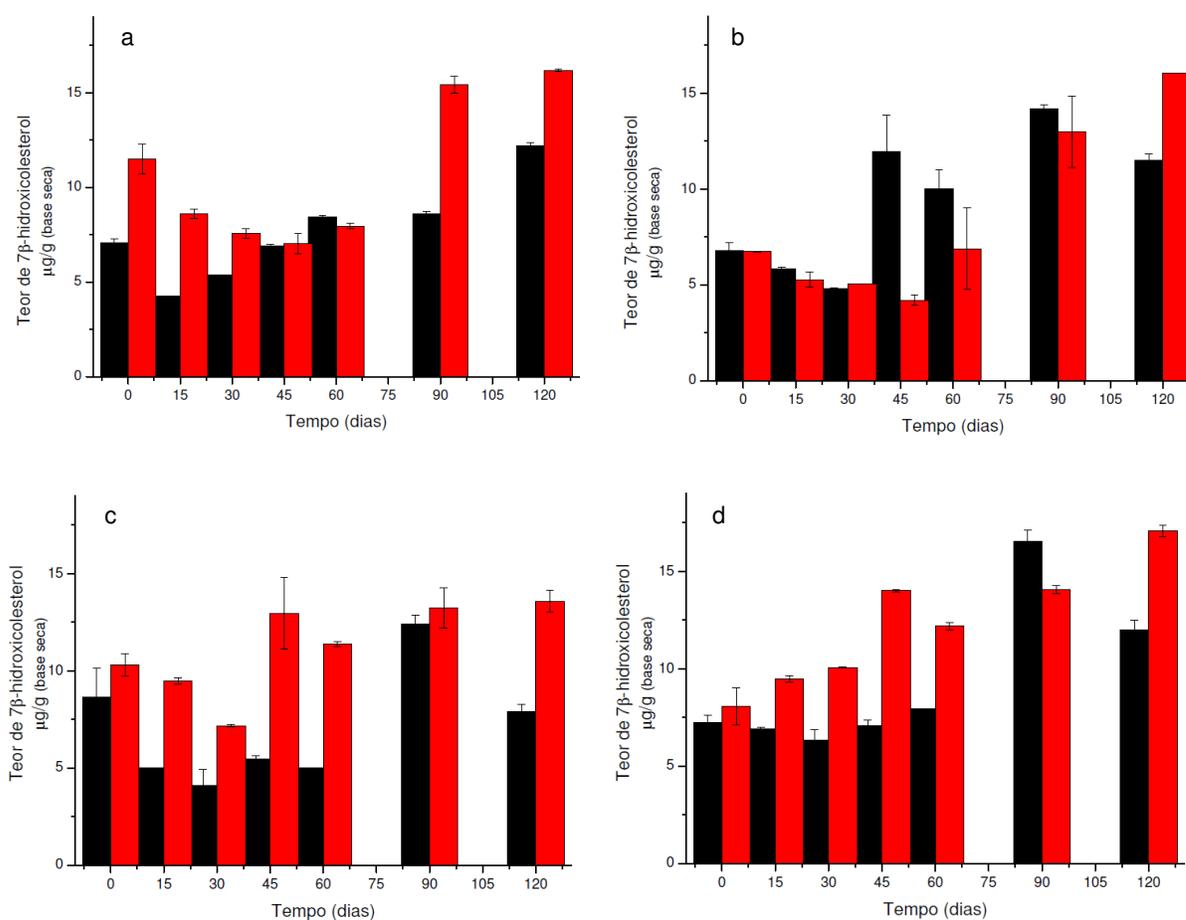


Figura 10. Concentração de 7β -hidroxicolesterol ($\mu\text{g/g}$, base seca) em pescada branca, a) controle, b) 0,1% urucum, c) 0,5% coentro, e d) 0,1% urucum mais 0,5% coentro. Legenda: ■ amostras cruas ■ amostras cozidas. Os desvios padrões são determinados pelas barras.

Os teores de 7α -OH nas amostras cruas de pescada branca variaram de $2,87 \pm 0,40$ a $10,20 \pm 0,60$ $\mu\text{g/g}$ na base seca e nas amostras cozidas esta variação foi de $3,74 \pm 0,23$ a $11,80 \pm 0,45$ $\mu\text{g/g}$ como demonstra a Tabela 12. Este foi o segundo óxido de colesterol mais abundante encontrado nas amostras analisadas, porém já foi descrito sua ausência em pescada do atlântico, em anchovas e sardinhas frescas (SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2008; OHSHIMA et al., 1996; OSADA et al., 1993). SALDANHA et al. (2006) encontraram $12,61$ $\mu\text{g/g}$ (base seca) de 7α -OH em bacalhau cru e Osada et al. (1993) obtiveram 27 $\mu\text{g/g}$ na base seca de 7α -OH em sardinha seca processada.

A pescada crua nas amostras controle, adicionadas de urucum e de coentro apresentaram aumento nos teores de 7α -OH a partir de 60 dias de armazenamento, já as amostras adicionadas de urucum mais coentro apresentaram aumento significativo ($p > 0,05$) somente a partir de 90 dias. Nas amostras cozidas controle e adicionada de urucum apresentaram um aumento no teor de 7α -OH em 60 dias, as demais tiveram os níveis deste óxido aumentado em 90 dias de armazenamento.

Como pode ser observado na Figura 11 o tratamento térmico não influenciou no aumento dos níveis de 7α -OH nas amostras controle e nas condimentada, visto que na maioria das amostras seus teores não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Teores de 7 α -hidroxicolesterol ($\mu\text{g/g}$ de almôndega de peixe, base seca) em pescada branca crua e cozida, adicionada ou não de condimentos, armazenada a -18°C por 120 dias.

Almôndega de pescada branca crua*				
Tempo (dias)	controle	urucum	coentro	urucum + coentro
0	4,30 \pm 0,90 ^{m,n,o,p,q,r,s,t}	2,87 \pm 0,40 ^{r,s,t}	5,00 \pm 0,70 ^{l,m,n,o,p,q,r}	4,80 \pm 0,20 ^{l,m,n,o,p,q,r}
15	5,38 \pm 0,02 ^{j,k,l,m,n,o,p,q}	4,81 \pm 0,05 ^{l,m,n,o,p,q,r}	4,11 \pm 0,84 ^{m,n,o,p,q,r,s,t}	6,33 \pm 0,54 ^{h,i,j,k,l,m,n}
30	5,05 \pm 0,39 ^{l,m,n,o,p,q,r}	3,32 \pm 0,04 ^{o,p,q,r,s,t}	2,32 \pm 0,29 ^{s,t}	3,57 \pm 0,63 ^{o,p,q,r,s,t}
45	6,46 \pm 0,09 ^{h,i,j,k,l,m}	5,66 \pm 0,06 ^{j,k,l,m,n,o,p}	5,20 \pm 0,14 ^{k,l,m,n,o,p,q,r}	4,98 \pm 0,28 ^{l,m,n,o,p,q,r}
60	8,18 \pm 0,40 ^{d,e,f,g,h,i}	9,03 \pm 1,55 ^{b,c,d,e,f,g}	9,75 \pm 1,09 ^{a,b,c,d,e,f}	4,14 \pm 1,03 ^{m,n,o,p,q,r,s,t}
90	8,76 \pm 0,09 ^{b,c,d,e,f,g,h,i}	10,68 \pm 1,16 ^{a,b,c}	10,10 \pm 0,80 ^{a,b,c,d,e}	9,50 \pm 0,20 ^{a,b,c,d,e,f,g}
120	9,70 \pm 0,80 ^{a,b,c,d,e,f}	10,20 \pm 0,60 ^{a,b,c,d,e}	9,83 \pm 0,70 ^{a,b,c,d,e,f}	9,21 \pm 0,09 ^{b,c,d,e,f,g}
Almôndega de pescada branca cozida*				
Tempo (dias)	controle	urucum	coentro	urucum + coentro
0	3,74 \pm 1,00 ^{o,p,q,r,s,t}	3,76 \pm 0,23 ^{o,p,q,r,s,t}	4,43 \pm 0,04 ^{m,n,o,p,q,r,s,t}	4,68 \pm 0,66 ^{m,n,o,p,q,r,s}
15	3,22 \pm 0,13 ^{p,q,r,s,t}	3,68 \pm 0,33 ^{o,p,q,r,s,t}	3,77 \pm 0,47 ^{o,p,q,r,s,t}	4,36 \pm 1,06 ^{m,n,o,p,q,r,s,t}
30	3,07 \pm 0,46 ^{q,r,s,t}	2,89 \pm 0,05 ^{r,s,t}	2,23 \pm 0,27 ^t	4,14 \pm 0,33 ^{m,n,o,p,q,r,s,t}
45	5,74 \pm 0,06 ^{i,j,k,l,m,n,o}	3,89 \pm 0,00 ^{n,o,p,q,r,s,t}	3,14 \pm 0,30 ^{q,r,s,t}	7,17 \pm 0,21 ^{g,h,i,j,k,l}
60	8,50 \pm 0,14 ^{c,d,e,f,g,h}	7,54 \pm 1,13 ^{f,g,h,i,j,k}	3,38 \pm 0,38 ^{o,p,q,r,s,t}	7,82 \pm 0,05 ^{e,f,g,h,i,j}
90	10,67 \pm 0,62 ^{a,b,c}	10,43 \pm 0,60 ^{a,b,c,d,e}	10,87 \pm 0,94 ^{a,b,c}	10,59 \pm 0,04 ^{a,b,c,d}
120	10,42 \pm 0,16 ^{a,b,c,d}	10,21 \pm 0,03 ^{a,b,c,d,e}	11,80 \pm 0,45 ^a	11,14 \pm 0,03 ^{a,b}

*Média \pm estimativa de desvio padrão. Letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) Teste de Tukey.

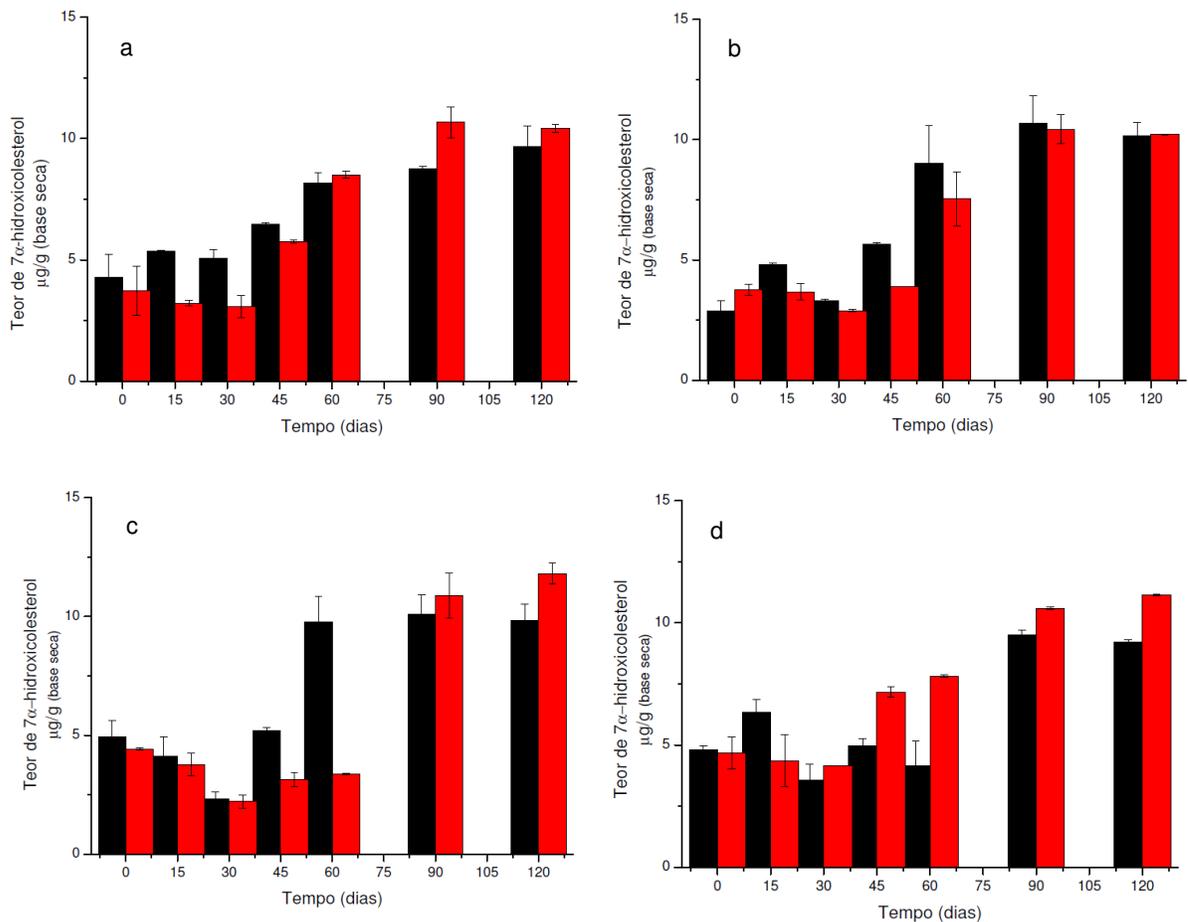


Figura 11. Concentração de 7α-hidroxicolesterol (μg/g, base seca) em pescada branca, a) controle, b) 0,1% urucum, c) 0,5% coentro, e d) 0,1% urucum mais 0,5% coentro. Legenda: ■ amostras cruas ■ amostras cozidas. Os desvios padrões são determinados pelas barras.

A Tabela 13 apresenta a somatória dos óxidos de colesterol em pescada branca crua e cozida. Observa-se o aumento dos óxidos totais no final do armazenamento em pescada branca crua cujos teores alcançaram de $18,00 \pm 1,11$ a $22,24 \mu\text{g/g}$ e em pescada cozida esses teores foram de $25,69 \pm 1,00$ a $28,54 \pm 0,35 \mu\text{g/g}$.

As amostras de pescada controle crua e cozida apresentaram o maior teor de óxidos de colesterol totais em 120 dias de armazenamento (70-88%), enquanto que as amostras condimentadas apresentaram os teores máximos em 90 dias de armazenamento nas amostras cruas e em 120 dias para as amostras cozidas apresentando um aumento de 117 a 150% nas amostras adicionadas de urucum, de

115 a 117% de urucum mais coentro, e de 60 a 77% de coentro. Estas diferenças entre os teores de óxidos formados são referentes a comparação de cada amostra ao longo de 120 dias em relação ao tempo zero, porém quando comparadas entre si e ao controle, estas diferenças não são estatisticamente significativas ($p>0,05$).

Tabela 13. Teores de óxidos de colesterol totais ($\mu\text{g/g}$ de almôndega de peixe, base seca) em pescada branca crua e cozida, adicionada ou não de condimentos, armazenada a -18°C por 120 dias.

Tempo (dias)	Almôndega de pescada branca crua*			
	controle	urucum	coentro	urucum+coentro
0	11,80±1,26 ^{o,p,q,r,s,t,u,v,w,x}	10,10±0,85 ^{r,s,t,u,v,w,x,y}	14,36±2,16 ^{k,l,m,n,o,p,q,r,s}	12,34±0,60 ^{n,o,p,q,r,s,t,u,v,w,x}
15	9,96±0,02 ^{s,t,u,v,w,x,y}	11,11±0,03 ^{p,q,r,s,t,u,v,w,x,y}	9,80±0,76 ^{t,u,v,w,x,y}	14,28±0,61 ^{k,l,m,n,o,p,q,r,t}
30	10,75±0,41 ^{q,r,s,t,u,v,w,x,y}	8,61±0,18 ^{w,x,y}	6,93±1,17 ^y	10,18±1,17 ^{r,s,t,u,v,w,x,y}
45	14,63±0,17 ^{k,l,m,n,o,p,q,r}	18,71±1,97 ^{f,g,h,i,j,k}	11,46±0,30 ^{o,p,q,r,s,t,u,v,w,x,y}	12,51±0,51 ^{n,o,p,q,r,s,t,u,v,w,x}
60	17,05±0,48 ^{h,i,j,k,l,m}	19,55±2,63 ^{e,f,g,h,i,j}	15,39±1,15 ^{j,k,l,m,n,o,p}	12,53±1,12 ^{m,n,o,p,q,r,s,t,u,v,w,x}
90	17,77±0,29 ^{g,h,i,j,k,l}	25,28±0,98 ^{a,b,c}	22,90±0,38 ^{b,c,d,e,f}	26,53±0,80 ^{a,b}
120	22,24±1,00 ^{b,c,d,e,f,g}	21,93±0,28 ^{c,d,e,f,g}	18,00±1,11 ^{g,h,i,j,k,l}	21,47±0,52 ^{c,d,e,f,g,h}
Tempo (dias)	Almôndega de pescada branca cozida*			
	controle	urucum	coentro	urucum+coentro
0	15,81±1,85 ^{i,j,k,l,m,n,o}	11,32±0,29 ^{o,p,q,r,s,t,u,v,w,x,y}	15,08±0,62 ^{j,k,l,m,n,o,p,q}	13,14±0,20 ^{m,n,o,p,q,r,s,t,u,v,w}
15	12,58±0,17 ^{m,n,o,p,q,r,s,t,u,v,w,x}	9,51±0,72 ^{v,w,x,y}	13,50±0,69 ^{l,m,n,o,p,q,r,s,t,u,v}	14,10±0,93 ^{l,m,n,o,p,q,r,s,t,u}
30	11,01±0,17 ^{p,q,r,s,t,u,v,w,x,y}	8,35±0,13 ^{y,x}	9,63±0,37 ^{u,v,w,x,y}	14,51±0,14 ^{k,l,m,n,o,p,q,r}
45	13,22±0,60 ^{m,n,o,p,q,r,s,t,u,v}	8,67±0,29 ^{w,x,y}	16,36±2,13 ^{i,j,k,l,m,n}	21,67±0,37 ^{c,d,e,f,g}
60	16,78±0,27 ^{i,j,k,l,m,n}	14,78±3,25 ^{k,l,m,n,o,p,q}	14,96±0,16 ^{k,l,m,n,o,p,q}	20,33±0,23 ^{d,e,f,g,h,i}
90	26,52±0,17 ^{a,b}	23,78±2,45 ^{b,c,d,e}	24,40±1,99 ^{a,b,c,d}	24,88±0,27 ^{a,b,c}
120	26,71±0,11 ^{a,b}	26,49±0,04 ^{a,b}	25,69±1,00 ^{a,b,c}	28,54±0,35 ^a

*Média ± estimativa de desvio padrão. Letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) Teste de Tukey.

A Figura 12 (a-h) apresenta o perfil dos óxidos de colesterol totais formados nas amostras cruas e cozidas ao longo do armazenamento.

Dentre os três óxidos formados, o 7-ceto foi o que menos contribuiu para o aumento nos teores de óxidos totais, devido aos seus baixos teores presentes nas amostras. Já o 7 β -OH e 7 α -OH foram os mais representativos em todas as amostras controle e as adicionadas de urucum, de coentro e de urucum mais coentro.

Avaliando o perfil dos óxidos totais formados durante o armazenamento, as amostras cruas apresentaram maior teor de óxidos de colesterol a partir de 90 dias nas amostras condimentadas, exceto o controle que atingiu seu teor máximo em 120 dias. Já as amostras cozidas controle, adicionada de urucum e de coentro apresentaram aumento nos níveis de óxidos totais em 90 dias chegando ao máximo em 120 dias, porém as amostras adicionadas de urucum mais coentro apresentaram um aumento significativo ($p>0,05$) e progressivo a partir de 45 dias chegando ao máximo em 120 dias.

Em geral, as amostras de pescada branca após o cozimento não sofreram alterações nos níveis dos óxidos de colesterol totais, indicando que o tratamento térmico não influenciou na formação dos óxidos significativamente ($p>0,05$), e os condimentos utilizados não exerceram efeito protetor e nem prooxidativo, visto que as amostras controle apresentaram comportamento semelhante às demais amostras condimentadas.

Al-Saghir et al. (2004) avaliaram o efeito do tratamento térmico em salmão cozido em vapor (12 min) e frito em diversos óleos de origem vegetal (6 min), observaram que após o tratamento térmico houve um aumento de 1000 vezes de óxidos totais nas amostras cozidas, enquanto que para as amostras fritas houve um aumento de mais de 300 vezes. O tempo de preparo pode influenciar na formação dos óxidos, visto que o tempo para o cozimento do salmão foi o dobro em relação às amostras fritas. Shozen, Ohshima e Ushio (1995) encontraram altos níveis de óxidos totais em lula processada (50,4 $\mu\text{g/g}$, base seca) que após a grelhagem não sofreu alteração (50,3 $\mu\text{g/g}$, base seca). Por outro lado, observaram um aumento no teor de óxidos totais em arenque do pacífico que inicialmente apresentava 136,5 $\mu\text{g/g}$ (base seca) e depois de grelhado apresentou 156 $\mu\text{g/g}$ na base seca. Portanto além do tempo e o tipo de tratamento térmico empregado, a variedade de peixe pode influenciar na formação ou não dos óxidos de colesterol.

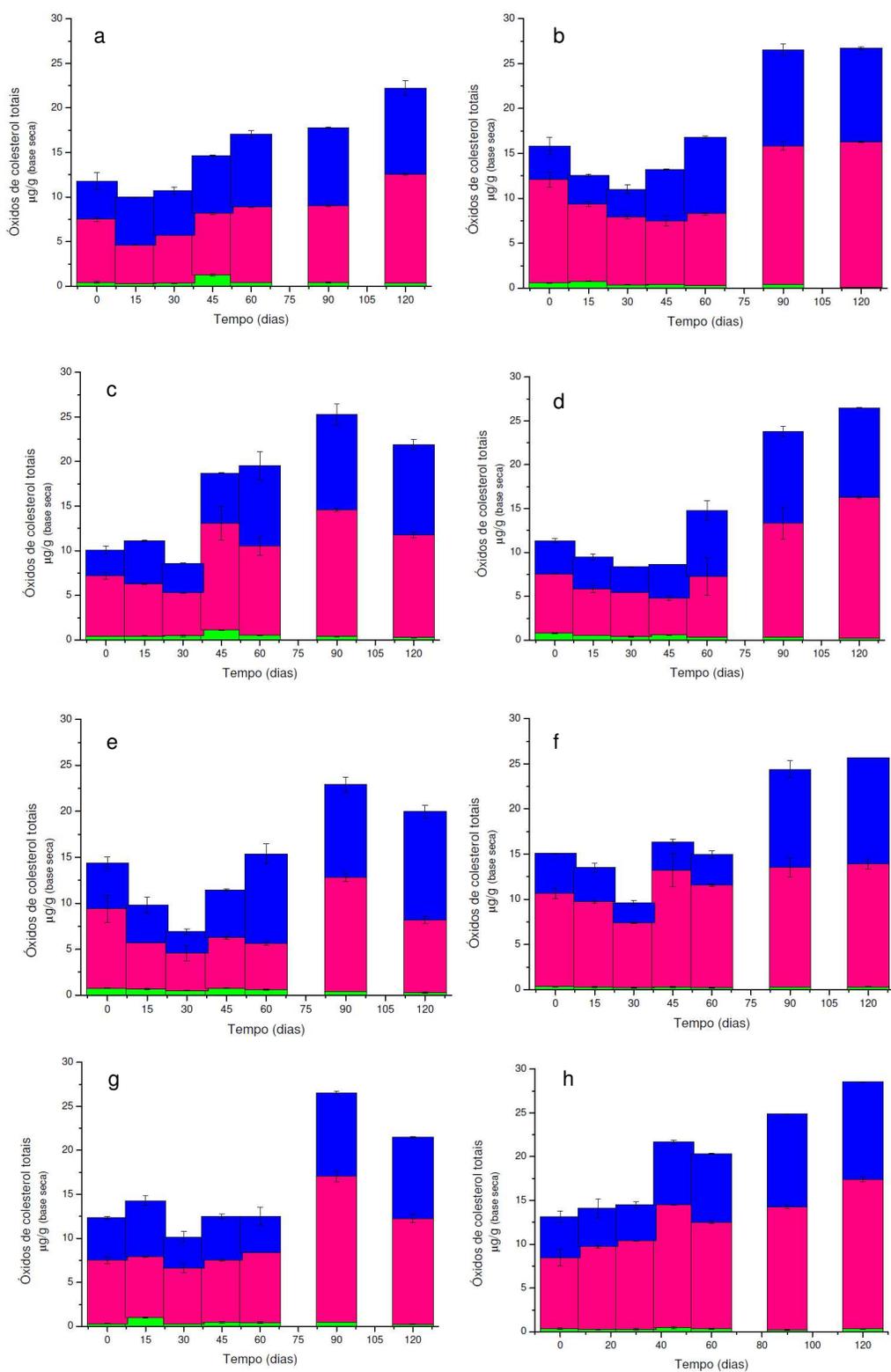


Figura 12. Concentração dos óxidos de colesterol totais ($\mu\text{g/g}$, base seca) em pescada branca, a) controle cru, b) controle cozida, c) urucum cru, d) urucum cozida, e) coentro cru, f) coentro cozida, g) urucum mais coentro cru, e h) urucum mais coentro cozida. Legenda: ■ 7 α -hidroxicolesterol, ■ 7 β -hidroxicolesterol, ■ 7-cetocolesterol. Os desvios padrões são determinados pelas barras.

A Tabela 14 apresenta a taxa de oxidação de colesterol é expressada pela razão entre óxidos de colesterol totais e a concentração de colesterol na amostra expressa em porcentagem (MARIUTTI, 2009). Nota-se que a taxa de oxidação alcançou 1% de oxidação do colesterol entre as amostras cruas e cozidas de pescada branca nos tempos 90 e 120 dias de armazenamento. Essa taxa de oxidação em pescada branca foi menor quando comparadas a oxidação de colesterol em peito de frango cru e grelhado durante o armazenamento de 90 dias, sendo 4,7 e 5,0%, respectivamente (MARIUTTI, 2009).

Tabela 14. Taxa de oxidação (óxidos totais/colesterol) (%) em pescada crua e cozida, adicionada ou não de condimentos, armazenada a -18°C por 120 dias.

Tempo (dias)	Almôndega de pescada crua*			
	controle	urucum	coentro	urucum+coentro
0	0,47±0,07 ^{p,q,r,s,t}	0,42±0,04 ^{q,r,s,t}	0,58±0,10 ^{k,l,m,n,o,p,q,r}	0,53±0,03 ^{l,m,n,o,p,q,r,s}
15	0,40±0,00 ^{r,s,t}	0,46±0,02 ^{p,q,r,s,t}	0,40±0,03 ^{r,s,t}	0,62±0,02 ^{j,k,l,m,n,o,p}
30	0,44±0,02 ^{p,q,r,s,t}	0,35±0,01 ^{s,t}	0,28±0,04 ^t	0,43±0,04 ^{p,q,r,s,t}
45	0,58±0,01 ^{k,l,m,n,o,p,q,r}	0,76±0,07 ^{f,g,h,i,j,k}	0,47±0,01 ^{p,q,r,s,t}	0,53±0,00 ^{l,m,n,o,p,q,r,s}
60	0,70±0,04 ^{h,i,j,k,l,m,n}	0,80±0,12 ^{e,f,g,h,i,j}	0,62±0,06 ^{j,k,l,m,n,o,p}	0,52±0,06 ^{m,n,o,p,q,r,s}
90	0,71±0,02 ^{g,h,i,j,k,l,m}	1,04±0,04 ^{a,b,c,d}	0,94±0,00 ^{a,b,c,d,e,f}	1,10±0,06 ^{a,b}
120	0,86±0,00 ^{d,e,f,g,h,i}	0,91±0,02 ^{b,c,d,e,f,g}	0,72±0,03 ^{g,h,i,j,k,l}	0,92±0,05 ^{a,b,c,d,e,f}
Tempo (dias)	Almôndega de pescada cozida*			
	controle	urucum	coentro	urucum+coentro
0	0,56±0,04 ^{k,l,m,n,o,p,q,r}	0,44±0,03 ^{p,q,r,s,t}	0,61±0,02 ^{j,k,l,m,n,o,p,q}	0,50±0,01 ^{o,p,q,r,s}
15	0,46±0,00 ^{p,q,r,s,t}	0,39±0,04 ^{r,s,t}	0,56±0,02 ^{k,l,m,n,o,p,q,r}	0,56±0,05 ^{k,l,m,n,o,p,q,r}
30	0,42±0,01 ^{p,q,r,s,t}	0,34±0,01 ^{s,t}	0,40±0,01 ^{r,s,t}	0,58±0,02 ^{k,l,m,n,o,p,q,r}
45	0,51±0,01 ^{n,o,p,q,r,s}	0,36±0,00 ^{s,t}	0,69±0,09 ^{h,i,j,k,l,m,n}	0,87±0,02 ^{c,d,e,f,g,h}
60	0,67±0,04 ^{i,j,k,l,m,n,o}	0,62±0,14 ^{j,k,l,m,n,o,p}	0,61±0,02 ^{j,k,l,m,n,o,p,q}	0,80±0,00 ^{e,f,g,h,i,j}
90	1,03±0,02 ^{a,b,c,d}	0,96±0,9 ^{a,b,c,d,e}	0,97±0,07 ^{a,b,c,d,e}	1,00±0,03 ^{a,b,c,d,e}
120	1,02±0,01 ^{a,b,c,d}	1,07±0,07 ^{a,b,c}	1,03±0,03 ^{a,b,c,d}	1,11±0,03 ^a

*Média ± estimativa de desvio padrão. Letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa (p>0,05) Teste de Tukey.

6. CONCLUSÕES

A bixina em pescada branca não apresentou alterações significativas no seu teor durante o armazenamento por 120 dias a -18°C e após o cozimento das amostras.

A umidade após o tratamento térmico reduziu seu teor no máximo de 8% nas amostras controle e condimentadas, porém o armazenamento não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) em seus teores para a maioria das amostras.

O teor de lipídios totais em pescada branca não apresentou mudanças significativas ($p>0,05$) após o tratamento térmico. No entanto, ao longo de 120 dias de armazenamento houve redução em seu teor de até 20%, provavelmente devido à oxidação lipídica.

O nível de colesterol na base seca na pescada branca não apresentou mudança durante o armazenamento e tratamento térmico.

Foram identificados e quantificados em pescada branca crua e cozida três óxidos de colesterol, o $7\beta\text{-OH}$ como o mais abundante, seguido do seu isômero $7\alpha\text{-OH}$ e por último com menor teor de 7-ceto. Além disso, foram identificados os epóxidos $5,6\alpha\text{-epoxicolesterol}$ e $5,6\beta\text{-epoxicolesterol}$ no espectrômetro de massas, os quais não foram quantificados por estarem abaixo do limite de detecção no detector de índice de refração.

O tratamento térmico e o armazenamento não alteraram os níveis de 7-ceto entre as amostras controle e condimentadas, exceto as amostras cruas contendo coentro que apresentaram menores teores quando comparadas a pescada cozida adicionada de coentro. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) das amostras contendo coentro com as amostras controle, portanto não se pode inferir que este condimento apresentou um efeito antioxidante.

A pescada branca contendo urucum, urucum mais coentro e controle apresentaram um aumento no teor de $7\beta\text{-OH}$ em torno de 70% e as amostras contendo coentro o aumento deste óxido foi de 43% ao longo dos 120 dias de armazenamento.

Embora para as amostras adicionadas de coentro tiveram um menor aumento, não houve diferença significativa destas amostras das tratadas com urucum. O tratamento térmico favoreceu o aumento deste óxido para todas as amostras, porém as amostras contendo urucum apresentaram um aumento significativo somente em 120 dias. E os maiores teores de 7β -OH foram nas amostras contendo urucum mais coentro.

O teor de 7α -OH em pescada branca apresentou um aumento entre as amostras controle e condimentadas a partir de 60 dias de armazenamento, e o cozimento não alterou os níveis deste óxido para a maioria das amostras.

Considerando os óxidos de colesterol totais o armazenamento propiciou um aumento nos óxidos nas amostras controle, adicionadas de urucum, de coentro e de urucum mais coentro, porém as amostras condimentadas não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) quando comparadas as amostras controle, indicando que não houve proteção dos condimentos frente à oxidação do colesterol. De maneira geral, o tratamento térmico não modificou o teor dos óxidos de colesterol totais em pescada branca, pois na maioria das amostras não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ACKMAN, R. Fatty acids. In:_____. **Marine biogenic lipids, fats and oils**. Boca Raton: CRC Press,1989. p.103-137.

AL-SAGHIR,S. et al. Effects of different cooking procedures on lipids quality and cholesterol oxidation of farmed salmon fish (*Salmo salar*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, 5290-5296, 2004.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of the **Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16. ed. Washington: AOAC, 1997.

BANDYOPADHYAY, M; CHAKRABORTY, R.; RAYCHAUDHURI, U. Incorporation of herbs into sandesh, an Indian sweet dairy product, as a source of natural antioxidants. **International Journal of Dairy Tecnology** , v. 60, n.3, 228-233, 2007.

BARLOW, S.M. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In: Hudson, B. J. F. **Food Antioxidants**. England: Elsevier Science Publishers Ltd, 1990. p. 253–307.

BÉLTRAN, A.; MORAL, A. Gas chromatographic estimation of oxidative deterioration in sardine during frozen storage. **Food Science And Technology-Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**,v. 23,499–504, 1990.

BOHN, T. et al. Chlorophyll-bound magnesium in commonly consumed vegetables and fruits: relevance to magnesium nutrition. **Journal Food Science**, v. 69, n. 9, 347-350, 2004.

BÖSINGER, S.; LUF, W.; BRANDL,E. Oxysterols: Their occurrence and biological effects. **International Dairy Journal**, v.3, 1-33, 1993.

BRAGAGNOLO, N. Cholesterol and Cholesterol Oxides in Meat and Meat Products. In: NOLLET, L.M.L., TOLDRÁ, F. **Handbook of Muscle Food Analysis**. London: CRC Press, 2009. p.183-213.

BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. Britton, G., Liaaen-Jensens, S., Pfander, H. **Carotenoids Vol. 1B:Spectroscopy**. Birkhauser Verlag: Basel, Switzerland, 1995, 13-62.

BROWN, M. R. et al. Nutricional properties of microalgae for microculture. **Aquaculture**, v. 151, 315-331, 1997.

BURR, M. L. Fish food, fish oil and cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 14, 181–192, 1992.

*Baseada na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

CANDELA, M.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Effects of frying and wormholding on fatty acids and cholesterol of sole (*Solea solea*), codfish (*Gadus morrhua*) and hake (*Merluccius merluccius*). **Food Chemistry**, v. 58, n. 3, 227-231, 1997.

CASTRO, W.F. **Avaliação do efeito protetor do colorífico como antioxidante atural na oxidação lipídica em carne de frango**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CARDARELLI, C.R.; BENASSI, M. de T.; MERCADANTE, A.Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, 1689-1693, 2008.

CONTO, W.L. et al. **Estudos econômicos de alimentos processados**. Campinas: Ital – Instituto de Tecnologia de Alimentos, 65 p, 1991.

CRAIG, W.J. Health-promoting properties of common herbs. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, 491-499, 1999.

DAMODOBAN, N.D.; GOPAKAMUR, K.. ATPase y lactate dehydrogenase activities in frozen stored fish muscle as indices of cold storage deterioration. **Journal Food Science**, v. 57, 72-76, 1992.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. Chemicals and Colorants as Nutraceuticals, In:_____. **Natural colorants for food and nutraceutical uses**. United States: CRC Press LLC, p. 257-305, 2003.

ECHARTE, M.; ZULET, M.A.; ASTIASARAN, I. Oxidation process affecting fatty acids and cholesterol in fried and roasted salmon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, 5662-5667, 2001.

EDWARDS, P.A.; ERICSSON, J. Sterol and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, 157-185, 1999.

Food and Agriculture Organization: FAO. **Fisheries and Aquaculture Statistics.2006/FAO**. Rome: FAO, 2008. 49 p.

Food and Agriculture Organization: FAO/WHO. **Food and Nutrition Paper 25**. Rome: FAO/WHO, 1982. 22 p.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, 265–275, 1957.

GALINDO-CUSPINERA, V.; LUBRAN, M. B.; RANKIN, S.A. Comparison of volatile compounds in water- and oil-soluble annatto (*Bixa orellana* L.) extracts. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 2010-2015, 2002.

GARCIA-CRUSSET,S. et al. Cholesterol oxidation products and atherosclerosis. In: GUARDIOLA,F., DUTTA,P.C., CODONY, R., SAVAGE, G.P. **Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects**. Illinois: AOCS Press, 2002.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.; OLIVEIRA, C.A.F. Qualidade do Pescado. In: _____.**Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3 ed. Barueri: Manole, 2008. p.161-177.

GIL, A. Polyunsaturated fatty acids and inflamatory diseases. **Biomedicine And Pharmacotherapy**, v. 56, 388-396, 2002.

GOLDSTEIN, J.L.; KITA, T.; BROWN, M.S. Defective lipoprotein receptor and atherosclerosis. **New England Journal of Medicine** v. 309, 288-296, 1983.

GUARDIOLA, F. et al. Biological effects of oxysterols: current status. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n.2, 193-211, 1995.

GUERRA, N.B.; MELO, E. A.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant compounds from coriander (*Coriander sativum* L.) etheric extract. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, 193-199, 2005.

HAILA, K.M.; LIEVONEN, S.M.; HEINONEN, M. Effects of lutein, lycopene, annatto, and γ -tocopherol on autoxidation of triglycerides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, 2096-2100, 1996.

HAN, T.J.; LISTON, J. Correlation between lipid peroxidation and phospholipid hydrolysis in frozen fish muscle. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 6, 1917-1918, 1988.

HATANO, S. Effect of freezing and storage on the enzyme activities. **Refrigeration**, v. 43, 14-20, 1968.

HULTIN, H.O. Characteristics of muscle tissue. In: Fennema, O.R., Food Chemistry, 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS: IBAMA. **Estatística da pesca: Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. Brasília, Distrito Federal, 2007. 113 p.

KANDUTSCH, A.A.; CHEN, H.W. Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by 7α -hydroxycholesterol, 7β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol. **The Journal of Biology Chemistry**, v.245, n. 24, 8408-8417, 1973.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, 153-161, 2002.

KOPSELL, D.A. et al. Variation in lutein, β -carotene and chlorophyll concentrations among *Brassica oleracea* cultivars and seasons. **Hort Science**, v.39, n. 2, 361-364, 2004.

KUSSI, T.; NIKKILA, D.E.; SAROLAINEN, K. Formation of malonaldehyde in frozen Baltic herring and its influence on changes in protein. **LWT- Food Science And Technology**, v. 159, 285-290, 1975.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, 143–181, 2000.

LARA, W. H. Monografias de Corantes Naturais para Fins Alimentícios. **Padrões de Identidade e Qualidade**, São Paulo, p. 22-29, 1984.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 4 ed. New York: Sarvier, 2007, 1.232 p.

LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, T. Cholesterol oxidation mechanisms. In: GUARDIOLA, F.; DUTTA, P.; CODONY, R.; SAVAGE, G.P. **Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects**. New York: AOAC Press, 2002, p.1-25.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L, Douce, R, Eds. **Methods in Enzymology**. Academic Press, London, UK, v. 148: 350-381, 1987.

LUGASI, A. et al. Effect of pre-soaking whole pelagic fish in a plant extract on sensory and biochemical changes during subsequent frozen storage. **LWT- Food Science And Technology**, v. 40, 930-936, 2007.

MADHAVI, D.H.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. **Food Antioxidantes. Technological, Toxicological, and Health Perspectives**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996. p. 5-63.

MARIUTTI, L.R.B. et al. Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n.6, 1225-1232, 2008a.

MARIUTTI, L. R. B. et al. 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**, v. 56, 2913-2918, 2008b.

MARIUTTI, L.R.B. Efeito da adição de sálvia e alho na oxidação lipídica em carne de frango 2009. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MARQUEZ, U. M. L. ; SINNECKER, P. Chlorophylls in Foods: Sources and Stability. In: SOCACIU, C. **Food Colorants: Chemical and Functional Properties**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2007, p. 195-211.

- MELO, E. A.; MANCINI-FILHO, J.; GUERRA, N. B. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriander sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, 195-199, 2003.
- MERCADANTE, A. Z. . Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage. In: Carmen Socaciu. (Org.). **Food Colorants: Chemical and Functional Properties**. Boca Raton: CRC, 2008, v. 1, p. 213-239.
- MERCADANTE, A. Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agriculture and Food Chemistry**, v. 2, 79-91, 1998.
- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Caracterização de um novo carotenóide minoritário de urucum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.2, 193-196, 2001.
- MONTENEGRO, M.A. et al. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. **Photochem Photobiology**, v.75, 353-361, 2002.
- MONTENEGRO, M.A., et al. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, 367-373, 2004.
- MSAADA, K. et al. Changes on essential oil composition of coriander (*Coriander sativum* L.) fruits during three stages of maturity. **Food Chemistry**, v.102, 1131-1134, 2007.
- NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 225–319.
- NEFFATI, M.; MARZOUK, B. Changes in essencial oil and fatty acid composition in coriander (*Coriander sativum* L.) leaves under saline conditions. **Industrial crops and products**, v. 28, 137-142, 2008.
- OKLAND, H.M.W. et al. Proximate composition, fatty acid and lipid class composition of the muscle from deep-sea teleost and elasmobranchs. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 140, 437-443, 2005.
- OHSHIMA, T.; LI,N.; KOUZUMI,C. Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. **Journal the Americam Oil Chemistis' Society**,v.70, 595-600, 1993.
- OHSHIMA,T. et al. Effects of grilling on formation of cholesterol oxides in seafood products rich in polyunsaturated fatty acids. **LWT- Food Science And Tecnology**, v.29, 94-99, 1996.
- OHSHIMA, T. Formation and content of cholesterol oxidation products in seafood and seafood products. In: GUARDIOLA, F. *et al.*, **Cholesterol and phytosterol oxidation products in foods and biological samples: Analysis, occurrence and biological effects**. New York: AOAC Press. 2002. p.187–203.
- OSADA, K., et al. Levels and formation of oxidized cholesterol in processed marine foods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41,1893-1898, 1993.

OSMAN, H.; SURIAH, A.R.; LAW, E.C. Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian waters. **Food Chemistry**, v. 73, 55-60, 2001.

PANIANGVAIT, P. et al. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **Journal of Food Science**, v. 60, 1159–1174, 1995.

PIAGENTINI, A.M.; GÜEMES, D.R.; PIROVANI, M.E. Sensory characteristics of freshcut spinach preserved by combined factors methodology, **Journal of Food Science**, v. 67, n. 4, 1544-49, 2002.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. Antioxidantes in food. In _____. **Practical applications**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 380 p.

RAMADAN, M.F.; AMER, M.M.A. Coriander (*Coriander sativum* L) seed oil improves plasma lipid profile in rats fed a diet containing cholesterol. **European Food Research Technology**, v. 227, 1173-1182, 2008.

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

REN, H. et al. Effect of chinese parsley *Coriander sativum* and chitosan on inhibiting the accumulation of cadmium in cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science**, v. 72, 263-269, 2006.

RIOS, A.O.; MERCADANTE, A.Z.; BORSARELLI, C.D. Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. **Dyes and Pigments**, v.74, 561-565, 2007.

ROSE-SALLIN, C. et al. Mecanismos d'oxydation du cholesterol: un article de synthese. OCL-Oleagineux, Corps Gras, **Lipids**, v. 3, 227–235, 1996.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. **New England Journal of Medicine**, 314, 488-500, 1986.

ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, 5062-5072, 2007.

SALDANHA, T.; BENASSI, M. T.; BRAGAGNOLO, N. Fatty acid contents evolution and cholesterol oxides formation in Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) as result of frozen storage followed by grilling. **LWT- Food Science And Tecnology**, v. 41, n. 7, 1301-1309, 2008.

SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N. Cholesterol oxidation is increased and PUFA decreased by frozen storage and grilling of Atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). **Lipids**, v. 42, 671-678, 2007.

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 Chemistry**, v. 106, 619-627, 2008.

SALDANHA, T. et al. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV and APCI-MS detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, 4107-4113, 2006.

SARMA, J.; REDDY, G.V.S.; SRIKAR, L.N. Effect of frozen on lipids and functional properties of proteins of dressed Indian iol sardine (*Sardinella longiceps*). **Food Research International**, v. 33, 815-820, 2000.

SCOTTER, M.J.; CASTLE, L.; APPLETON, G.P. Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in foods. **Food Chemistry**, v. 74, 365-375, 2001.

SEBBEN, C.L. et al. Rendimento e avaliação sensorial de hambúrgueres de carpa (*Cyprinus carpio*) com diferentes condições de processamento e armazenagem sob congelamento. **B.CEPPA**, v. 18, 1-12, 2000.

SEN, C. S.; HWANG D. C.; JIANG, S. T. Effect of storage temperatures on the formation of disulfides and denaturation of milkfish myosin (*Chanos chanos*). **Journal the of Agriculture and Food Chemistry** v.37, n.5, 1228-1231, 1989.

SHIRAI, N.; TERAYAMA, M.; TAKEDA, H. Effect of season on the fatty acid composition and free amino acid content of the sardine *Sardinops melanostictus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 131, 387-393, 2002.

SHOZEN, K.; OHSHIMA, T.; USHIO, H. Formation of Cholesterol Oxides in marine Fish Products Induced by Grilling. **Fisheries Science** v. 61, n. 5, 817-821, 1995.

SIDDAIAH, D. et al. Changes in lipids, proteins and komaboko forming ability of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) mince during frozen storage. **Food Research International**, v. 34, 47-53, 2000.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**, v. 299, 152-178, 1999.

SMITH, L.L. Cholesterol autoxidation 1981-1986. **Chemical Physical Lipids**, v. 44, 87-125, 1987.

SMITH, L. L. Review of progress in sterol oxidation: 1987-1995. **Lipids**, V. 31, 453-487, 1996.

SUZUKI, T. Fish and Krill Protein: Processing Technology. London: **Applied Science**, Publishers, Barking, Essex 1981.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISA EM ALIMENTAÇÃO: NEPA-UNICAMP. Tabela Brasileira de Composição De Alimentos: TACO. Versão II – 2. ed. – Campinas: NEPA/UNICAMP, 2006. 113 p.

TESHIMA, S. Sterols of Crustaceans, Molluscs and Fish. In: PATTERSON, G.W., NES, W.D. **Physiology and Biochemistry of Sterols**. Champaign, Illinois: American Chemists' Society, p. 29-256, 1992.

TROLLER, J.A. Influence of water activity on microorganism in food. **Food Technology**, v. 34, 76, 1980.

WANGENSTEEN, H.; SAMUELSEN, A.B.; MALTERUD, K.E. Antioxidant activity in extracts from coriander. **Food Chemistry**, v. 88, 293-297, 2004.

WASOWICZ, E. Cholesterol and Phytosterols. In: SIKORSKI, Z.E., KOLAKOWSKA, A. **Chemical and functional properties of food lipids**. U.S.A: CRC Press LLC, 2003.

WITSCHI, H.; LOCK, S. Toxicity of butylated hydroxy toluene in mouse following oral administration. **Toxicology, Shannon**, v. 9, 137-46, 1978.

WONG, S.P., LEONG, L.P., KOH, J.H.W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v.99, 775-783, 2006.

VENUGOPAL, V.; CHAWLA, S.P.; NAIR, P.M. Spray dried protein powder from threadfin beam: preparation properties and comparison with FPC type-B. **Journal Muscle Foods**, v.7, 55-59, 1996.

VIRGÍLIO, I.G.F. Sementes da mudança. **Agroanalysis**, 13-15, 2001.

YANCEY, P.H.; BLAKE, W.R.; CONLEY, J. Unusual organic osmolytes in deep-sea animals: adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 133, 667-676, 2002.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.; POKORNÝ, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal Lipid Science Technology**, v.108, 776-793, 2006.

ZAMARIA, N. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. **Reproduction Nutrition Development**, v.44, n.1, 273-82, 2004.

ZHANG, J.; DRICU, A.; SJÖVALL, J. Studies on the relationships between 7 α -hydroxycholesterol and the ability of 25- and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1344, 241-249, 1997.