

MARIA TEREZA DE FREITAS

**IMPACTO DE MÉTODOS DE COCÇÃO NO
TEOR DE COLESTEROL E
7-CETOCOLESTEROL E NA COMPOSIÇÃO DE
FILÉS DE MERLUZA (*Merluccius hubbsi*) E DE
PESCADA-BRANCA (*Cynoscion leiarchus*)**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2014

MARIA TEREZA DE FREITAS

**IMPACTO DE MÉTODOS DE COCÇÃO NO TEOR
DE COLESTEROL E
7-CETOCOLESTEROL E NA COMPOSIÇÃO DE
FILÉS DE MERLUZA (*Merluccius hubbsi*) E DE
PESCADA-BRANCA (*Cynoscion leiarchus*)**

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Coorientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2014

Freitas, Maria Tereza de.

F866i Impacto de métodos de cocção no teor de colesterol e 7-cetocolesterol e na composição de filés de merluza (*Merluccius hubbsi*) e de pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) / Maria Tereza de Freitas. – 2014.
162 f. : il.

Orientador: Roberto Gonçalves Junqueira
Coorientador: Robson José de Cássia Franco Afonso

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Tratamento térmico - Teses. 2. Peixe - Teses. 3. Colesterol - Teses. 4. Cromatografia gasosa - Teses. 5. Espectrometria de massas – Teses. I. Junqueira, Roberto Gonçalves. II. Afonso, Robson José de Cássia Franco. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 612.12



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

MARIA TEREZA DE FREITAS

Impacto de métodos de cocção no teor de colesterol e 7-cetocolesterol
e na composição de filés de merluza (*Merluccius hubbis*) e de
pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*).

TESE APROVADA EM 23 DE SETEMBRO DE 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. NEURA BRAGAGNOLO

Prof. Dr. ROBSON JOSÉ DE CÁSSIA FRANCO AFONSO
Coorientador

Prof. Dr. SIDNEY AUGUSTO VIEIRA FILHO

Prof. Dr. ROBERTO GONÇALVES JUNQUEIRA
Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. SCHEILLA VITORINO CARVALHO DE SOUZA FERREIRA

Profa. Dra. SILVANA DA MOTTA

Dedico este trabalho

A Deus, meu guia, minha força.

À minha família tão amada (Casa das sete mulheres: Mamy, Lu, Ene, Debinha, Gabi, Cacá, Juju) e ao querido Yuri.

Ao meu Pai, que mesmo presente em outro plano é meu grande orgulho e exemplo.

Ao meu marido Geraldo, meu grande incentivador.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG).

À Universidade Federal de Ouro Preto, Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas (Departamento de Química), Laboratório de Técnica Dietética e de Bromatologia (Departamento de Alimentos).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Especialmente à minha família e ao meu marido Geraldo Leão por todos os “empurrões” e torcida para que eu vencesse as dificuldades enfrentadas.

A todas as pessoas que contribuíram para realização deste trabalho com orientações, apoio financeiro, críticas, sugestões, empréstimos de materiais, conserto de equipamentos, “inventos”, apoio moral e humano, paciência, enfim por tudo, muito obrigada:

Ao Prof. Roberto Gonçalves Junqueira (Orientador).

Ao Prof. Robson José de Cássia Franco Afonso (Coorientador).

Ao Prof. Maurício Xavier Coutrim.

À Profa. Cláudia Antônia Alcântara Amaral (amiga-irmã).

Ao Prof. Aureliano Claret da Cunha.

À Profa. Alcení Augusta Werle.

À Banca Examinadora: Profa. Neura Bragagnolo, Profa. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira, Prof. Sidney Augusto Vieira Filho, Profa. Silvana da Motta.

Aos bolsistas: André Fernando Barcelos, Renata Reis Trópia, Francyele Maia Sobreira e Leide Pâmela Pereira da Silva.

Aos amigos: Cristiane Vilas Boas Neves, Fabiana Aparecida Rodrigues, Flávia Alessandra Botaro, Glaucy Rodrigues de Araújo, Graziela Luciana da Silva, Letícia Terrone Pierre, Margarete Nimer, Margarete Aparecida Santos, Simone de Fátima Viana da Cunha, Vanessa Moraes Bezerra.

Aos funcionários do RU, em especial à Nilma Luiza de Moura Rodrigues.

Aos colegas do LabMassas: Ananda Lima Sanson, Amanda Quaresma, Bárbara Diniz Lima, Bruno Baêta, Carlúcio Lacerda, Daniela Caetano Cardoso, Diego Roberto Sousa Lima, Gustavo de Sousa Leite, Jéssica Correa Valadares, Júlia Raquel Lino e Freitas, Rafaela Gomes, Ramon Danilo de Souza, Rosimeire Alves Guimarães, Regiane Débora Fernandes Rios, Magalhães Teixeira de Souza.

Aos funcionários da Escola de Nutrição, especialmente ao Geraldo Magela Bhering, Luiz Carlos de Oliveira, Miliane Martins de Andrade Fagundes, Rosângela Malta de Assis Ramos.

Às secretárias da PPGCA, Marilene Beatriz de Souza e Úrsula Regiane Martins Rodrigues.

EPÍGRAFE

Mesmo que o universo pareça conspirar contra
você...

“Tente! E não diga que a vitória está perdida.

Se é de batalhas que se vive a vida!

Tente outra vez!

...Tenha fé em Deus, tenha fé na vida!

Tente outra vez!”

Raul Seixas, Paulo Coelho e
Marcelo Motta

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE TABELAS..... | 10 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 13 |
| RESUMO..... | 17 |
| ABSTRACT..... | 18 |
| INTRODUÇÃO..... | 19 |
| OBJETIVOS..... | 22 |
| REVISÃO DA LITERATURA..... | 23 |
| 1.1 PEIXES NA ALIMENTAÇÃO..... | 23 |
| 1.2 UNIDADES DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO E CONSUMO DE PEIXE... .. | 25 |
| 1.3 BENEFÍCIOS DO CONSUMO DE PEIXES..... | 28 |
| 1.4 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE PEIXES..... | 30 |
| 1.5 MÉTODOS DE COCÇÃO..... | 33 |
| 1.6 CARACTERÍSTICAS E METABOLISMO DO COLESTEROL..... | 35 |
| 1.7 OXIDAÇÃO DO COLESTEROL..... | 39 |
| 1.8 FONTES ALIMENTARES DE COLESTEROL E DE ÓXIDOS DE COLESTEROL..... | 44 |
| 1.9 FATORES QUE INFLUENCIAM A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL EM ALIMENTOS | 48 |
| 1.10 IMPLICAÇÕES DO CONSUMO DO COLESTEROL E SEUS ÓXIDOS NA SAÚDE HUMANA..... | 51 |
| 1.11 MÉTODOS DE ANÁLISE DO COLESTEROL E DO 7-CETOCOLESTEROL..... | 58 |
| CAPÍTULO 1 IMPACTO DOS MÉTODOS DE COCÇÃO NA COMPOSIÇÃO DE PEIXES..... | 64 |
| RESUMO..... | 64 |
| ABSTRACT..... | 65 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 65 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 67 |
| 2.1 AMOSTRAS..... | 67 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2 COCÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 67 |
| 2.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL..... | 69 |
| 2.3.1 Umidade..... | 69 |
| 2.3.2 Cinzas..... | 70 |
| 2.3.3 Determinação de sódio e potássio..... | 70 |
| 2.3.4 Proteínas..... | 71 |
| 2.3.5 Lipídios totais..... | 72 |
| 2.3.6 Carboidratos..... | 72 |
| 2.3.7 Valor energético (VE)..... | 73 |
| 2.3.8 Conversão dos resultados em base úmida para a base seca..... | 73 |
| 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 74 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 74 |
| 3.1 TEOR DE UMIDADE..... | 74 |
| 3.2 TEOR MÉDIO DOS NUTRIENTES NOS FILÉS CRUS..... | 76 |
| 3.3 TEORES DOS NUTRIENTES NOS FILÉS SUBMETIDOS AOS MÉTODOS DE COCÇÃO..... | 78 |
| 3.3.1 Lipídios..... | 78 |
| 3.3.2 Proteínas..... | 81 |
| 3.3.3 Cinzas..... | 83 |
| 3.3.4 Sódio | 86 |
| 3.3.5 Potássio..... | 88 |
| 3.3.6 Relação sódio/potássio..... | 90 |
| 3.3.7 Valor energético..... | 92 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 94 |
| CAPÍTULO 2 IMPACTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE COCÇÃO NO TEOR DE COLESTEROL E NA FORMAÇÃO DO 7-CETOCOLESTEROL..... | 96 |
| RESUMO..... | 96 |
| ABSTRACT..... | 97 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 97 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 99 |

| | |
|---|------------|
| 2.1 AMOSTRAS..... | 99 |
| 2.2 COCÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 100 |
| 2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 101 |
| 2.3.1 Padrões e Reagentes..... | 101 |
| 2.3.2 Extração Lipídica..... | 101 |
| 2.3.3 Extração do Colesterol e 7-Cetocolesterol..... | 102 |
| 2.3.4 Determinação Cromatográfica..... | 103 |
| 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 104 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 104 |
| 3.1 AMOSTRAS CRUAS..... | 106 |
| 3.2 MÉTODOS DE COCÇÃO..... | 108 |
| 3.3 FORMAÇÃO DE 7-CETOCOLESTEROL..... | 110 |
| 3.4 AMOSTRAS APÓS FRITURA..... | 112 |
| 3.4 AMOSTRAS ASSADAS..... | 114 |
| 3.5 AMOSTRAS GRELHADAS..... | 115 |
| 3.6 AMOSTRAS ENSOPADAS..... | 115 |
| 3.7 AMOSTRAS PROCESSADAS POR MICRO-ONDAS..... | 116 |
| 3.8 AMOSTRAS PROCESSADAS NO FORNO COMBINADO..... | 118 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 119 |
| CONCLUSÕES INTEGRADAS..... | 121 |
| SUGESTÕES..... | 123 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 124 |
| ANEXOS..... | 158 |

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | Valores médios de colesterol em alguns alimentos..... | 45 |
|-----|---|----|

Capítulo 1

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Teor médio de umidade ($\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) determinado em filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>) crus e preparados por diferentes métodos de cocção..... | 74 |
| 1.2 | Teor médio de nutrientes determinado em filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>) crus em base úmida..... | 76 |
| 1.3 | Teor médio de lipídios ($\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) determinados em filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção | 79 |
| 1.4 | Teor médio de proteínas ($\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) em filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção (base úmida e seca)..... | 82 |
| 1.5 | Teor médio de cinzas ($\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) em filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção | 84 |
| 1.6 | Teor médio de sódio ($\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) em filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção..... | 86 |
| 1.7 | Teor médio de potássio ($\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) em em filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção | 89 |
| 1.8 | Relação sódio/potássio ($\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) em filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção..... | 91 |
| 1.9 | Valores energéticos médios de estudos envolvendo diferentes espécies de peixe..... | 93 |
| 1.10 | Valor energético das amostras cruas e submetidas a diferentes métodos de cocção em filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>)..... | 94 |

Capítulo 2

| | | |
|------------|---|-----|
| 2.1 | Umidade, lipídios totais, colesterol e 7-cetocolesterol (base úmida) em filés crus de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>)..... | 106 |
| 2.2 | Condições de tempo e temperatura utilizadas em diferentes métodos de cocção e temperaturas internas alcançadas pelos filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>) após o processamento..... | 109 |

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Consumo <i>per capita</i> aparente comparado à produção de pescado nacional entre 1996 e 2010..... | 25 |
| 1.2 | Foto de uma merluza (<i>Merluccius hubbsi</i>)..... | 27 |
| 1.3 | Foto de uma pescada-branca (<i>Cynoscion leiarchus</i>)..... | 28 |
| 1.4 | Estrutura química do cholest-5-en-3 β -ol..... | 36 |
| 1.5 | Estrutura geral de uma lipoproteína..... | 38 |
| 1.6 | Estruturas químicas dos óxidos de colesterol..... | 40 |
| 1.7 | Representação esquemática do processo de oxidação do colesterol por via não enzimática e enzimática..... | 41 |
| 1.8 | Esquema do processo de oxidação do colesterol..... | 43 |
| 1.9 | Esquema do processo de aterogenia..... | 53 |
| 1.10 | Esquema simplificado dos efeitos dos OsC no processo de oncogênese..... | 56 |
| 1.11 | Reação de silição do colesterol..... | 62 |

Capítulo 1

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Métodos de preparo de filés de merluza (<i>M. hubbsi</i>) e de pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>)..... | 68 |
|-----|--|----|

Capítulo 2

| | | |
|-----|--|-----|
| 2.1 | Curvas de calibração (A e B) e gráficos de resíduos do colesterol (C) e 7-cetocolesterol (D) utilizados na quantificação das amostras..... | 105 |
| 2.2 | Correlação entre os conteúdos de colesterol (base seca) e 7-cetocolesterol em diferentes métodos de cocção empregados para filés de merluza (A) e de pescada-branca (B)..... | 111 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| ABERC | Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas |
| ACAT | Acil colesterol aciltransferase |
| ABC | Adenosinas trifosfatos-ligação cassete |
| AFC | Assado em forno combinado |
| AFE | Assado em forno elétrico |
| ALA | Ácido α -linolênico |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| AVC | Acidente vascular cerebral |
| BHT | Hidroxitolueno butilado |
| BSTFA | N,O bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida |
| CG | Cromatografia gasosa |
| CG/EM | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| CHO | Carboidratos |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CMD | Concentração média determinada |
| CoA | Coenzima A |
| COP | Produto de oxidação do colesterol |
| COX-2 | Cicloxigenase-2 |
| CV | Coeficiente de variação |
| CZ | Cinzas |
| DHA | Ácido docosahexaenoico |
| DPA | Ácido docosapentaenoico |

| | |
|------------|---|
| EFC | Ensopado em forno combinado |
| ENF | Ensopado preparado em fogão a gás |
| EPA | Ácido eicosapentaenoico |
| FAO | Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura |
| FNIC-DRI | <i>Food and Nutrition Information Center- Dietary Reference Intakes</i> |
| FRI | Fritura por imersão |
| GFC | Grelhado em forno combinado |
| GRE | Grelhado em chapa elétrica |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidade |
| HMG-CoA | 3-hidroxi-3-metilglutaril-acetil coenzima A |
| HPLC | <i>High-performance liquid chromatography</i> |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IDL | Lipoproteínas de densidade intermediária |
| IL-1 | Interleucina-1 |
| IL-8 | Interleucina-8 |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| LD | Limite de detecção |
| LDL | Lipoproteínas de baixa densidade |
| LT | Lipídios totais |
| LQ | Limite de quantificação |
| <i>m/z</i> | Razão massa-carga |
| MAPA | Ministério da Agricultura e Pecuária |
| MCP-1 | Proteína quimiotática de monócitos-1 |
| MDIC | Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior |

| | |
|---------------|--|
| MIC | Cocção em forno de micro-ondas |
| MPA | Ministério da Pesca e Aquicultura |
| MS | Ministério da Saúde |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato |
| NCEP | <i>National Centers for Environmental Prediction</i> |
| NMR | <i>Nuclear magnetic resonance</i> |
| NPC1L1 | <i>Niemann-Pick C1 Like 1 Protein</i> |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OsC | Oxisteróis ou óxidos de colesterol |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| POF | Pesquisa de Orçamentos Familiares |
| PPM | Parte por milhão ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
| PT | Proteínas |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| RIISPOA | Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal |
| RNS | Espécies reativas de nitrogênio |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| S/R | Sinal/ruído |
| TACO | Tabela Brasileira de Composição de Alimentos |
| TBARS | Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico |
| TMCS | Trimetilclorosilano |
| TNF- α | Fator- α necrose tumoral |
| UAN | Unidades de Alimentação e Nutrição |
| UV | Ultravioleta |
| VE | Valor energético |

VLDL Lipoproteínas de muito baixa densidade

WHO *World Health Organization*

RESUMO

No presente estudo objetivou-se avaliar a influência de diferentes métodos de cocção na composição química e na oxidação do colesterol em duas espécies de peixe. Os métodos de cocção e as espécies de peixe foram selecionados tendo como base a maior utilização em unidades de alimentação e nutrição brasileiras. Foram determinadas a composição centesimal, o teor de colesterol e de 7-cetocolesterol em filés de merluza (*Merluccius hubbsi*) e de pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) crus e depois de submetidos aos seguintes métodos de cocção: assado em um forno elétrico e em micro-ondas; cozido, grelhado e assado em forno combinado; cozido em fogão convencional; grelhado em chapa elétrica e frito em fritadeira. A cocção afetou significativamente ($p < 0,05$) os teores de umidade, lipídios, cinzas e o valor energético das amostras em ambas as espécies de peixe estudadas. Verificou-se que não foi possível apontar um único método de cocção como sendo o melhor, contudo, considerando-se o maior teor lipídico e maior valor energético apresentados pelos filés fritos, o método de fritura é o menos recomendado. Em relação ao teor de colesterol, nos filés de ambas as espécies, processados termicamente, foram encontrados níveis significativamente ($p < 0,05$) menores, com redução máxima de 64,90 % para os filés de merluza e de 65,08 % nos filés de pescada-branca em relação aos filés crus. Em todas as amostras que sofreram cocção, o 7-cetocolesterol, utilizado como indicador de oxidação, foi detectado em níveis significativamente diferentes ($p < 0,05$) sendo, de forma geral, os valores mais elevados para os tratamentos em que foram empregados altas temperaturas e maiores tempos de cocção. Os teores de 7-cetocolesterol foram mais elevados para os filés de merluza submetidos aos tratamentos GFC ($13,94 \mu\text{g.g}^{-1}$), AFE ($13,41 \mu\text{g.g}^{-1}$) e AFC ($12,00 \mu\text{g.g}^{-1}$). O teor mais baixo de 7-cetocolesterol foi detectado no tratamento EFC ($6,90 \mu\text{g.g}^{-1}$ de filé de merluza e $6,47 \mu\text{g.g}^{-1}$ para o filés de pescada-branca) Estes resultados indicaram a necessidade de revisão dos procedimentos de cocção para os peixes objetivando o fornecimento de alimentos mais saudáveis.

Palavras-chave: tratamento térmico, peixe, composição química, oxidação do colesterol, cromatografia gasosa, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the influence of different cooking methods on the proximate composition and cholesterol oxidation in fish. The cooking methods and fish species were selected based on the increased use in Brazilian food service. Thus the proximate composition, cholesterol and 7-ketocholesterol were measured in raw Atlantic hake (*Merluccius hubbsi*) and smooth weakfish (*Cynoscion leiarchus*) fillets and in fillets subjected to the following cooking methods: baking in an electric or microwave oven; baking, grilling or stewing in a steam-convection oven; simmering on a stove; electric grilling; and deep frying. The cooking affected significantly ($p < 0.05$) the moisture, lipid, ash and energy values in all of the samples for both species. It was not possible appoint to a single method of cooking as the best, however, considering the highest lipid content, highest energy value and lowest protein content by fried fillets, this would be the least recommended method. Regarding the content of cholesterol, the fillets thermally processed from both species exhibited significantly ($p < 0.05$) lower levels than the raw samples with maximum reduction of 64.90% for Atlantic hake and 65.08% in the fillets of smooth weakfish. In the cooked samples 7-ketocholesterol, used as an indicator of oxidation, was detected at levels significantly different ($p < 0.05$) with the highest levels for the treatments in which high temperatures and long cooking times were used. The highest levels of 7-ketocholesterol were for fillets of Atlantic hake submitted to GCO ($13.94 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), BEO ($13.41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and BCO treatments ($12.00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). The lowest level of 7-ketocholesterol was detected in the treatment SCO ($6.90 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ hake fillet and $6.47 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for hake fillets). The lowest level of 7-ketocholesterol was detected in fillets cooked by stewing and the highest level was found in fillets processed using electric or combination ovens, in which high temperatures and long cooking times were used. These results indicate the necessity of revising the baking procedures for fish to increase the healthiness of food.

Keywords: heat treatment, fish, chemical composition, oxidation of cholesterol, gas chromatography, mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

No Brasil, durante muitos anos, as referências sobre a composição química dos alimentos aludiam principalmente a dados compilados de análises de outros países que muitas vezes não condiziam com a realidade brasileira. A partir da década de 90 começaram a surgir tabelas brasileiras de composição de alimentos (LAJOLO & MENEZES, 1997). Embora a elaboração dessas tabelas tenha trazido grande contribuição no fornecimento de dados brasileiros, considera-se que muito ainda há de ser feito para uma completa obtenção de dados, principalmente nas diversas formas em que os alimentos são consumidos (MARCHINI et al., 1993; YANOMINE et al., 2005; SCHERR & RIBEIRO, 2011).

Os pescados são importantes fontes de alimento no mundo, de acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) a oferta global de peixes tem aumentado consideravelmente nas últimas cinco décadas, com uma taxa média de crescimento de 3,2 % ao ano no período de 1961-2009, superando a taxa de crescimento da população global de 1,7 %. O consumo mundial de peixes aumentou de 114,3 milhões de toneladas em 2006 para 130,8 milhões de toneladas em 2011, correspondendo anualmente a 18,8 kg *per capita* (FAO, 2012). No Brasil, os últimos dados estatísticos publicados demonstraram que o consumo anual de peixe é de 9 kg por habitante. A meta do Ministério da Saúde é promover um aumento deste consumo para 12 kg de pescado/habitante/ano, equivalente à quantidade recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Os peixes possuem alto valor nutritivo, representando uma boa fonte de proteínas, vitaminas e minerais. São considerados a maior fonte dietética de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente de ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) pertencentes à série ômega 3. A estes ácidos são atribuídos benefícios ao organismo humano destacando-se a redução na pressão sanguínea (GELEIJNSE et al., 2002), redução dos riscos de arritmia (SARAVANAN et al., 2010), redução de processos inflamatórios de placas ateroscleróticas (THIES et al., 2003).

Os peixes raramente são consumidos crus, sendo submetidos a diferentes tipos de tratamento térmico. Os métodos de cocção podem afetar a composição dos peixes influenciando os percentuais de matéria seca, proteína, lipídios totais e cinzas

(FERREIRA et al., 2007), acarretando alterações indesejáveis, principalmente devido à oxidação lipídica e mudanças em alguns componentes como o colesterol (HUR et al., 2007).

O peixe é considerado um dos alimentos mais susceptíveis à oxidação por seu conteúdo de colesterol e ácidos graxos poli-insaturados, assim alguns estudos foram conduzidos para avaliar a presença de óxidos de colesterol (OsC) durante o processamento térmico de peixes (HEE-KIM et al., 2000; ZUNIN et al., 2001; MOURA & TENUTA-FILHO, 2002; AL-SAGHIR et al., 2004; ECHARTE et al., 2005; SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2007). Os óxidos de colesterol apresentam importantes implicações para a saúde humana, pois estão associados à citotoxicidade (ROUSSI et al., 2006; SOTTERO et al., 2009), aterogenicidade (POLI et al., 2009), mutagenicidade e carcinogenicidade (JUSAKUL et al., 2011).

Os OsC mais encontrados em alimentos são 7-cetocolesterol, 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 5,6 α -epoxicolesterol, 5,6 β -epoxicolesterol e o colestano-3 β -5 α -6 β -triol (DEREWIAKA & OBIEDZINSKI, 2010). Dentre estes, o 7-cetocolesterol tem sido utilizado como indicador da oxidação do colesterol em alimentos por ser produzido em maior quantidade e nos estágios iniciais do processo oxidativo (ZUNIN et al., 2001; MORALES-AIZPURÚA & TENUTA-FILHO, 2005).

O desenvolvimento de produtos novos e saudáveis tem indicado a importância da retenção de nutrientes durante a preparação e processamento dos alimentos (LOMBARDI-BOCCIA et al., 2005). No entanto, a literatura especializada evidencia a escassez de estudos relatando os efeitos da preparação em grande escala sobre a retenção dos nutrientes e a prevenção na formação de compostos indesejáveis, especialmente nas condições de tempo e temperatura dos métodos de cocção comumente utilizados em unidades de alimentação e nutrição (UAN). Proença (2009) enfatiza que as UAN abrangem todos os estabelecimentos integrantes do segmento da alimentação fora do lar, sejam estes ligados aos estabelecimentos comerciais (restaurantes, lanchonetes, bares e similares), ou não (restaurantes para trabalhadores de empresas, estudantes, hospitais, quartéis, prisões, etc.). Assim um número expressivo de pessoas faz uso desses serviços, sendo a estimativa para 2013 em 24 milhões/dia para empregados de empresas, e em 17 milhões nas escolas, hospitais e Forças Armadas (ABERC, 2013).

Recomenda-se que cada país adote o seu próprio banco de dados de composição de alimentos, principalmente em relação aos compostos que influenciam

de forma positiva ou negativa a saúde humana (BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A elaboração do presente trabalho teve como enfoque determinar a composição centesimal de peixes mais utilizados nas UAN e investigar a influência dos principais métodos de cocção normalmente utilizados no preparo destes alimentos, no processo de oxidação do colesterol, utilizando o 7-cetocolesterol como indicador, com o objetivo de contribuir para a ampliação dos conhecimentos na área de análises de alimentos.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi determinar a composição centesimal e o teor de colesterol e de 7-cetocolesterol em filés de merluza (*Merluccius hubbsi*) e de pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) submetidos a diferentes métodos de cocção.

Os objetivos específicos foram:

- Determinar os teores de umidade, proteínas, lipídios, carboidratos, cinzas, sódio e potássio das duas espécies de peixe cru e submetidos a oito diferentes métodos de cocção.
- Comparar a composição centesimal das amostras cruas com as amostras submetidas à cocção.
- Comparar a composição centesimal das duas espécies de peixe nos diferentes métodos de cocção.
- Determinar a relação sódio e potássio das duas espécies de peixe cru e submetidas aos diferentes métodos de cocção.
- Determinar o teor de colesterol e 7-cetocolesterol das duas espécies de peixe cru.
- Determinar o teor de colesterol e 7-cetocolesterol das duas espécies de peixe submetidas a oito diferentes métodos de cocção.
- Comparar o teor de colesterol e 7-cetocolesterol das amostras cruas com as amostras submetidas à cocção.
- Comparar o teor de colesterol e 7-cetocolesterol das duas espécies de peixe nos diferentes métodos de cocção.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 PEIXES NA ALIMENTAÇÃO

O termo pescado abrange, segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA), por meio do Decreto nº 30.691, de 1952: peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios e quelônios, habitantes dos meios aquáticos, de água doce ou salgada, desde que destinados à alimentação humana (MAPA, 1952).

O consumo mundial de peixes aumentou de 114,3 milhões de toneladas em 2006 para 130,8 milhões de toneladas em 2011, correspondendo a 18,8 kg *per capita*/ano, assim os pescados têm sido considerados, cada vez mais, importantes fontes de alimento no mundo. De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) a oferta global de peixes tem aumentado consideravelmente nas últimas cinco décadas, com uma taxa média de crescimento de 3,2 % ao ano no período de 1961-2009, superando a taxa de crescimento da população global de 1,7 % (FAO, 2012).

Dentro do contexto mundial, o Brasil contribuiu com 1.240.813 toneladas de pescados em 2009 (BRASIL, 2010), correspondendo a 0,86 % da produção mundial, em pescado proveniente tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura. Em 2008, a produção de pescado nacional contribuiu com 0,81 % do total mundial. Devido à contribuição da produção total de pescado mundial de 2008 para 2009, o Brasil ganhou quatro posições e passou a ocupar o 18º lugar no *ranking* geral dos maiores produtores de pescado do mundo. Considerando-se apenas os países da América do Sul, a produção de pescado dos países que fazem a captura no oceano Pacífico supera a produção do Brasil. O Peru apresentou uma produção em torno de 7 milhões de toneladas e o Chile, aproximadamente 4,7 milhões de toneladas. O Brasil aparece em terceiro lugar à frente da Argentina que teve cerca de 862 mil toneladas produzidas (BRASIL, 2010).

A produção mundial de pescado proveniente da pesca extrativa e da aquicultura atingiu aproximadamente 142 milhões de toneladas em 2008 e 146 milhões de toneladas em 2009. Os maiores produtores em 2009 foram a China com aproximadamente 60,5 milhões de toneladas, a Indonésia com 9.8 milhões de

toneladas, a Índia com 7,9 milhões de toneladas e o Peru com cerca de 7 milhões de toneladas (BRASIL, 2010).

De acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008-2009, o consumo anual de peixe do brasileiro atingiu 9 kg por habitante ao ano. A meta do Ministério da Saúde (MS) é promover um aumento deste consumo para 12 kg de pescado/habitante/ano, quantidade recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O estudo realizado no período de 1996 a 2010 (BRASIL, 2010) para verificar o consumo *per capita* aparente de pescado no Brasil teve como fontes o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e informações disponibilizadas pelo Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). Os resultados demonstraram que o consumo *per capita* aparente de pescado no país em 2010 foi de 9,75 Kg/habitante/ano, com crescimento de 8 % em relação ao ano anterior. Desse total, 66 % do pescado consumido, foram produzidos no Brasil. No período de 2003 a 2010 observou-se um consumo *per capita* aparente médio de cerca de 7 %. Destaca-se certa estabilidade na proporção entre o consumo de produtos nacionais e importados no período de 2006 a 2009, cerca de 70 % e 30 %, respectivamente. Em 2010, a participação da produção nacional cai para 66 %, enquanto a da importação se eleva a 34 % (Figura 1.1).

Por meio da pesquisa POF também foi revelado que os brasileiros não têm o costume de comer peixe em casa. O consumo médio domiciliar de pescados no Brasil é de 4,03 kg *per capita* por ano. Há, no entanto, uma grande diferença regional. Com exceção do Norte, que consome 17,54 kg *per capita* ao ano, todas as outras regiões do país têm índices baixos de consumo. O Nordeste apresenta a taxa de 4,96 kg; o Sudeste de 2,06 kg; o Sul de 1,60 kg e o Centro-Oeste, de 1,62 kg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

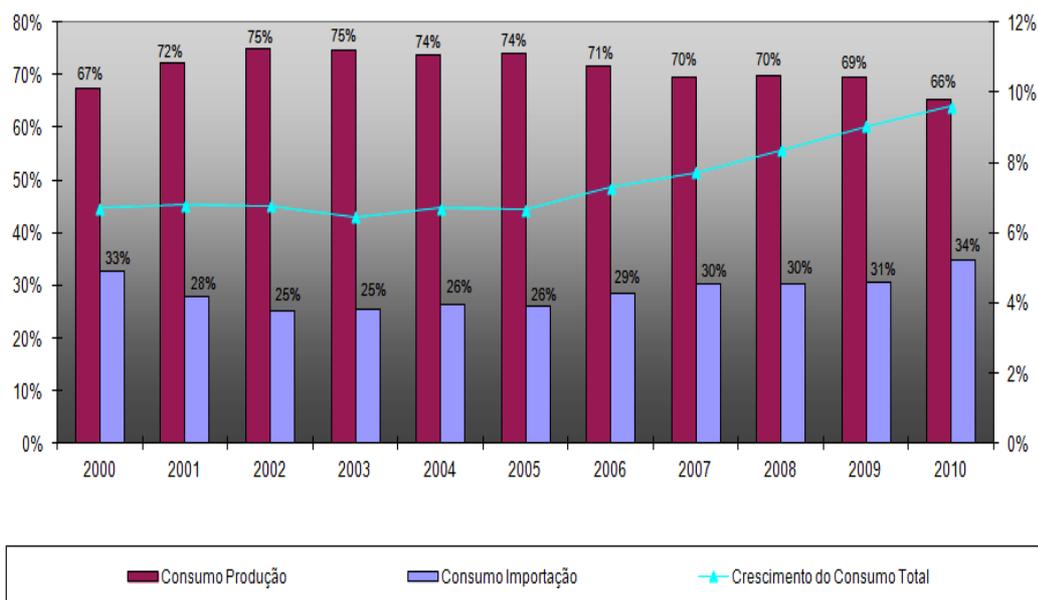


Figura 1.1 Consumo *per capita* aparente comparado à produção de pescado nacional entre 1996 e 2010. Fonte: MDIC e IBGE - formulação própria (2010).

Oetterer (2002) relatou que o baixo consumo de peixes está associado aos preços elevados e à baixa qualidade, resultante de problemas de manipulação na comercialização *in natura*, conservação e armazenamento.

De acordo com Sonoda (2006) o elevado consumo de peixes nas regiões Norte, seguido pela região Nordeste deve-se à produção maior em relação às demais regiões brasileiras. Como os pescados são alimentos altamente perecíveis, há a necessidade de cuidados especiais em toda a cadeia produtiva, abrangendo desde a captura até o consumo humano, para evitar a deterioração em qualquer etapa. A proximidade das áreas de produção proporciona um consumo do pescado em um espaço curto de tempo, com melhor qualidade sensorial, microbiológica e nutricional, além de menores preços. A necessidade de transporte para outros consumidores, distantes do local de produção, e a sua comercialização, impactam na perda de qualidade e contribuem para o aumento no preço (SONODA, 2006; SARTORI & AMÂNCIO, 2012)

1.2 UNIDADES DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO E CONSUMO DE PEIXES

No Brasil visualiza-se uma tendência de crescimento no número de refeições realizadas fora do domicílio. O IBGE, por meio da POF 2008-2009, relata que em seis

anos a participação urbana da alimentação fora do domicílio nos gastos com alimentação subiu de um quarto (25,7 %) para um terço (33,1 %), e a rural subiu de 13,1 % para 17,5 % (IBGE, 2013).

São vários os fatores apontados como os principais responsáveis pela mudança no panorama da alimentação no mundo contemporâneo, especificamente a redução de refeições realizadas no âmbito doméstico e, conseqüentemente o aumento do mercado de refeições coletivas. Vale citar a urbanização, a industrialização, a profissionalização das mulheres, a melhoria nos aspectos educacionais, econômicos, maior acesso ao lazer, redução da disponibilidade de tempo para o preparo e/ou consumo do alimento dentre outros (AKUTSU et al., 2005).

Proença (2009) define as Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN) como todos os estabelecimentos integrantes do segmento da alimentação fora do lar sejam estes ligados aos estabelecimentos comerciais (restaurantes, lanchonetes, bares e similares), ou não (restaurantes para trabalhadores de empresas, estudantes, hospitais, quartéis, prisões e outros). Portanto, todos estes serviços constituem o setor de refeições coletivas que é amplo e, de acordo com Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas (ABERC), o mercado potencial teórico de refeições está estimado para 2013 em 24 milhões/dia para empregados de empresas, e em 17 milhões nas escolas, hospitais e Forças Armadas (ABERC, 2013).

O cardápio constitui a base do processo de trabalho em uma UAN e sua elaboração envolve aspectos fundamentais como o atendimento às necessidades nutricionais e hábitos alimentares da clientela (SILVA & BERNARDES, 2001). A escolha dos alimentos que compõem um cardápio é um desafio para o nutricionista, profissional da área, pois deve atender aspectos de qualidade nutricional e higiênico-sanitária, disponibilidade no mercado, custo, aceitação pela clientela e viabilidade de execução (ABREU et al., 2009).

Recomenda-se que peixes sejam incluídos rotineiramente no cardápio, pois o MS, por meio de seu Guia Alimentar para a População Brasileira, preconiza o consumo de peixe fresco pelo menos duas vezes por semana. Ingerir pescados frequentemente previne doenças cardiovasculares, diminui o nível de colesterol e a ansiedade, além de ativar a memória (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Amaral et al. (2009) pesquisaram o consumo de peixes em UAN localizadas em Minas Gerais e, dentre as 171 unidades pesquisadas, 151 unidades (88,31 %) responderam ao questionário e todas utilizavam peixes. As espécies mais utilizadas

foram: merluza – *Merluccius hubbsi* - (61,58 %); pescada-branca - *Cynoscion leiarchus* - (17,2 %); cação - *Carcharrhinus* spp - (12,58%); mapará - *Hypophthalmus* spp - (3,31 %), peroá - *Balistes capriscus* - (1,32 %), surubim - *Pseudoplatystoma* spp - (1,32 %), piramutaba - *Rachyplatystoma vaillantii* - (1,98 %) e gurijuba- *Arius parkeri* - (0,66 %).

A espécie merluza, apontada pela pesquisa de Amaral et al. (2009) como a mais utilizada nas UAN pesquisadas, possui sinonímia Marmota, pertence à família *Merlucciidae*, cujo nome científico é *Merluccius hubbsi* (Figura 1.2). Trata-se de uma espécie demerso-pelágica distribuída desde o Rio de Janeiro, Brasil, até a Terra do Fogo, Argentina. Realiza migrações sazonais e migrações verticais ao longo do dia, provavelmente em função da sua alimentação, a qual ocorre principalmente à noite. Forma cardumes densos no fundo durante o dia, que se dispersa à noite. Alimenta-se de invertebrados, peixes e lulas. A reprodução se dá no inverno e na primavera. Atingem a maturidade sexual quando fêmeas e machos chegam a 36 cm de comprimento, correspondendo a 3 ou 4 anos de idade para ambos os sexos [http://www.vivaterra.org.br/peixes_salgada_5.htm (acessado em mar. 2013)].

A produção brasileira de merluza derivada da pesca extrativa marinha foi de 1.826; 2.014 e 1.901 toneladas nos anos de 2008, 2009 e 2010, respectivamente. O filé de merluza congelado consumido no Brasil também é importado principalmente da Argentina, contudo as quantidades mantiveram-se praticamente estáveis em 2009 (42.624.569 kg) e 2010 (43.506.250 kg) (BRASIL, 2010).

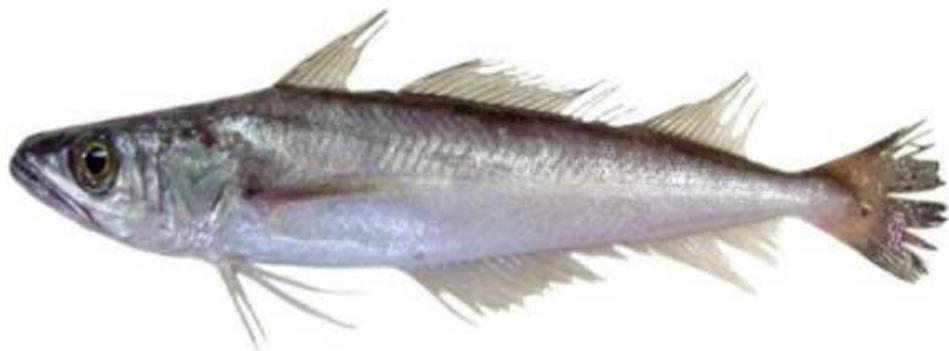


Figura 1.2: Foto de uma merluza (*Merluccius hubbsi*).

Fonte: <http://www.icmbio.gov.br>. (Acessado em Março de 2013).

A pescada-branca (Figura 1.3) apontada como a segunda espécie mais utilizada nas UAN pesquisadas por Amaral et al. (2009), pertence à família *Sciaenidae*,

nome científico *Cynoscion leiarchus*. Possui distribuição geográfica das Guianas até Porto Alegre (Brasil). Possui *habitat* demerso-pelágico, frequentando águas rasas próximas às costas, baías e enseadas e locais pedregosos com corais. Alimentam-se de pequenos crustáceos e de pequenos peixes [http://www.vivaterra.org.br/peixes_salgada_5.htm (Acessado em Março de 2013)]. Possui como características: a região dorsal mole; escamas cicloides; coloração prateada com o dorso acinzentado; nadadeiras claras, exceto a dorsal espinhosa, escura, bem como a margem da caudal, atinge 60 cm e até 3 kg (FILHO, 1999).



Figura 1.3: Foto de uma pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*).

Fonte: http://www.vivaterra.org.br/peixes_salgada_5.htm.

(Acessado em Março de 2013).

Os dados brasileiros de produção de pescado da pesca extrativa marinha, discriminados por espécie, de acordo com o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, demonstraram que a produção de pescada-branca foi de 910, 1.003 e 948 toneladas nos anos de 2008, 2009 e 2010 respectivamente (BRASIL, 2010).

1.3 BENEFÍCIOS DO CONSUMO DE PEIXES

Os peixes geralmente apresentam alto teor proteico, baixo teor de gorduras e bom conteúdo de minerais (RUXTON, 2011), além disso, seu consumo vem sendo incentivado cada vez mais em função de suas propriedades funcionais relacionadas à presença de ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3, principalmente o ácido α -linolênico 18:3 (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) 20:5, ácido docosapentaenoico (DPA) 22:5 e ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6 (MAHAFFEY et al., 2011).

O alto conteúdo de EPA e DHA, no pescado, é consequência do consumo de fitoplâncton pelos peixes. O fitoplâncton é, por excelência, rico em ácidos graxos

poli-insaturados da série ômega 3, sendo que seu conteúdo varia em função da sua disponibilidade, localização e estação do ano (CARRERO et al., 2005).

Entre os efeitos fisiológicos atribuídos ao EPA e DHA para os seres humanos, estão a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (CATERINA, 2011; MAHAFFEY et al., 2011), psoríase (MAYSER et al., 1998) e alguns tipos de câncer (KIM et., 2010; SASAZUKI et al., 2011; JING et al., 2013).

As maiores evidências do efeito benéfico dos ácidos graxos ômega-3 estão relacionadas às doenças cardíacas. Kris-Etherton et al. (2002) revisaram alguns estudos epidemiológicos e testes clínicos e concluíram que a suplementação alimentar com EPA e DHA entre 0,5 g e 1,8 g por dia (tanto como gordura de peixe, quanto na forma de suplemento alimentar) reduziu significativamente o risco de morte por essas doenças. Os testes clínicos demonstraram a relação entre ácidos graxos ômega-3 e a redução de eventos cardíacos, acidente vascular cerebral (AVC) e infarto do miocárdio, não fatais e o retardo no progresso da aterosclerose em pacientes cardíacos.

O consumo frequente de peixe aparentemente reduz o número de mortes causadas por doenças cardiovasculares, como as arritmias (LEAF, 2007). Os ácidos graxos ômega 3 reduzem o risco de doenças cardiovasculares devido principalmente às suas propriedades anti-inflamatórias, antitrombogênicas, hipotrigliceridêmicas, por retardarem o crescimento da placa aterosclerótica, reduzirem a expressão de moléculas de adesão, fatores de crescimento derivados de plaquetas e a susceptibilidade para arritmias cardíacas e promoverem efeito hipotensivo e relaxamento endotelial induzido pelo óxido nítrico (CONNOR, 2000).

Os ácidos graxos das séries ômega 3 e ômega 6 são metabolicamente distintos e desempenham funções fisiológicas opostas, intervindo em numerosos processos fisiológicos tais como a coagulação do sangue e as respostas inflamatórias e imunológicas, influenciando assim no processo de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (PALANCA et al., 2006; SIERRA et al., 2004).

O ácido linoleico, ácido graxo essencial representante da família ômega 6 é convertido em ácido araquidônico, que por sua vez, é precursor da síntese dos eicosanoides da série par, ou seja, das prostaglandinas 2 e leucotrienos 4. Estes são mediadores químicos que desempenham efeitos biológicos envolvidos nos processos de infecção, inflamação, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária. Estão também relacionados ao desenvolvimento, crescimento e metástases tumorais (DIN et al., 2004).

Os ácidos graxos essenciais ômega 3 (ácido alfa-linolênico) e ômega 6 (ácido linoleico) competem pelas mesmas enzimas de dessaturação ($\Delta 6$ desaturase), sendo que essas atuam preferencialmente no ácido alfa-linolênico em detrimento do linoleico. Assim, os ácidos graxos EPA e DHA, produtos resultantes da conversão do ácido graxo alfa-linolênico (ômega 3), bloqueiam a ação da $\Delta 6$ desaturase, inibindo a conversão do ácido linoleico (ômega 6) a ácido araquidônico e, conseqüentemente, a produção de eicosanoides da série par, prostaglandinas 2 e leucotrienos 4. Dessa forma, os ácidos graxos ômega 3 exercem um efeito protetor, impedindo os eicosanoides da série par de exercerem seus efeitos nocivos, entre eles os de promover a proliferação celular em linhagens cancerígenas, invasividade e metástase do tumor (STOLL, 1998).

Longo et al. (2001) ressaltam que a dieta oriental, ao contrário da ocidental, é marcada por um alto consumo de pescados, o que parece conferir à população uma melhor qualidade de vida, refletindo-se em menos complicações inflamatórias e imunológicas. Contrariamente, a população que vive no Ocidente, incluindo os brasileiros, tem uma ingestão baixa de peixes e frutos do mar. Outra preocupação com a dieta brasileira é que há um consumo, cada vez maior, de óleo de soja, caracterizando um baixo consumo de ômega-3 e uma alta ingestão de ômega-6.

1.4 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE PEIXES

As bases de dados de composição de alimentos com informações detalhadas e confiáveis sobre sua composição nutricional possuem várias aplicações nas áreas de nutrição, saúde pública, prática clínica, pesquisa, indústria de alimentos, pesquisas de consumo de alimentos, nutrição esportiva, educação nutricional, bem como, no desenvolvimento e implementação de políticas nutricionais (HARRISON, 2004; EGAN et al, 2007; CHURCH, 2009).

Cada país deve possuir seu próprio banco de dados em relação à composição de alimentos, especialmente no que diz respeito aos compostos que afetam a saúde humana. Contudo, a análise de alimentos é complexa e onerosa e envolve diversos métodos em termos de tempo, exatidão e precisão. Ressalta-se a necessidade de validação e revalidação dos métodos de forma que sejam obtidos dados confiáveis e que possam ser utilizados por laboratórios com recursos humanos e materiais diferentes (BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

No Brasil, as referências sobre a composição química dos alimentos, limitavam-se principalmente aos dados de análises de outros países que muitas vezes não representavam os alimentos consumidos pelos brasileiros. A partir da década de 90 começaram a surgir as tabelas brasileiras de composição de alimentos (LAJOLO & MENEZES, 1997). Embora a elaboração dessas tabelas tenha trazido grande contribuição no fornecimento de dados brasileiros, considera-se que muito ainda há de ser feito para uma completa obtenção de dados principalmente nas diversas formas em que os alimentos são consumidos (MARCHINI et al., 1993; YANOMINE et al., 2005; SCHERR & RIBEIRO, 2011).

As condições ambientais e de alimentação influenciam a composição da carne de peixes, mas isto varia muito de espécie para espécie. Além da grande variação nos nutrientes, a bioacumulação de pigmentos, metais pesados, toxinas marinhas são também dependentes da espécie (HAARD, 1992).

Os peixes são compostos basicamente por água, lipídios e proteínas, cujas quantidades variam entre as espécies. De forma geral, os peixes contêm de 15 % a 25 % de proteína, 0,3 % a 1,0 % de carboidratos, 0,6 % a 36 % de lipídios e 1 % a 1,5 % de minerais. A água é o constituinte em maior concentração no pescado (60 % a 85 %) tendo uma relação inversamente proporcional à quantidade de gordura. Os peixes magros apresentam maior quantidade de água, cerca de 83 %, enquanto que peixes gordos, em torno de aproximadamente 58 % (OGAWA, 1999).

A fração lipídica é também a que mais oscila, ao longo do ciclo de vida em uma mesma espécie, chegando aos valores mínimos durante o período de ovulação (ABABOUCHE, 2005). No que se refere ao tipo de gordura presente em peixes, Martino (2003) ressalta a grande quantidade de ácidos graxos altamente insaturados (EPA e DHA). As diferenças existentes quanto ao tipo e teor de ácidos graxos presentes nos peixes referem-se às características genéticas, *habitat*, sazonalidade, qualidade e quantidade de alimentos disponíveis, representados pelo fitoplâncton e zooplâncton (ZOTOS & VOUZANIDOU, 2012).

O teor de colesterol em peixes também é variável, Osman et al (2001) enfatiza que há uma correlação direta entre os teores de lipídios totais de peixes marinhos e os teores de colesterol. A determinação dos teores de colesterol em peixes brasileiros teve como resultados uma variação sazonal em peixes de água doce com teores de 66,8 mg.100 g⁻¹ (verão) e 71,4 mg.100 g⁻¹ (inverno) para a tilápia e de 92,0 mg.100 g⁻¹ (verão) e 72,4 mg.100 g⁻¹ (inverno) para o curimatá. Já para os peixes

de água salgada os teores de colesterol foram de 72,6 mg.100 g⁻¹(verão) e 86,4 mg.100g⁻¹ (inverno) para a sardinha, de71,6 mg.100 g⁻¹(verão) e 83,0 mg.100 g⁻¹ (inverno) para a corvina e de165,4 mg.100g⁻¹(verão) e 164,8 mg.100 g⁻¹ (inverno) para o camarão (LUZIA et al, 2003)O pescado é uma fonte proteica importante, pois além de fornecer uma quantidade considerável de acordo com as variações entre as espécies, possui uma alta qualidade, contendo todos os aminoácidos essenciais. Em decorrência do processamento, como é o caso do congelamento, a qualidade proteica do pescado é mantida, no entanto um descongelamento errôneo leva à extração de parte das proteínas (OETTERER, 2005).A fração de carboidratos no músculo dos peixes é baixa, e é típica nos músculos estriados, onde ocorre como glicogênio e como um dos constituintes dos nucleotídeos. No final do ciclo de vida esta fração torna-se fonte de ribose livre, após autólise *post mortem* (ABABOUCHE, 2005). O pescado é também uma ótima fonte de minerais tais como de Mg, Mn, Zn, Cu e outros que estão envolvidos em importantes funções fisiológicas. É um alimento rico em vitaminas hidrossolúveis do complexo B e lipossolúveis, com destaque para as vitaminas A e D (OGAWA, 1999).O sódio é o principal íon extracelular, essencial na osmoregulação, no equilíbrio ácido-base, no transporte ativo através de membranas celulares, bem como na ativação de algumas enzimas, como a amilase. Já o potássio atua como cátion monovalente no balanço intracelular dos ânions, contribui para o metabolismo e para a síntese das proteínas e do glicogênio. Desempenha papel importante na excitabilidade neuromuscular e na regulação do teor de água do organismo (ESCOTT-STUMP et al., 2013).A OMS recomenda uma ingestão de sódio de menos de 2 g por dia, um nível que é, em grande parte, baseado em projeções feitas a partir de ensaios clínicos relativamente pequenos e de curta duração que avaliaram os efeitos da restrição de sódio na pressão sanguínea com base na prevenção primária de populações (HE & MACGREGOR, 2002; WHO, 2006).

Os estudos epidemiológicos têm relatado que o aumento da ingestão de potássio com menor ingestão de sódio está associado à redução da pressão sanguínea e, conseqüentemente, ao risco de doenças cardiovasculares (DYER et al. 1994; WHELTON et al. 1997; HE & MACGREGOR, 1999, O'DONNELL et al., 2011).

1.5 MÉTODOS DE COCÇÃO

A cocção consiste na aplicação de calor aos alimentos objetivando o seu preparo para o consumo. O ato de cozinhar proporciona alterações no sabor, na textura, no aroma, na cor e no teor de nutrientes (DOMENE, 2011). O processamento pelo calor é considerado como um dos mais importantes métodos desenvolvidos pelo ser humano para aumentar o período de estocagem e a disponibilidade dos alimentos (MORAES et al., 2010).

A perda inicial de água promovida nos processos de cocção leva à concentração dos nutrientes e à incorporação de substâncias provenientes do meio de cocção (ex: óleo, água, temperos e outros) e também às perdas para esse meio. O aquecimento induz modificações nos componentes químicos dos alimentos *in natura*, tais como no teor de vitaminas, composição de ácidos graxos, conteúdo de colesterol, teor e forma das proteínas (BADIANI et al., 2002; ROSA, 2003).

Os métodos utilizados para cocção de alimentos são diferenciados de acordo com a forma e/ou meios de transmissão de calor. Os meios comumente utilizados para a cocção dos alimentos são: água, óleos e gorduras, ar seco ou úmido. As formas de transmissão de calor são: condução, convecção e radiação (ARAUJO et al., 2007).

No processo de condução a transferência da energia ocorre pela colisão de moléculas de maior energia cinética com outras menos energéticas. Muitos autores consideram que este é o único processo de transferência de calor, pois ocorre exclusivamente devido a uma diferença de temperatura e outros o incluem juntamente com a convecção e a radiação (FEYNMAN, 1999; ÇENGEL & BOLES, 2001).

O aquecimento por convecção é definido como a transferência de energia térmica de um fluido (gás ou líquido) para uma superfície próxima. Ocorre quando um fluido, como o ar ou a água está em contato com um corpo cuja temperatura é maior que o mais próximo a ele. A temperatura do fluido que está em contato com o corpo quente aumenta e geralmente o fluido se expande. O fluido do meio mais frio desce para tomar o lugar do fluido quente que subiu, formando-se então uma corrente convectiva (ÇENGEL & BOLES, 2001).

A radiação térmica é toda a energia radiante emitida na gama de comprimentos de onda 0,1 m a 100 m do espectro eletromagnético. Resulta da emissão e propagação de ondas eletromagnéticas (ou fótons) por alteração na

configuração eletrônica de átomos e moléculas. Qualquer corpo com uma temperatura superior a 0 °K emite energia radiante. A transferência de calor por radiação térmica ocorre através de sólidos, líquidos e gases e no vácuo, exceto nos sólidos e líquidos opacos à radiação térmica (ÇENGEL & BOLES 2001).

A cocção por meio do calor úmido pode acontecer por contato com líquido quente ou vapor. É uma cocção lenta, onde o vapor ou a água hidrata o alimento abrandando as fibras (PHILIPPI, 2008). Os métodos de cocção mais utilizados por calor úmido são água em ebulição, fervura a fogo lento, cocção a vapor ou cocção a vapor em alta pressão, sendo que cada método possui diferentes tempos e temperaturas de cocção, como também diferentes indicações para alimentos de menor ou maior consistência (TEICHMANN, 2000).

A cocção por calor seco promove a desidratação do alimento. O calor seco é aplicado ao alimento na presença ou ausência de gordura. O calor seco com adição de gordura consiste em transmitir calor de forma indireta ao alimento por meio de gordura (ex. fritura), por outro lado a cocção por calor seco sem adição de gordura consiste em aplicar apenas o ar seco. Os métodos de cocção por calor seco sem gordura consistem em: assar ao forno, com aplicação de ar quente e calor indireto; assar ao espeto, com aplicação de ar quente e calor indireto, utilizando-se o forno ou churrasqueira, em que a fonte de calor é produzida por carvão, lenha ou eletricidade, e por meio da grelhagem, um método que consiste em preparar os alimentos por exposição ao calor seco e forte, utilizando-se a grelha (PHILIPPI, 2008).

Outro método de cocção bastante comum utiliza forno micro-ondas. Neste aparelho a cocção ocorre por meio de ondas eletromagnéticas que penetram no alimento produzindo calor. Esse método ocasiona destruição de algumas vitaminas (WOLKE, 2003).

Micro-ondas são ondas eletromagnéticas, geradas por um magnetron, situadas na região do espectro eletromagnético, entre a radiação do infravermelho e a das ondas de rádio. O aquecimento por micro-ondas ocorre pela propriedade do material de absorver a alta frequência de energia eletromagnética (micro-ondas) e convertê-la em calor. O aquecimento por micro-ondas deve-se à polarização dipolar das moléculas e que são realinhadas na presença de campo elétrico de alta frequência. Por causa da alta frequência, o realinhamento ocorre um milhão de vezes por segundo resultando em moléculas de atrito interno causando um aquecimento volumétrico do material. Os fatores que afetam o aquecimento por micro-ondas e sua distribuição de

calor são as propriedades dielétricas, profundidade de penetração, frequência de operação, modo de operação (único ou multimodo), a geometria do material no interior do forno, carga, e geometria do forno CHANDRASEKARAN et al., 2012).

Proença (2009) enfatiza o envolvimento de diferentes equipamentos no processo de cocção dos alimentos sendo fogões, fornos, fritadeiras, e destaca o surgimento de novas tecnologias. Dentre elas está o forno combinado, um equipamento que engloba todos os processos de cocção: assar, fritar, grelhar, gratinar, aquecer sem ressecar, cozinhar em banho-maria e a vapor. Sua utilização reduz o tempo de preparo, diminui o desperdício, melhora a apresentação dos pratos e não requer a utilização de gordura. Por meio da circulação combinada de ar quente e vapor, esse tipo de forno utiliza o calor seco, calor úmido e a combinação destas duas formas de cocção. Assim, o alimento preparado no forno combinado recebe um aquecimento homogêneo, evitando o ressecamento e garantindo a cocção uniforme baseado na premissa de que este método de cocção é o que melhor preserva as características sensoriais e nutricionais dos alimentos (PROENÇA, 2009).

Em relação aos métodos de cocção mais utilizados para o preparo dos peixes, a pesquisa realizada por Amaral et al. (2009) identificou 49,5 % para a fritura; 14 % para o grelhado; 3,2 % para o ensopado; 20 % para o assado e 4,3 % para o vapor; nenhuma das unidades utilizava o preparo em micro-ondas.

1.6 CARACTERÍSTICAS E METABOLISMO DO COLESTEROL

O colesterol (colest-5-en-3 β -ol) (Figura 1.4) é um álcool esteroidal representado pela fórmula molecular $C_{27}H_{46}O$, com massa molar de 386,65 g/mol. É pouco solúvel em água e álcool, solúvel em benzeno e muito solúvel em éter, dioxano e clorofórmio. Apresenta ponto de fusão de 148,5 °C e ponto de ebulição de 360 °C. Sua estrutura química apresenta um núcleo esteroide 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 carbono C3 do anel A, grupos metilas (-CH₃) nas posições C10 e C13, e uma cadeia alifática no C17, denominada cadeia lateral, enumerada do C20 ao C27 constituída de 8 carbonos (Figura 1.4) (TAI et al., 1999; LEHNINGER et al., 1995).

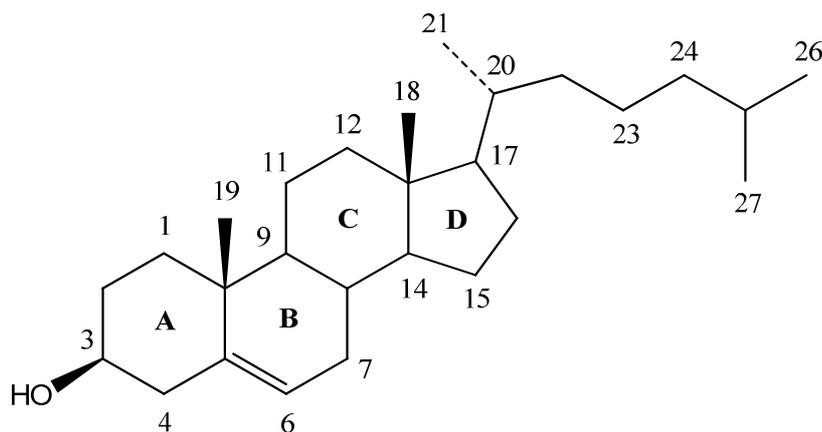


Figura 1.4 Estrutura química do colest-5-en-3 β -ol.

Fonte: Georgiou et al (2014)

O colesterol é abundante nos organismos animais, sendo sintetizado pelas células principalmente no fígado, intestino, córtex adrenal, tecidos reprodutivos incluindo ovários, testículos e placenta (CHAMPE et al., 2006). É um componente esteroide essencial da membrana celular dos animais e está intimamente associado aos fosfolipídios, sendo considerado indispensável ao organismo, pois modula a fluidez das membranas celulares e participa da ativação de enzimas (LEHNINGER et al., 1995, RAYNER et al., 2010). Atua ainda como precursor dos hormônios sexuais, como testosterona, androsterona, progesterona e estradiol, e apresenta propriedades anti-inflamatórias (cortisol) e cardiotônicas (digitoxigenina) (HORTON et al., 2002).

O colesterol também participa do metabolismo das vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e da síntese de vitamina D₃, sendo utilizado pelo fígado na formação de ácido cólico que, conjugado com outras substâncias, faz parte da constituição de sais biliares que promovem a digestão e absorção de gorduras. O colesterol está presente em grandes quantidades na camada córnea da pele juntamente com outros lipídios, tornando-a resistente à evaporação de água, à absorção de substâncias hidrossolúveis e à ação de agentes químicos (HORTON et al., 2002).

A síntese de colesterol ocorre em todas as células nucleadas do organismo, porém ocorre com maior intensidade nos hepatócitos (CHAMPE et al., 2006). A via de síntese do colesterol envolve uma série de reações que, basicamente são resumidas na formação de compostos com 5 átomos de carbono, seguida pela polimerização destes compostos e a sua ciclização. A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

(NADPH) participa como agente redutor e consome 18 unidades de adenosina trifosfato (ATP) por molécula de colesterol formada. As principais etapas da via estão sumarizadas a seguir. Primeiramente duas moléculas de acetil-CoA se condensam formando acetoacetil-CoA que, em seguida reage com outra molécula de acetil-CoA produzindo 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Estas duas reações ocorrem no citosol e são catalisadas pelas enzimas tiolase e HMG-CoA sintase, respectivamente. A HMG-CoA é reduzida por 2 NADPH originando mevalonato, um composto de 6 átomos de carbono. Esta reação é catalisada pela HMG-CoA redutase, localizada na membrana do retículo endoplasmático, e é a reação limitante da síntese de colesterol. A HMG-CoA redutase é regulada por mecanismos de fosforilação reversível dependente de hormônios (o glucagon fosforila a enzima inativando-a, enquanto que a insulina a desfosforila ativando-a); por efeitos na transcrição (o colesterol inibe a síntese da redutase); e por inibição pelo próprio produto mevalonato. A seguir o mevalonato sofre duas fosforilações, envolvendo o consumo de 3 ATP, seguida de descarboxilação, originando isopentenil-pirofosfato. Seis moléculas de isopentenil-pirofosfato sofrem reações de transferência e redução por NADPH, liberando pirofosfato inorgânico e produzindo finalmente um composto de 30 carbonos, o esqualeno. Todas estas reações são catalisadas por enzimas presentes na membrana do retículo endoplasmático. O esqualeno sofre oxidação e ciclização gerando lanosterol. A etapa final da via envolve vinte reações onde o lanosterol é finalmente convertido em colesterol devido à remoção de 3 grupos metila, redução da dupla ligação da cadeia lateral e sua movimentação no interior do anel de lanosterol (LEHNINGER et al., 1995; MARZZOCO & TORRES, 1999).

A homeostase do colesterol depende do balanço entre ingestão, absorção/excreção e síntese (PATEL & THOMPSON, 2006). O fígado desempenha um papel preponderante na regulação do balanço corporal do colesterol. O colesterol entra em seu *pool* hepático proveniente de uma série de fontes, incluindo o colesterol da dieta, o colesterol sintetizado pelos tecidos extra-hepáticos e a síntese *de novo* colesterol pelo fígado. O colesterol é eliminado do fígado de forma inalterada na bile, como um componente das lipoproteínas do plasma enviadas aos tecidos periféricos, ou como sais biliares secretados na luz intestinal (CHAMPE et al., 2006).

O colesterol é insolúvel em água e, conseqüentemente, para ser transportado na corrente sanguínea liga-se de forma não covalente às lipoproteínas que são compostas por lipídios e proteínas denominadas apolipoproteínas (SPOSITO

et al., 2007). Lipoproteínas (Figura 1.5) são agregados de macromoléculas como triacilgliceróis (TG) e ésteres de colesterol envolvidos por uma camada de fosfolipídios, proteínas e colesterol livre, ou seja, as lipoproteínas possuem um centro hidrofóbico, mas no seu exterior, são hidrossolúveis (SIEKMEIER et al., 2008).

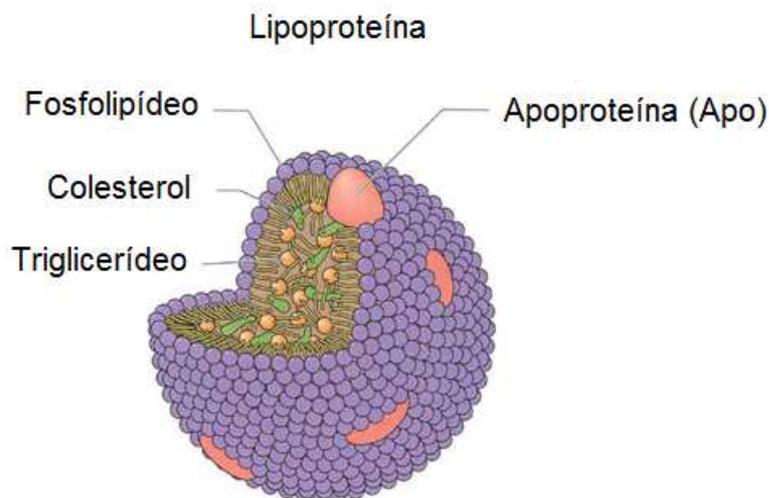


Figura 1.5 Estrutura geral de uma lipoproteína. Os fosfolipídios se situam formando a membrana, com proteínas e colesterol nela inseridos. Os triglicerídeos (triacilgliceróis), o resto de colesterol e as vitaminas lipossolúveis se encontram no interior da lipoproteína. Imagem original do *Santa Monica College*, disponível no endereço eletrônico abaixo, acessado em 6 de fevereiro de 2014:
http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy2textbook/1cholesterol.html

As lipoproteínas são classificadas em quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), de densidade intermediária (IDL), de baixa densidade (LDL) e de alta densidade (HDL). O papel fundamental dos quilomícrons e das VLDL é transportar, respectivamente, os triglicilgliceróis alimentares e a gordura endógena (síntese hepática). As LDL são as principais transportadoras de colesterol proveniente do fígado para os tecidos periféricos (SIEKMEIER et al., 2008). As HDL são responsáveis pela remoção do colesterol de tecidos periféricos e de outras lipoproteínas, enviando-os ao fígado, caracterizando o “transporte reverso de colesterol” (MAHLEY & HUANG, 2007).

A concentração plasmática de colesterol é regulada pelos receptores LDL (receptores B/E). As apolipoproteínas B 100 e E, presentes na superfície dos receptores B/E interagem com eles facilitando a internalização do colesterol. O aumento do conteúdo intracelular de colesterol leva a uma redução da síntese dos receptores de

LDL e, concomitantemente ocorre uma inibição da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima-chave na biossíntese do colesterol. Quando há uma baixa concentração de colesterol ocorre o inverso, assim a concentração intracelular mantém-se relativamente constante (RADER & JAYE, 2000).

O colesterol está presente sob duas formas nas lipoproteínas plasmáticas (colesteril-éster e livre). A enzima acil colesterol aciltransferase (ACAT) promove a esterificação do colesterol livre presente na célula. Aproximadamente 20 % a 30 % encontram-se na forma livre e são transferidos rapidamente entre as diferentes lipoproteínas plasmáticas e entre células e lipoproteínas. O sistema hepatobiliar é a principal via de sua excreção, na forma de colesterol ou de ácido biliar. O ácido biliar é sintetizado sob ação da enzima 7 α -hidroxilase. Os mecanismos pelos quais o colesterol é liberado das células são a alteração na estrutura química (sob a forma de ácidos biliares e hormônios); a secreção, acoplado a apolipoproteínas e fosfolípidos; e a transferência para lipoproteínas do plasma. Com exceção dos órgãos produtores de hormônios esteroides, tecidos extra-hepáticos não catabolizam o colesterol, assim é necessário um mecanismo de transporte reverso de colesterol para manter o equilíbrio tecidual, que permita sua excreção na bile. Esse movimento é essencial para prevenção de acúmulos de colesterol, como os que ocorrem na lesão aterosclerótica e nos xantomas característicos da hiperlipidemia (PATEL & THOMPSON, 2006).

1.7 OXIDAÇÃO DO COLESTEROL

O colesterol é instável e passível de sofrer oxidação. O processo de oxidação do colesterol ocorre por meio de reações em cadeia, que envolvem a formação de radicais livres, de forma similar à oxidação dos lipídios insaturados. Sua oxidação é desencadeada quando exposto a condições tais como temperatura elevada, ar, precursores de radicais livres, luz ou à combinação destes fatores (SMITH, 1987; OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2010).

Os termos “produtos de oxidação do colesterol (COP), oxisteróis ou óxidos de colesterol (OsC)” referem-se a um grupo de esteróis derivados do colesterol, que contém, como substituinte, um grupo hidroxila, cetona ou epóxido no núcleo esterol ou um grupo hidroxila na cadeia lateral da molécula. Os principais OsC encontrados em alimentos, plasma e tecidos são o colest-5-en-3 β , 7 α -diol (7 α -hidroxicolesterol, 7 α -HC; formado por meio do composto instável 7 α -hidroperoxicolesterol); colest-5-en-3 β , 7 β -

diol (7 β -hidroxicolesterol, 7 β -HC; formado via 7 β -hidroperoxicolesterol); 5-colestan- 3 β , 5 α , 6 β -triol (colestanetriol, CT); colest-5-en-3 β -ol-7-ona (7-cetocolesterol, 7-KC); 5,6-epoxi- α 5colestan-3 β -ol (colesterol- α -epóxido, α -CE); 5,6-epoxi- β 5 β -colestan-3 β -ol (colesterol- β -epóxido, β -CE); colest- 5-en-3 β , 20 α -diol (20 α -hidroxicolesterol, 20-CH); colest-5-en-3,22-dioliol β (22-hidroxicolesterol, 22-CH); colest-5-en-3,25-dioliol β (25-hidroxicolesterol, 25-CH) e colest-5-en-3,26-dioliol β (26-hidroxicolesterol, 26-HC) (PANIANGVAIT et al., 1995; MOREL & LIN, 1996; GUARDIOLA et al., 1996). Na Figura 1.6 estão representadas as estruturas químicas de alguns óxidos de colesterol (TAI et al., 1999).

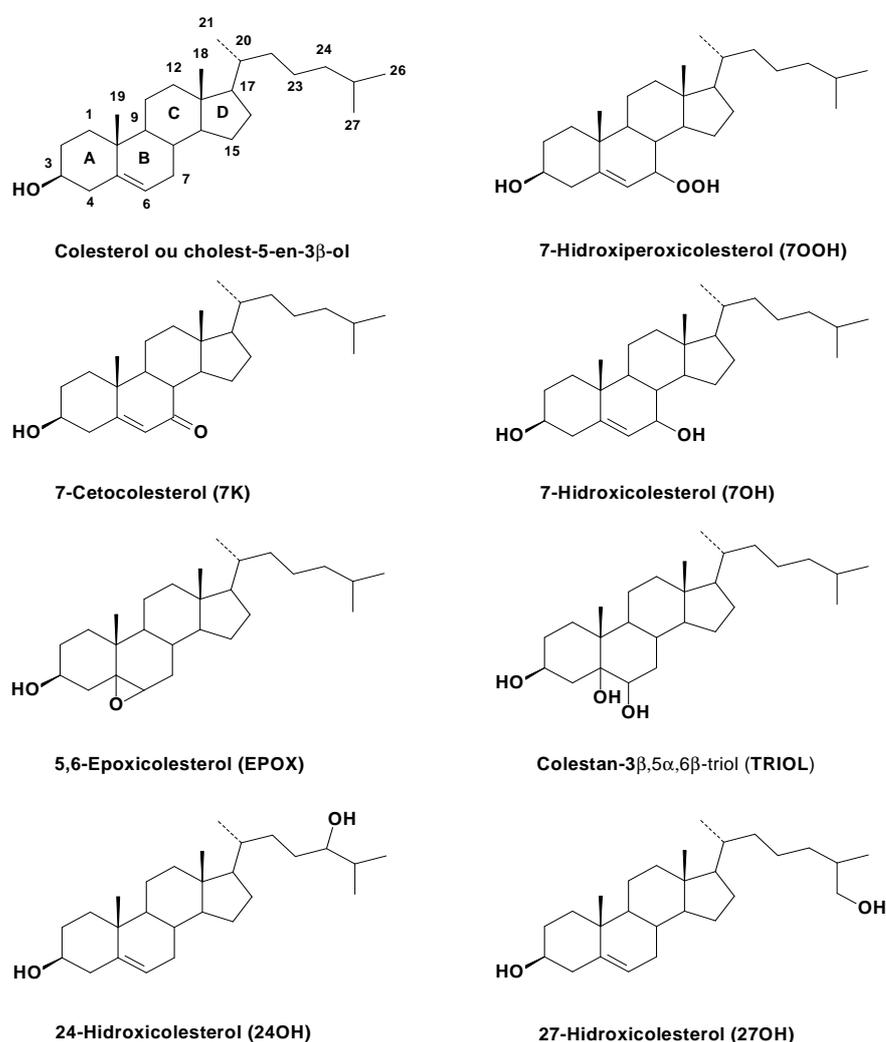


Figura 1.6 Estruturas químicas dos óxidos de colesterol.

Fonte: Tai et al. (1999)

A oxidação do colesterol ocorre por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (GUARDIOLA *et al.*, 1995). Em geral os OsC oxigenados no anel esterol são produzidos por mecanismos não-enzimáticos, enquanto os oxigenados na cadeia lateral requerem enzimas para sua formação (Figura 1.7). Os óxidos 25 e 7 α -hidroxicolesterol são gerados por ambas as vias metabólicas (BROWN & JESSUP, 2009).

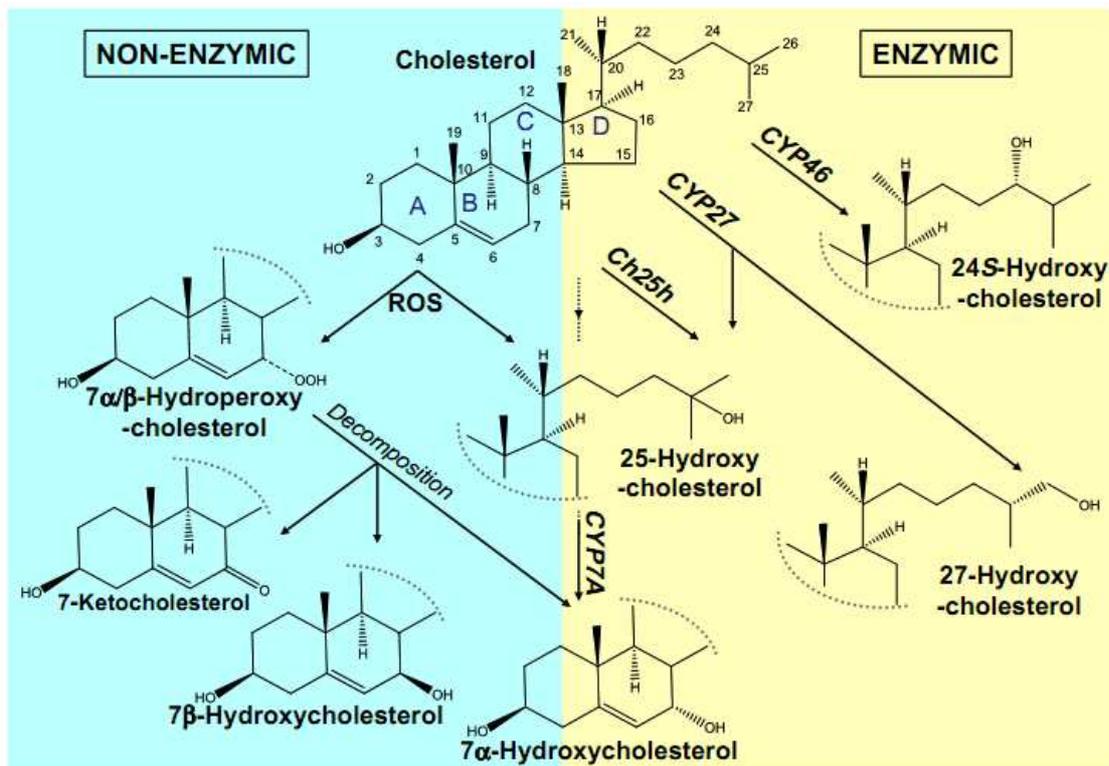


Figura 1.7 Representação esquemática do processo de oxidação do colesterol por via não enzimática e enzimática.

ROS – Espécies reativas de oxigênio.

CYP46 – enzima 24S-colesterol hidroxilase

CYP27 – enzima esterol 27-hidroxilase

Ch25h – enzima colesterol 25-hidroxilase

Fonte: Brown & Jessup (2009).

Os mecanismos enzimáticos ocorrem basicamente no fígado e nos tecidos produtores de hormônios esteroides: córtex supra-renal e gônadas (SMITH, 1996). No fígado a oxidação enzimática do colesterol ocorre por intermédio de uma série de enzimas do citocromo P-450 (BJÖRKHEM, 1992; PIKULEVA, 2008).

A colesterol-7 α -hidroxilase (EC 1.14.13.17) é uma enzima hepática que catalisa a conversão do colesterol em 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OH-Chol) que se constitui em um dos primeiros intermediários na biossíntese dos ácidos biliares (BJÖRKHEM & EGGERTSEN, 2001).

Uma porção de 7 α -OH-Chol formada no fígado é perdida para o sistema circulatório. A seguir, 7 α -OH-Chol é convertido a 7 α -hidroxi-4-colesteno-3-ona por uma enzima microsomal 3 β -hidroxi- Δ^5 -C₂₇-esteroide oxidoredutase (C27 3 β -HSD), que é utilizado como um marcador de síntese de ácido biliar (HEVERIN et al., 2007). A enzima CYP3A4 (enzima do citocromo P-450) converte o colesterol em 4 β -hidroxicolesterol (BODIN et al., 2001). A 24-hidroxilase colesterol cérebro-específica (CYP46A1) converte o colesterol em 24 S-hidroxicolesterol (24-OH-Chol), uma forma que é transportada através da barreira hematoencefálica, e que exerce importante função na manutenção da homeostase do colesterol no cérebro (LÜTJOHANN et al., 1996; OHYAMA et al., 2006). A enzima mitocondrial 27-hidroxilase esterol (CYP27A1), importante para a oxidação da cadeia lateral dos intermediários de colesterol 7 α -hidroxilados durante a biossíntese de ácidos biliares (JAVITT, 2002), é largamente encontrada em tecidos e converte o colesterol a 27-hidroxicolesterol (27-OH-chol) e também produz 27-hidroxi-derivados de precursores de colesterol, incluindo o lanosterol, zymosterol, desmosterol e 7-desidrocolesterol (JAVITT, 2004).

O 25-hidroxicolesterol (25-OH-Chol) é formado como um subproduto de CYP27A1 e por uma enzima classe específica hidroxilase colesterol, a 25-hidroxilase (Chol-25H), que não participa do complexo citocromo P450. Ela pertence a um grupo de enzimas que utilizam oxigênio e Fe²⁺ como cofatores para catalisar reações de hidroxilação (LUND et al., 1998). O OsC 24 (S), 25-epoxicolesterol (24,25-epoxi-Chol) são produzidos durante a síntese do colesterol pela enzima oxidosqualeno ciclase (WONG et al., 2007).

Na oxidação não enzimática o colesterol interage com espécies reativas do oxigênio (ROS) que retiram um átomo de hidrogênio alílico do anel esterol. O radical gerado reage com o oxigênio para formar um radical peroxil colesterol, em seguida há a retirada de hidrogênio e geração dos 7 α / β hidroperóxidos colesterol que são relativamente estáveis. Neste ponto, os hidroperóxidos podem continuar oxidando não enzimaticamente, ou as enzimas os reduzem a epoxicolesteróis. A oxidação não enzimática gera os 7 α / β hidroperóxidos e o 7-cetocolesterol, que são os principais OsC não-enzimáticos presentes na maioria dos tecidos (BROWN & JESSUP, 2009).

A oxidação do colesterol nos alimentos ocorre por mecanismo não enzimático ou auto-oxidação (SMITH, 1987). O processo de auto-oxidação do colesterol (Figura 1.8) tem início com a formação de um radical no carbono C-7 do anel B que reage com o oxigênio molecular triplete ($^3\text{O}_2$) havendo a formação de dois 7-hidroperóxidos (α e β) que são instáveis termicamente, decompondo-se em 7 α -OH, 7 β -OH e 7-cetocolesterol. Os hidroperóxidos 7 α -OH e 7 β -OH encontram-se em equilíbrio, porém há uma tendência de haver predominância da forma 7 β -OH devido à estabilidade da conformação equatorial em relação à axial. Já o 7-cetocolesterol, em meio ácido e sob aquecimento, sofre oxidação gerando 3,5-colestadien-7-ona (SMITH, 1996).

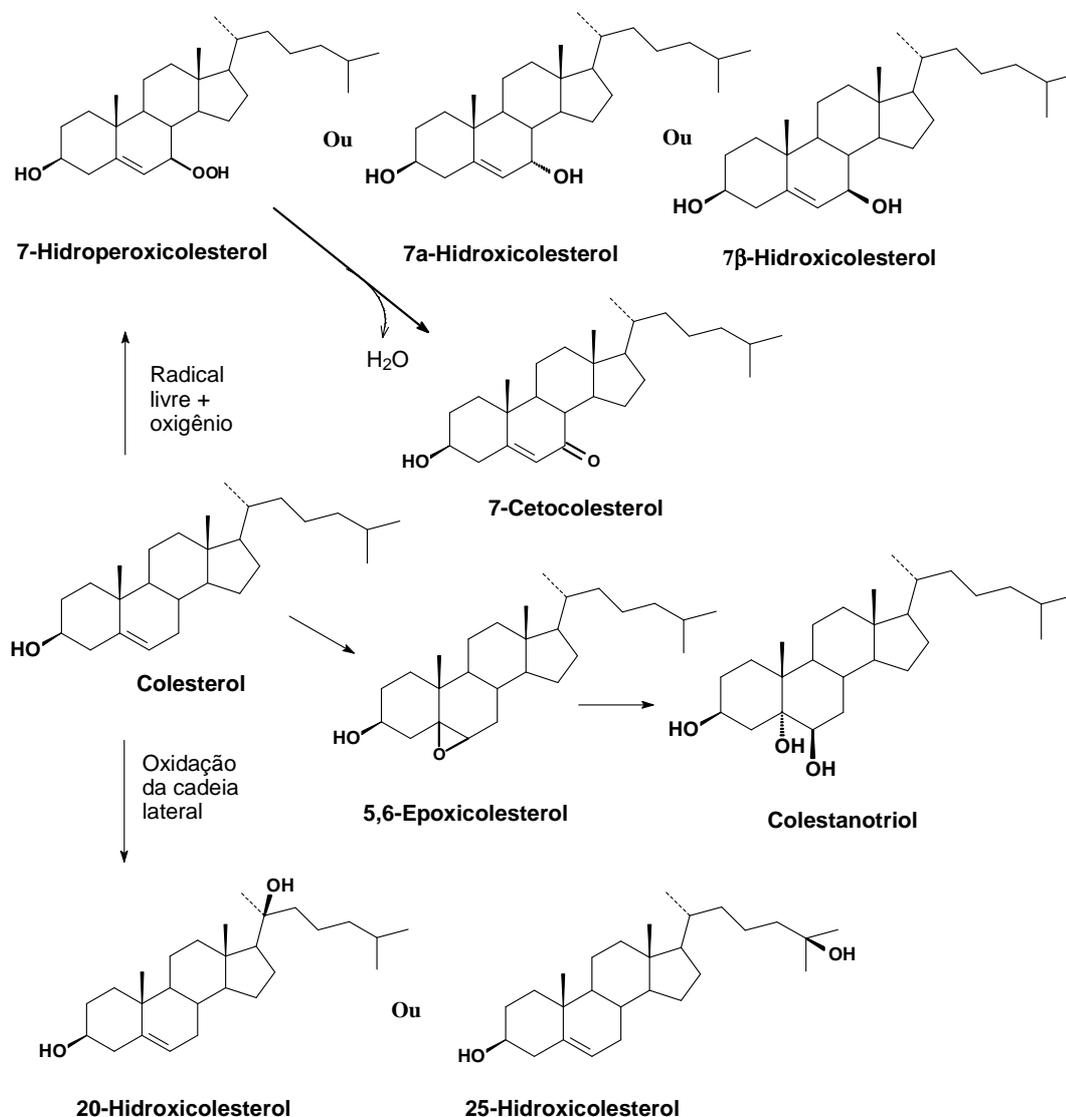


Figura 1.8 Esquema do processo de oxidação do colesterol.

Fonte: Adaptado de Tai et al (1999)

Outro mecanismo de oxidação não enzimática do colesterol, a oxidação fotoquímica, ocorre pela exposição à luz e ao ar e assemelha-se também à auto-oxidação. O colesterol é oxidado pelo oxigênio molecular triplete ($^3\text{O}_2$), espécie gerada fotoquimicamente a partir do oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$), formando hidroperóxidos, entre os quais se destaca o 3 β -hidroxi-5 α -colest-6-eno-5 hidroperóxido (CARDENIA et al., 2013). A decomposição térmica do 3 β -hidroxi-5 α -colest-6-eno-5 hidroperóxido leva à formação do colest-4,6-dien-3-ona e 5 α -colest-6-en-3 β ,5-diol. O 5 α -hidroperóxido por transposição estereoespecífica transforma-se em 3 β -hidroxi-7 α -colest-5-en-7-hidroperóxido que, por sua vez, decompõe-se em 7 α -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol. Neste processo também se forma em menor proporção o 3 β -hidroxicolest-4-en-6-hidroperóxido e seus produtos de decomposição térmica (colest-4-en-3 β ,6-dioles e 3 β -hidroxicolest-4-en-6-ona) (SMITH, 1990).

1.8 FONTES ALIMENTARES DE COLESTEROL E DE ÓXIDOS DE COLESTEROL

As principais fontes de colesterol na dieta são os produtos de origem animal, incluindo ovos, leite e carnes, sendo considerados os mais ricos a gema de ovo, alguns derivados de leite, carne bovina, pele de aves e miúdos (PATEL & THOMPSON, 2006).

Na Tabela 1.1 estão listados os valores médios de colesterol em alguns alimentos de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (TACO, 2011) e com Scherr & Ribeiro (2009).

Os OsC não estão presentes em alimentos frescos, ou estão em quantidades mínimas, portanto o processo oxidativo parece ocorrer durante o processamento e/ou armazenamento dos alimentos (MORALES-AIZPURÚA, TENUTA-FILHO, 2002). Os produtos da oxidação do colesterol nos alimentos são limitados aos de origem animal, uma vez que apenas estes contêm colesterol em quantidades apreciáveis, enquanto gorduras vegetais contêm apenas vestígios dele. Consequentemente, os produtos de origem animal com uma concentração elevada de colesterol são os de maior preocupação (BOSINGER et al., 1993).

Os alimentos de origem animal contêm quantidades de OsC formados por processos não-enzimáticos de oxidação. Os OsC mais comumente encontrados em alimentos, ou seja, o 7 hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, α -epóxido colesterol, β -epóxido colesterol, cetocolesterol, colestanoetriol, 7-cetocolesterol, 20-hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol, são os mesmos que os encontrados no plasma (PANIANGVAIT et al., 1995).

Tabela 1.1 Valores médios de colesterol em alguns alimentos

| Alimento | Colesterol (mg.100 g ⁻¹) | |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| | TACO (2011)* | SCHERR & RIBEIRO (2009) |
| Leite de vaca integral | 10 | - |
| Leite de vaca em pó | 85 | - |
| Queijos | 62-106 | - |
| Carne de frango | 59-158 | - |
| Carne bovina | 34-144 | - |
| Carne suína | 55-126 | - |
| Pescados | 31-282 | - |
| Fígado frito | - | 453,3 |
| Fígado cru | 393 | 332,30 |
| Ovos de granja | - | 397,5 |
| Ovos caipira | - | 400 |
| Coração de frango cozido | - | 287 |
| Camarão grelhado | - | 264 |
| Camarão frito | 283 | 270,50 |
| Manteiga sem sal | 214 | 230,9 |
| Manteiga com sal | 201 | 216,76 |

- = não analisado

*TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

O peixe é caracterizado por um elevado teor de ácidos graxos altamente insaturados, o que o torna particularmente propenso à oxidação lipídica. No entanto, em algumas espécies, a fração de lípidios também apresenta elevados níveis de colesterol, favorecendo assim a formação de OsC (GOKOGLU et al., 2012; UBHAYASEKERA et al., 2012). Esses fatores, associados à exposição à luz durante o processamento e/ou condições de armazenamento, irão promover a oxidação do colesterol (OLIVEIRA & LIRA, 2009).

Sampaio et al. (2006) constatou a presença de produtos da oxidação do colesterol em amostras de camarão salgado-seco e o óxido predominante foi o 7 β -hidroxicolesterol, sendo que a quantidade de óxidos variou consideravelmente de 4,52 $\mu\text{g.g}^{-1}$ a 77,30 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Também foram detectados um total de 11,11 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de óxidos de colesterol em hambúrguer frito com teores de 7-cetocolesterol variando entre 3,45 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 5,33 $\mu\text{g.g}^{-1}$, de 7 α -hidroxicolesterol entre 0,79 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 2,79 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e de 7 β -hidroxicolesterol, entre 5,09 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 5,61 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (TENUTA-FILHO et al.; 2003).

Morales-Aizpurúa & Tenuta-Filho (2005) avaliaram a formação de OsC em maionese e confirmaram a presença do 7-cetocolesterol ($1,99 \pm 0,59 \mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras recém-fabricadas (~15 dias). As amostras de maionese foram avaliadas também ao longo de 165 dias de estocagem (45, 75, 135 e 165 dias) em temperaturas de 4 °C e 25 °C. O 7-cetocolesterol foi detectado em todos os períodos de estocagem (45, 75, 135 e 165 dias) e temperaturas (4 °C e 25 °C) avaliados, sendo encontrado o maior teor após 135 dias a 25 °C ($7,61 \pm 1,14 \mu\text{g.g}^{-1}$ de maionese). Os óxidos 25-hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol e 7 α -hidroxicolesterol só foram detectados a partir de 135 dias de estocagem a 25 °C.

Por meio da análise de OsC e da composição de ácidos graxos em ovos enriquecidos com ômega 3, foi demonstrado que as concentrações de 7-cetocolesterol, aumentaram durante o período de armazenamento e foram maiores nos ovos fritos. Somente o 7-cetocolesterol foi afetado pela temperatura de armazenamento, e a sua concentração foi maior em ovos armazenados a 25 °C (MAZALLI & BRAGAGNOLO, 2009).

O 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol foram encontrados em maior quantidade em amostras de três produtos típicos de comida mexicana: torresmo (*chicharrón*), carne seca (*machaca*) e camarões secos ao sol. A

quantidade total de óxidos variou de $45 \mu\text{g.g}^{-1}$ a $57 \mu\text{g.g}^{-1}$ em torresmo frito e carne seca, enquanto o camarão seco apresentou o maior teor de óxidos ($131 \mu\text{g.g}^{-1}$ a $254 \mu\text{g.g}^{-1}$). A extensão do teor de oxidação do colesterol em torresmo frito, carne seca e camarão seco ao sol foi de 2,3 %, 5,1 % e 14,5 %, respectivamente (RODRÍGUEZ-ESTRADA et al., 2008).

O colesterol sofreu oxidação em amostras de carne (boi, vitela e porco) durante a cocção doméstica e a taxa de oxidação diferiu de acordo com o tempo e temperatura de cozimento. A quantidade total de OsC produzida variou de 0,3 % a 0,8 % de colesterol. Todos os óxidos (7 α e β -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, α e β -epóxidos, 20 e 25-hidroxicolesterol e colestanoetriol) aumentaram progressivamente em amostras de carne armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 meses em carne cruas e cozidas (PIE et al., 1991).

Particularmente em relação à presença de OsC em pescados, alguns trabalhos também foram conduzidos. Considerando que os peixes contêm uma quantidade relativamente mais alta de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa que a maioria dos outros produtos alimentares, eles seriam mais suscetíveis à formação de OsC (TAI et al., 2000).

Em pequenos peixes secos ao sol (*Spratelloides gracilis* and *Decapterus maruadsii*) foram identificados quatro OsC incluindo 7 α -hidroxicolesterol e 7 β -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol e 5,6 α -epoxicolesterol, armazenados à temperatura ambiente durante 3 meses sob ar. A concentração total de OsC nos peixes secos ao sol variou de $4,82 \mu\text{g.g}^{-1}$ a $65,7 \mu\text{g.g}^{-1}$, com o 7 α -hidroxicolesterol aparecendo como o produto predominante (CHEN & YEN, 1994).

Osada et al. (1993a), relataram não haver óxidos no peixe cru, porém encontraram valores consideráveis em sardinhas ($28,7 \text{ mg.}100^{-1}$) e lulas ($14,6 \text{ mg.}100^{-1}$) que foram submetidas à secagem ao ar. Grandes quantidades de óxidos em base seca ($9,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ a $138 \mu\text{g.g}^{-1}$) também foram encontradas em anchovas salgadas e secas, sendo os óxidos 7 β -hidroxicolesterol e o 7-cetocolesterol em maior quantidade (OHSHIMA et al., 1993).

Saldanha et al. (2008) avaliaram a influência do armazenamento na formação de óxidos em sardinhas cruas. Verificaram um aumento no teor de óxidos após 120 dias de armazenamento a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ cuja variação foi de $19,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ para $177,9 \mu\text{g.g}^{-1}$. Os óxidos de colesterol identificados foram o 19-hidroxicolesterol, 22(S)-hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 25(R)-hidroxicolesterol e

7-cetocolesterol, sendo o mais abundante o 19-hidroxicolesterol. Observaram ainda que os óxidos de colesterol aumentaram gradualmente durante o armazenamento sendo a formação do 7-cetocolesterol 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 mg.100 g⁻¹ para 152 mg.100 g⁻¹ demonstrando que o armazenamento doméstico em freezer possibilita a oxidação do colesterol.

Ubhayasekera et al. (2012) avaliaram a formação de óxidos de colesterol em *jaadi* (um produto de peixe em conserva) preparada com o peixe cavala durante 18 semanas de armazenamento. Os teores de óxidos de colesterol variaram de 0,2 mg. 100 g⁻¹ a 3,8 mg.100 g⁻¹ de amostra, sendo que ocorreu um aumento dos teores até 6 semanas de armazenamento e, em seguida, uma redução gradual.

Park e Addis (1985) apontam o uso do 7-cetocolesterol como um marcador de oxidação do colesterol, porque é um dos compostos mais representativos entre os OsC sob o ponto de vista quantitativo. O 7-cetocolesterol é utilizado como um indicador da oxidação do colesterol nos alimentos processados por ser produzido em grandes quantidades nas fases iniciais do processo oxidativo, especialmente em peixes e outros produtos do mar, sendo considerado um marcador que fornece uma avaliação simples e confiável da extensão da oxidação do colesterol (PENAZZI et al. 1995 , ZUNIN et al. , 2001; MORALES-AIZPURÚA & TENUTA-FILHO, 2005).

1.9 FATORES QUE INFLUENCIAM A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL EM ALIMENTOS

A exposição à luz, o calor, a radiação, a presença de radicais livres, oxigênio e metais de transição são alguns fatores que têm sido investigados na oxidação do colesterol em alimentos (PANIANGVAIT *et al.*, 1995; SAMPAIO et al., 2006).

Outras variáveis incluindo as inerentes ao próprio alimento atuam de forma isolada ou concomitante na oxidação do colesterol. Vale citar o conteúdo de água, pH, concentração e formas física e química do colesterol, tipo de ácido graxo presente, presença de antioxidantes ou pró-oxidantes, as interações entre seus componentes e produtos de decomposição durante o processamento e/ou armazenamento (SMITH, 1987; PANIANGVAIT *et al.*, 1995). Contudo, de acordo com Tai, Chen & Chen (1999), a combinação de temperatura elevada, disponibilidade de oxigênio e de ácidos graxos

poli-insaturados tem sido apontada como a principal responsável pela formação dos OsC em alimentos.

O colesterol submetido a temperaturas elevadas durante certo período de tempo sofre oxidação gerando uma grande quantidade de óxidos. Em 1967, Fioriti & Sim constataram que uma solução de colesterol aquecida a 82 °C por 9 semanas produziu 13 tipos de OsC. As altas temperaturas utilizadas no processo de produção de ovo em pó por *spray dryer* foram responsáveis pela formação de OsC ao acelerar as reações entre os lipídios e o oxigênio molecular (MORGAN & ARMSTRONG, 1992). Guardiola et al. (1997) verificaram que a temperatura crítica do *spray-dryer* é de 128 °C a 142 °C, onde ocorre um aumento considerável na formação dos OsC.

É provável que o período de aquecimento longo desempenhe um papel importante na formação dos OsC. Osada et al. (1993) constataram que o colesterol foi aparentemente estável a 100 °C e, quando aquecido a 120 °C ou mais o colesterol foi instável e, completamente degradado, quando aquecido a 200 °C durante mais de 6 horas. Nas temperaturas intermediárias de 120 °C e 150 °C, cerca de 60 % e 40 % de colesterol permaneceram inalterados, respectivamente. Os resultados indicaram que o colesterol é facilmente oxidado a altas temperaturas, enquanto é bastante estável a temperaturas convencionalmente utilizadas para a cocção (100 °C) durante um tempo curto.

Na oxidação do colesterol em alimentos, a presença de ácidos graxos poli-insaturados apresentou uma maior correlação com o perfil dos óxidos formados e suas quantidades relativas (PANIANGVAIT et al., 1995).

Os ácidos graxos poli-insaturados são mais propensos à peroxidação lipídica pela maior suscetibilidade dos átomos de hidrogênio bi-alílicos do grupo metileno à abstração por radicais oxidáveis, que os hidrogênios metilênicos dos lipídios saturados (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1994). Os hidroperóxidos formados durante a oxidação lipídica dos ácidos graxos podem ser necessários para a iniciação da oxidação do colesterol (SMITH, 1987).

LI et al. (1996) avaliaram a oxidação do colesterol em óleos de pescado, linhaça, girassol e palma, durante estocagem e aquecimento. Constataram que houve maior formação de OsC no óleo de peixe, sendo que após 35 dias de armazenamento a concentração foi três vezes maior que nos óleos vegetais. A maior proporção de OsC no óleo de peixe foi associada aos seus níveis mais elevados de ácidos graxos insaturados, em especial os poli-insaturados ômega-3. Ressalta-se também que a

presença de antioxidantes nos óleos vegetais, como o tocoferol, inibe a oxidação do colesterol (XU et al., 2009).

Vários estudos têm sido conduzidos para avaliar a ação de antioxidantes adicionados a alimentos propensos à oxidação lipídica e do colesterol. Assim, os efeitos antioxidantes dos extratos de alho e de tomate foram investigados em amostras congeladas de croquete de peixe. Os extratos foram adicionados à formulação do croquete na proporção de 3 %. A qualidade lipídica dos croquetes congelados foi analisada a intervalos mensais. Os resultados para o ácido tiobarbitúrico, a *para*-anisidina, e dieno conjugado demonstraram que o extrato de tomate foi mais eficaz do que o extrato de alho em retardar a oxidação de lipídios (GOKOGLU et al., 2012). Lebovics et al. (2009) verificaram que houve redução significativa ($p < 0,05$) nos teores de 7α -hidroxicolesterol, 7β -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol nas amostras de filés de peixe carapau congeladas que foram previamente tratadas por imersão (45 min) em solução aquosa de um extrato vegetal antioxidante (hissopo, prunella, erva cidreira e alecrim) em relação às amostras controle.

Os estudos têm demonstrado também que o tempo, a temperatura e as condições de estocagem dos alimentos influenciam na formação dos OsC. Caboni et al. (2005) afirmaram que os óxidos de colesterol são importantes marcadores das condições de estocagem já que as concentrações destes óxidos aumentaram significativamente durante o período de validade de amostras de ovos secos por *spray dry*. Pie et al. (1991) também encontraram um aumento de OsC em carnes moídas armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/3$ meses e sugeriram que os produtos alimentares armazenados congelados são mais susceptíveis à oxidação do colesterol do que os produtos consumidos frescos.

Amostras de filé de merluza no momento inicial de armazenamento apresentaram baixos níveis de OsC, no entanto, após 120 dias de armazenamento, as concentrações aumentaram de forma significativa, em ambas as condições de armazenamento (embalagens de baixa e de alta permeabilidade ao oxigênio). O armazenamento congelado comercial com embalagem de baixa permeabilidade de oxigênio foi mais eficaz na prevenção da oxidação lipídica do que a embalagem de alta permeabilidade de oxigênio, com a degradação do colesterol menos acentuada, bem como a formação de óxidos de colesterol (SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2008).

O uso da barreira contra a luz foi importante na prevenção da oxidação do colesterol em massas de espaguete preparadas com ovos (VERARDO et al., 2010).

Conchillo et al. (2005) analisaram amostras de peitos de frango crus e cozidos armazenados a -18 °C por três meses sob condições aeróbica e a vácuo. A embalagem a vácuo foi particularmente eficiente em retardar o processo de oxidação durante o armazenamento congelado das amostras cozidas.

1.10 IMPLICAÇÕES DO CONSUMO DO COLESTEROL E SEUS ÓXIDOS NA SAÚDE HUMANA

A hipercolesterolemia crônica é apontada como um dos mais importantes fatores de risco para as doenças cardiovasculares (BERGMANN *et al.*, 2011; BIGGERSTAFF & WOOTEN, 2004). As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte em mulheres e homens no Brasil. Cerca de 20 % das mortes de indivíduos acima de 30 anos são atribuídas às doenças cardiovasculares. Em 2009, de acordo com os dados do MS, ocorreram 962.931 mortes em indivíduos com mais de 30 anos. As doenças isquêmicas do coração foram responsáveis por 95.449 mortes e as doenças cerebrovasculares por 97.860 mortes. As causas cardiovasculares atribuíveis à aterosclerose foram responsáveis por 193.309 mortes, às neoplasias por 166.036 mortes, as causas respiratórias responderam por 106.927 mortes, as causas externas por 77.503, as doenças do aparelho digestivo por 53.754 mortes e as do aparelho geniturinário por 21.527 mortes (MANSUR & FAVARATO, 2012).

Há muito tempo, as investigações epidemiológicas com populações que apresentavam uma alta ingestão de alimentos ricos em colesterol, apontam uma expressiva correlação entre este tipo de alimentação com a maior incidência de aterosclerose (KLAG *et al.*, 1993; KWITEROVICH, 1997). Apesar de o colesterol alimentar relacionar-se à elevação do colesterol plasmático, seu efeito é menor (aproximadamente 56 % do colesterol da dieta são absorvidos) quando comparado a outras variáveis alimentares, como ingestão de ácidos graxos saturados e *trans*, ou mesmo ao consumo total de gordura (LOTTENBERG, 2009, SANTOS *et al.*, 2013). Dietas contendo alto teor de colesterol, ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* são consideradas hipercolesterolêmicas e estão associadas com o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares (ROBERTS, 1992). Os ácidos graxos *trans* são mais preocupantes que os saturados porque além de aumentarem o nível de LDL-colesterol, diminuem o nível de HDL-colesterol (ROOS *et al.*, 2001).

A relação entre o colesterol alimentar, sua absorção e o metabolismo de remanescente de quilomícrons e aterosclerose é complexa. O mecanismo molecular da absorção dos esteróis não é totalmente conhecido, entretanto sabe-se que a *Niemann-Pick C1 Like 1 Protein* (NPC1L1) é a principal proteína na membrana da borda em escova responsável por essa captação. A maior parte do colesterol é esterificada dentro do enterócito pela enzima acil coenzima A colesterol aciltransferase (ACAT) e, incorporada aos quilomícrons na membrana basolateral, o que acarreta a secreção dessas partículas para o sistema linfático. Pequena quantidade de colesterol não esterificado retorna ao lúmen intestinal por meio de transportadores específicos, as adenosinas trifosfatos-ligação cassete (ABC) transportadores, ABCG5 e ABCG8 (YU et al., 2002).

A influência do colesterol alimentar na colesterolemia é variável em animais e homens. Esta heterogeneidade na resposta da colesterolemia tem sido explicada por diferentes genótipos de apoE. Estudos mostram que indivíduos portadores do alelo E4 apresentam maior absorção de colesterol quando submetidos a uma dieta rica em colesterol, e o contrário ocorre com portadores do alelo E2. Em geral, portadores do alelo E3 absorvem normalmente o colesterol da dieta e representam aproximadamente 50 % da população (AGREN et al., 2006).

Apesar das controvérsias sobre efeito do colesterol alimentar na colesterolemia, diretrizes internacionais recomendam a restrição de gorduras totais e do colesterol da dieta, objetivando redução e controle do colesterol e LDL-colesterol plasmáticos (FNIC-DRI, 2005; NCEP, 2001). Sendo assim, a Sociedade Brasileira de Cardiologia publicou em 2013, a I Diretriz sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular, nela constando que o consumo de colesterol alimentar deve ser < 300 mg/dia para auxiliar no controle da colesterolemia (SANTOS et al., 2013).

A aterosclerose (Figura 1.9) é um resultado primário de concentrações elevadas de LDL-colesterol e concentrações reduzidas de HDL-colesterol (STAMPFER et al., 1996). As LDL em excesso na circulação participam da formação do ateroma, após serem modificadas por oxidação. As lesões iniciais resultantes do processo aterosclerótico contêm células espumosas que são formadas em sua maioria por macrófagos repletos de colesterol esterificado. Como a captação da LDL oxidada não regula a atividade dos receptores “scavengers”, sua remoção contínua induz o acúmulo de colesterol intracelular, o qual é esterificado pela enzima ACAT que é responsável pelo armazenamento do colesterol no citoplasma (LOTTENBERG, 2009). As LDL

oxidadas geradas de moléculas de derivados lipídicos (óxidos de colesterol, ácidos graxos peroxidados), se acumulam no espaço vascular subintimal. Eles produzem a adesão de monócitos e a transmigração que culminam com a formação de células espumosas. A proliferação de células espumosas, além de inflamação e apoptose gera uma cápsula fibrótica (placa de ateroma). A instabilidade e liberação desta placa resultam em trombose (STEINBERG, 2002; POLI et al, 2009).

Além do papel do colesterol, nos últimos anos tem havido vários estudos sobre o papel dos óxidos de colesterol (OsC) na saúde humana. Há relatos de que os óxidos estão potencialmente envolvidos na iniciação e progressão de doenças crônicas, incluindo a aterosclerose, processos neurodegenerativos, diabetes, insuficiência renal (GUARDIOLA et al., 1996; SOTTERO et al., 2009).

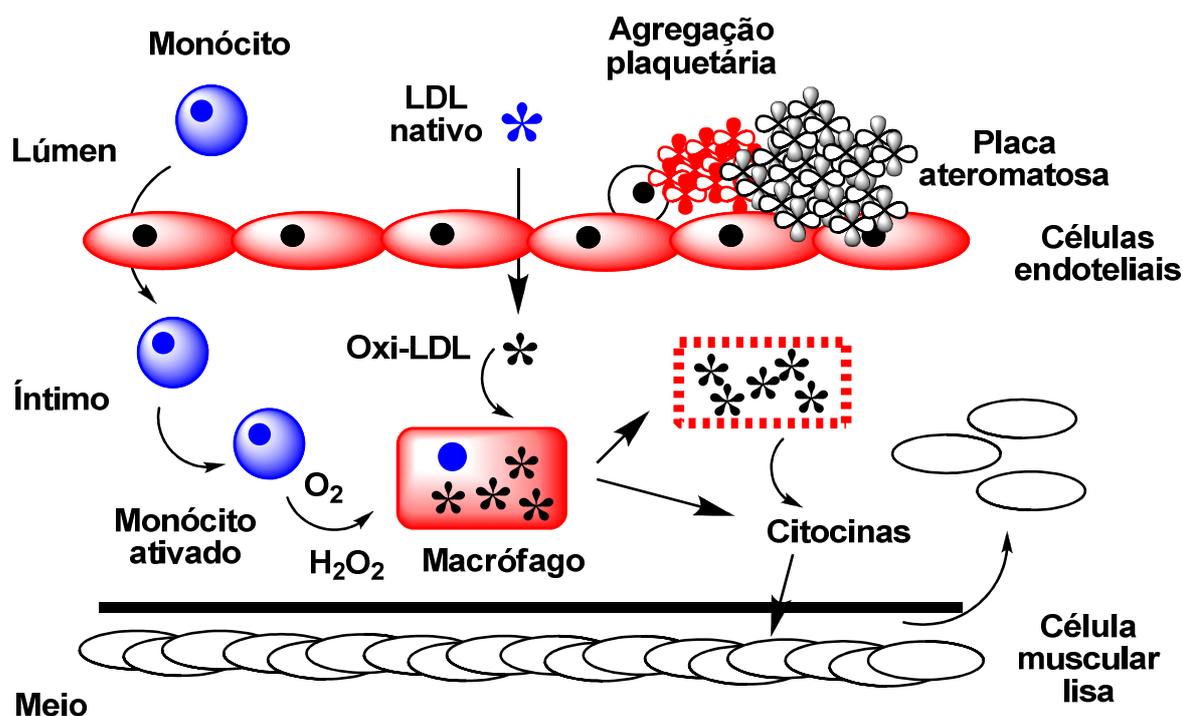


Figura 1.9 Esquema do processo de aterogênese.

LDL: Lipoproteína de baixa densidade.

Adaptado de Otaegui-Arrazola et al. (2010).

Apesar de existirem fortes evidências de que os OsC representam uma classe de potentes reguladores biológicos, o papel fisiológico dos mesmos ainda é

controverso, pois há vários estudos sobre seus efeitos deletérios no organismo (GUARDIOLA et al., 1996; SMITH, 1996; LYONS et al., 1999; BROWN & JESSUP, 1998; RUSSEL, 2000; LEONARDUZZI et al., 2002).

Os OsC encontrados em organismos vivos são derivados tanto da dieta quanto de processos endógenos enzimáticos (OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2010). Vários desses compostos têm sido associados a efeitos biológicos indesejáveis como citotoxicidade (SOTTERO et al., 2009), aterogenicidade (POLI et al., 2009), mutagenicidade, carcinogenicidade, mudanças nas propriedades da membrana celular e interferências no metabolismo de esteróis (BÖSINGER et al., 1993; JUSAKUL et al., 2011).

Os efeitos citotóxicos dos OsC foram demonstrados por Ó'Callaghan et al. (2001) em células monocíticas de sangue humano, ao verificarem que 7 β -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol e β -epóxido causaram a morte celular por apoptose, ou seja, morte celular não seguida de autólise.

Várias rotas citotóxicas foram propostas para os OsC, como: perturbação dos níveis de cálcio intracelular, a superprodução de espécies reativas de oxigênio, modificações das membranas mitocondrial e lisossomal e perturbações metabólicas de poliaminas (ROUSSI et al., 2006; SOTTERO et al., 2009).

Em relação aos diferentes tipos de OsC existentes, os considerados mais citotóxicos são o 7-hidroxi, 7-cetocolesterol e derivados de triol (MEYNIER et al., 2005; RYAN et al., 2005). O 7-cetocolesterol parece ser o mais potente na promoção da via extrínseca de apoptose, tal como confirmado em células de músculo liso humanas (RHO et al., 2005; LEE et al., 2005), bem como em células da retina de ratos e humanos (NEEKHRA et al., 2007; LUTHRA et al., 2006). Por outro lado, principalmente o 7 β -OH e 7-cetocolesterol parecem induzir a via mitocondrial da apoptose em diferentes tipos de células (MIGUET et al., 2001; MONIER et al., 2003).

Há uma possível correlação entre os OsC na atividade de mutação e o desenvolvimento de câncer. Linseisen et al (2002) sugeriram que os níveis plasmáticos de 7 β -hidroxicolesterol é um preditor independente de tabagismo e biomarcador para o risco de câncer de pulmão. Outros estudos investigaram a relação positiva e ou negativa dos OsC com câncer de cólon (BIASI et al., 2013) e câncer de mama (POIROT & SILVENTE-POIROT, 2013). Por meio de um estudo epidemiológico foi estabelecida uma correlação entre o risco de câncer de pulmão e oxisteróis. Seis OsC (7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, α -epóxido colesterol, β -epóxido colesterol,

colestanoetriol, 7-cetocolesterol, 7-ceto-pregnenolona) foram medidos no plasma de 20 pacientes com câncer de pulmão. Os resultados mostraram níveis ligeiramente elevados de todos os oxisteróis, quando comparados com o controle, exceto para 7 α -hidroxicoolesterol e α -epóxido colesterol. Adicionalmente, a análise de risco não demonstrou uma relação estatística significativa entre as concentrações de OsC e desenvolvimento de câncer de pulmão. No entanto, quando ajustaram para a prática esportiva, a associação entre níveis de 7 β -hidroxicoolesterol e câncer de pulmão foi significativa. Por meio dos dados obtidos foi sugerido que os níveis plasmáticos de 7 β -hidroxicoolesterol são preditores independentes do fumo e biomarcadores para o risco de câncer de pulmão (LINSEISEN et al., 2002).

Kuver (2012) ao revisar os papéis fisiológico e fisiopatológico dos OsC sob o ponto de vista do sistema biliar, relata que eles estão presentes tanto na bile humana quanto nos cálculos biliares. Os OsC biliares interagem com as células epiteliais biliares, induzindo a apoptose via mitocondrial e modulam as funções das células epiteliais biliares tais como a secreção de mucina. Os OsC do trato biliar estão associados com o colangiocarcinoma (câncer das vias biliares), sendo identificados dois OsC, o colestano-5 α , 3 β , 6 β -triol e 3 ceto-colest-4-eno, presentes em níveis significativamente mais elevados no fígado de *hamsters* com colangiocarcinoma induzida por *Opisthorchis viverrini* (parasita do fígado).

Jusakul et al. (2011) ao revisarem os mecanismos da carcinogênese induzida por óxidos de colesterol concluíram, por meio dos resultados obtidos de estudos *in vitro* e *in vivo*, que há uma associação entre os óxidos de colesterol e o desenvolvimento e a progressão do câncer de cólon, pulmão, mama e dutos da bile. Neste contexto os OsC exercem um papel crítico em vários estágios da carcinogênese conforme Figura 1.10. Em primeiro lugar, estão envolvidos na iniciação do tumor por aumentar a produção de ROS/RNS (espécies reativas de oxigênio/espécies reativas de nitrogênio). Em segundo lugar, a promoção do tumor é reforçada pelos OsC por meio da expressão supra-regulada das proteínas, tais como a ciclooxigenase-2 (COX-2) levando à alteração de fenótipos celulares. Além disso, certos OsC contribuem para a progressão do câncer por meio da indução de migração do tumor. Eles exercem o seu efeito ligando-se a proteínas específicas e ativando cascatas de sinalização.

Novas investigações sobre os OsC e seu impacto na carcinogênese são necessárias para o desenvolvimento de melhores estratégias para a prevenção e o tratamento de vários tipos de câncer.

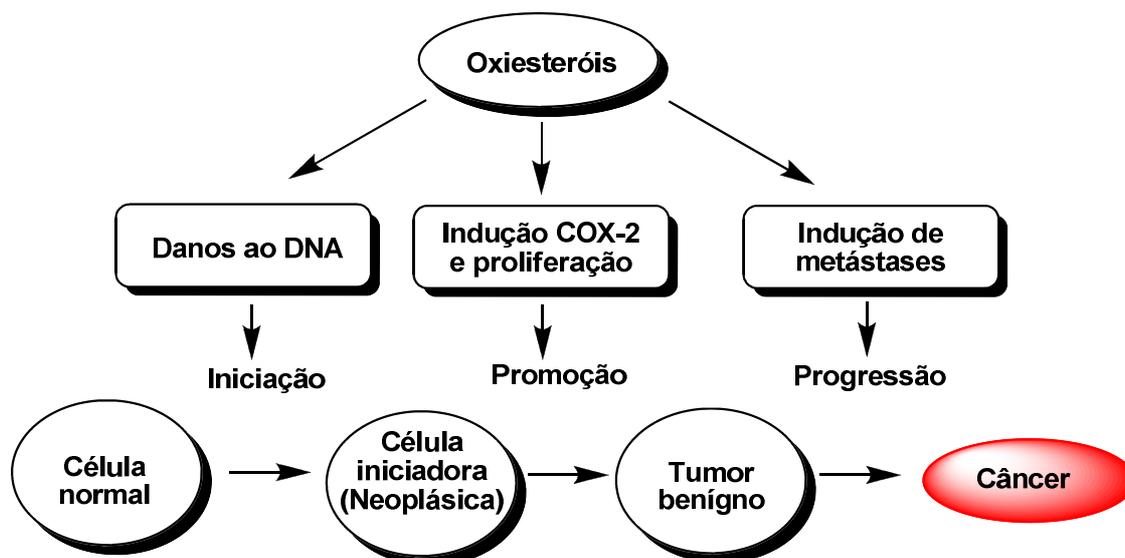


Figura 1.10 Esquema simplificado dos efeitos dos OsC no processo de oncogênese.

Fonte: Jusakul et al., 2011

A aterosclerose é principalmente associada à hipercolesterolemia e inflamação (STEINBERG, 2002). No entanto, também foram conduzidos estudos para verificar a influência dos OsC no processo aterosclerótico. Cook & MacDougall (1968) demonstraram a toxicidade do colestano 3 β , 5 α , 6 β -triol (colestanoetriol) em coelhos machos da linhagem Nova Zelândia brancos, que tiveram considerável fibrose e calcificação da aorta após alimentação contendo os OsC em níveis de 0,1 % em uma dieta basal, correspondendo a cerca de 30 mg.Kg⁻¹ de peso corporal/dia. A duração da alimentação variou de 27 a 350 dias.

Geralmente defende-se que a progressão da lesão das áreas vasculares ateroscleróticas está num estado de inflamação persistente. Como consequência, qualquer novo estímulo inflamatório nas áreas subintimal torna-se automaticamente um estímulo pró-aterogênico (ROSS, 1993). Há uma crescente evidência do papel pró-inflamatório e pró-aterogênico da LDL oxidada. Tem sido demonstrado que as LDL oxidadas regulam a expressão de citocinas inflamatórias, tais como a interleucina-1 (IL-1) e interleucina-8 (IL-8) nas células monocíticas (TERKELTAUB et al., 1994), fator- α necrose tumoral (TNF- α) em células monocíticas (JOVINGE et al., 1996) e

quimiocinas, tais como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), nas células endoteliais e do músculo liso (CUSHING et al., 1990).

As LDL oxidadas acumulam no endotélio dos vasos sanguíneos, constituindo-se em um dos componentes mais importantes na formação do ateroma (STEINBERG, 1991). Elas não são reconhecidas por receptores de LDL sendo então absorvidas por receptores nos macrófagos presentes nas paredes arteriais (STOCKER & KEANEY, 2004). Os principais OsC associados à oxidação das LDL são o 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 5,6 α -epóxido, 5,6 β -epóxido e 7-cetocolesterol (ADDIS et al., 1989). Em células monocíticas humanas, o 7-cetocolesterol, 7 β -hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol foram potentes indutores *in vitro* de uma variedade de moléculas, tais como a IL-8, TNF- α , proteína inflamatória macrofágica - 1 β e MCP-1 avaliadas por citometria de fluxo múltiplo (PRUNET et al., 2006).

Poli et al. (2009) relatam que os OsC estão envolvidos nas seguintes etapas fundamentais do processo aterogênico: disfunção das células endoteliais (aumento de permeabilidade); adesão e transmigração dos monócitos (expressão de moléculas de adesão celular, quimiocinas e citocinas; a geração de células espumosas (a diferenciação de monócitos a macrófagos); interação entre os macrófagos e as células do músculo liso e superprodução da matriz extracelular; inflamação e formação da placa fibrótica; a apoptose vascular e degradação da matriz extracelular. O aumento dos níveis de 7 β -hidroxicolesterol desempenha um papel importante na indução de estresse oxidativo em placas de ateroma, estimulando a produção de ROS e diminuindo os antioxidantes celulares (LARSSON et al., 2006).

A implicação dos OsC dietéticos na aterogênese não é bem esclarecida, recentemente dietas enriquecidas com OsC têm sido associadas a efeitos aterogênicos em ratos com deficiência de Apolipoproteína E (STAPRANS et al., 2000). Os OsC dietéticos desencadearam um processo inflamatório, promovendo a aterogênese e atrofia de tecidos em ratos (SOTO-RODRIGUEZ et al., 2009).

O processo inflamatório associa-se a várias condições crônicas como a aterogênese, obesidade e doença de *Alzheimer*. Há uma dificuldade de se estudar todas as rotas envolvidas, pois múltiplas moléculas estão envolvidas nos efeitos pró ou anti-inflamatórios. Contudo, os OsC demonstraram regular a expressão de várias moléculas inflamatórias, incluindo moléculas de adesão, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2010).

Em estudo com ratos *Wistar* alimentados com dieta padrão complementada com 1 % de colesterol puro ou 1 % de uma mistura de colesterol oxidado, houve um aumento significativo na pressão arterial e triacilgliceróis no soro, bem como um aumento do índice de gordura corporal e tecido adiposo pericárdico, abdominal e epididimal nos animais alimentados com colesterol oxidado. Estes efeitos foram acompanhados por circulação de níveis elevados de proteína C-reativa de alta sensibilidade no plasma, fator de necrose tumoral alfa e resistina. Os autores sugeriram que os OsC dietéticos têm um importante efeito pró-inflamatório (SOTO-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Os OsC também podem induzir a expressão do gene atípico em células neuronais que podem contribuir para a etiologia ou patogênese de doenças inflamatórias do cérebro (ALEXANDROV et al., 2005).

Os OsC também têm sido associados à alteração da permeabilidade na membrana para vários compostos. Alguns OsC demonstraram reduzir a permeabilidade da glicose em lipossomas, com uma tendência de eficácia que se assemelhava ao efeito de sua condensação no modelo de monocamadas lipídicas: assim 7-cetocolesterol foi o mais poderoso, seguido por 7 β -OH e 7 α -OH. Por outro lado, o 25-hidroxicolesterol não mostrou qualquer efeito de condensação sendo considerado um espaçador de molécula (THEUNISSEN et al., 1986).

Holmes & Yoss (1984) relataram um aumento da permeabilidade de lipossoma a cátions (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Na^{+}) causados pelo 25-hidroxicolesterol e 25-hidroxi vitamina D-3. Concluíram que os efeitos observados na permeabilidade dos lipossomas foram compatíveis com a hipótese que as consequências patogênicas da ingestão de elevados níveis de 25-hidroxicolesterol e de vitamina D são devidas à inserção dos 25-hidroxi-esteróis nas membranas celulares e uma resultante alteração de sua permeabilidade a cátions.

1.11 MÉTODOS DE ANÁLISE DO COLESTEROL E DO 7-CETOCOLESTEROL

Independentemente do método utilizado, a determinação de colesterol e seus óxidos envolve as seguintes etapas: extração dos lipídios totais utilizando solvente orgânico apolar, puros ou em mistura de polaridade crescente, remoção do solvente extrator; saponificação alcalina dos ácidos graxos; extração da matéria

insaponificável; remoção do solvente e quantificação (BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A primeira etapa necessária à análise de lipídios em alimentos consiste em extraí-los com um solvente. Os procedimentos de extração baseiam-se no uso de solventes orgânicos de características hidrofóbicas que permitam a resolução seletiva dos lipídios, de forma que sejam separados os remanescentes hidrofóbicos e os componentes não-lipídicos (RUÍZ-GUTIERRÉZ & PÉREZ-CAMINO, 2000).

O uso de um único solvente não é recomendável para a extração dos lipídios de tecidos animais, já que possuem uma faixa grande de relativa hidrofobicidade. Lipídios neutros estão ligados covalentemente podendo ser extraídos por solventes apolares. Já lipídios polares que estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio requerem solventes polares capazes de quebrar as ligações e liberá-los. O solvente ou a mistura de solventes, ideal para extração dos lipídios de tecidos deve ser capaz de removê-los das associações com membranas celulares ou com lipoproteínas, sem que ocorra qualquer reação química (CERTÍK et al., 1996). Pesquisadores, como Folch et al. (1957), reconheceram estas características intrínsecas da extração de lipídios e desenvolveram um método no qual é utilizada uma mistura de clorofórmio e metanol, seguida pela adição de solução de cloreto de potássio (KCl), o que aumenta a força iônica do meio, propiciando uma melhor separação das fases.

Os esteróis, como o colesterol, constituem o componente principal da fração insaponificável, sendo encontrado tanto no estado livre quanto esterificado com ácidos graxos de massa molecular elevada, tais como o esteárico, oleico e palmítico (FENTON, 1992; PERKINS, 1993; FERREIRA, 2000). Na massa muscular esquelética predomina a forma livre (MOURA & TENUTA-FILHO, 2002; PHILLIPS et. al., 2002).

Para a quantificação total de esteróis como o colesterol, é necessária a conversão dos ésteres de esterol em esterol livre, sendo a saponificação o método mais frequentemente utilizado (PERKINS, 1993; MOURA & TENUTA-FILHO, 2002; PHILLIPS et. al., 2002).

A saponificação é a reação dos triacilgliceróis com álcalis promovendo o rompimento das ligações ésteres na matriz lipoproteica. Prefere-se a utilização de KOH por produzir sabão mole, o que determina a não solidificação dos extratos obtidos à temperatura ambiente (PERKINS, 1993). Na saponificação as relações de solubilidade são invertidas, ou seja, quando se saponifica um tecido de origem animal contendo colesterol, grande parte dos fosfolipídios, gorduras e proteínas são convertidos em

produtos solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos. Assim, a extração dos insaponificáveis separa o colesterol solúvel em solvente orgânico dos triacilgliceróis e ácidos graxos, que permanecem na fase aquosa ou alcoólica. Da extração com solvente orgânico obtém-se a fração de lipídios não saponificável (FERREIRA, 2000).

Os principais métodos utilizados na determinação de colesterol são colorimétricos, enzimáticos e cromatográficos (FERREIRA, 2000; BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os métodos colorimétricos apresentam baixo custo, porém tendem a superestimar o teor de colesterol quando na presença de interferentes como: fitoesteróis, ácidos graxos insaturados, vitamina A e proteínas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1996). O método colorimétrico envolve a reação com ácido sulfúrico concentrado e ácido acético saturado com sulfato ferroso, e leitura a 490 nm (BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

O método enzimático baseia-se na degradação do colesterol pela enzima colesterol-oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio, que por meio de reação secundária produz cor. A intensidade de cor produzida é diretamente proporcional a quantidade de colesterol contida na amostra (PASIN et al., 1998). A metodologia enzimática também tende a superestimar os teores de colesterol, pois compostos contendo o grupo 3β -OH, incluindo os fitoesteróis, também reagem com esta enzima (ULBERTH & REICH, 1992; RODRIGUEZ-AMAYA, 1996).

A cromatografia tem sido extensivamente utilizada na detecção e quantificação do colesterol e seus óxidos há muito tempo (FIORITI & SIM, 1967, MAI et al., 1978; TSAI & HUDSON, 1981; OHSHIMA et al., 1996; BAGGIO et al., 2002; CHEN et al., 2012).

Na análise de OsC, a CLAE normalmente é equipada com um detector de UV (ultravioleta), ressonância magnética nuclear (*Nuclear magnetic resonance* - NMR) de alta resolução e índice de refração. O uso de detector UV é limitado devido à absorção ruim e inespecífica de alguns OsC como os isômeros 5,6 α e β epóxidos e triol que possuem duplas ligações livres (RAZZAZI-FAZELI et al., 2000). Contudo, alguns autores consideram a CLAE como a técnica de eleição, uma vez que não há necessidade de derivação da amostra e as análises são realizadas a temperaturas relativamente baixas (TAI et al., 1999; BAGGIO et al., 2002). A adoção da CLAE acoplada ao espectrômetro de massas (EM) associada ou não à ionização química por pressão atmosférica é um método utilizado por vários pesquisadores para a detecção

de OsC em diferentes alimentos (RAZZAZI-FAZELI et al., 2000; SALDANHA et al., 2006; KEMMO et al., 2007).

Por outro lado, a CG vem sendo utilizada para separação de isômeros geométricos, os quais, em muitos casos não são separados por CLAE. Embora a CG seja considerada de melhor resolução que a CLAE, alguns pesquisadores apontam como desvantagem a necessidade de derivação, um procedimento demorado, mas necessário para evitar distorções dos picos e melhorar a estabilidade térmica dos OsC. Em função da semelhança estrutural e termolabilidade de alguns OsC, a escolha de colunas capilares adequada é condição operacional fundamental para alcançar uma boa resolução ao usar a CG (YEN et al., 2010).

A combinação de CG ou CLAE com a espectrometria de massas (EM) tem sido considerada uma ferramenta eficaz para análise de OsC, incluindo não só a identificação mas também a quantificação (DEREWIAKA & OBIEDZIŃSKI, 2010).

Os espectros de massas derivados de CG-EM auxiliam na elucidação das estruturas químicas de OsC e contribuem ainda mais para sua identificação (YAN et al., 1990). Assim muitos pesquisadores utilizaram a técnica de CG-EM na determinação de OsC em diversos alimentos (PETRÓN et al., 2003; UBHAYASEKERA; VERLEYEN & DUTTA, 2004; ECHARTE et al. 2005; LEE, CHIEN & CHEN, 2008; CHEN et al., 2012).

O propósito do sistema de injeção é introduzir uma micro quantidade de amostra que será transformada em vapor. Dentro da fonte de ionização, a amostra vaporizada irá colidir com íons positivos, convertendo-se em íons moleculares (devido à perda de um elétron) com a mesma massa molecular que a molécula. Os íons formados são atraídos por uma fenda (produzindo aceleração) para dentro do analisador de massa, onde ocorre então a separação de íons (em movimento) de acordo com a razão massa-carga (m/z), onde m é a massa do íon em unidades de massa atômica (u.m.a.) e z é a sua carga. Como a maioria dos íons formados é de carga unitária, m/z é normalmente a massa do íon. As colisões entre elétrons energéticos e moléculas de analito, normalmente, fornecem energia às moléculas para deixá-las em estado excitado. O relaxamento, geralmente, ocorre por fragmentação produzindo íons positivos de massas menores (SPARKMAN et al., 2011).

A análise de esteróis por CG-EM, conforme já mencionado, exige a aplicação da derivação da amostra já que, a presença do grupo hidroxila na posição 3 do núcleo esteroide das moléculas (anel A), confere uma baixa volatilidade aos compostos. A derivação promove a transformação da substância de interesse em um

derivado com características adequadas para ser analisado por cromatografia gasosa. Grupos específicos são introduzidos em posições onde há a presença de grupos fortemente polares, no sentido de aumentar a detecção da substância (SCHUMMER et al., 2009). A sililação é a reação de derivação mais utilizada para a análise de esteróis em CG-EM, sendo o reagente silanizante mais comumente utilizado o N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoro-acetamida/trimetilclorosilano (BSTFA/TMCS 99:1) (Figura 1.11) (CARREIRA et al., 2001; KAWAKAMI et al., 2002; SCHONNING et al., 2002; WU et al., 2009). O BSTFA/TMCS (99:1) reage mais rapidamente, é termodinamicamente mais estável e é menos susceptível à hidrólise que outros reagentes silanizantes, além de causar menos interferências cromatográficas por ser mais volátil (CORDEIRO, 2006).

Na derivação o hidrogênio ativo presente no grupo polar hidroxila dos esteroides é substituído por um grupo trimetilsilil (-Si (CH₃)₃) do reagente silanizante, gerando assim derivados mais voláteis, menos polares, que apresentarão por sua vez uma menor interação com a sílica da coluna cromatográfica devido a eliminação da ligação de hidrogênio (HERNANDES, 2009). A reação de derivação do colesterol está esquematizada na Figura 1.11.

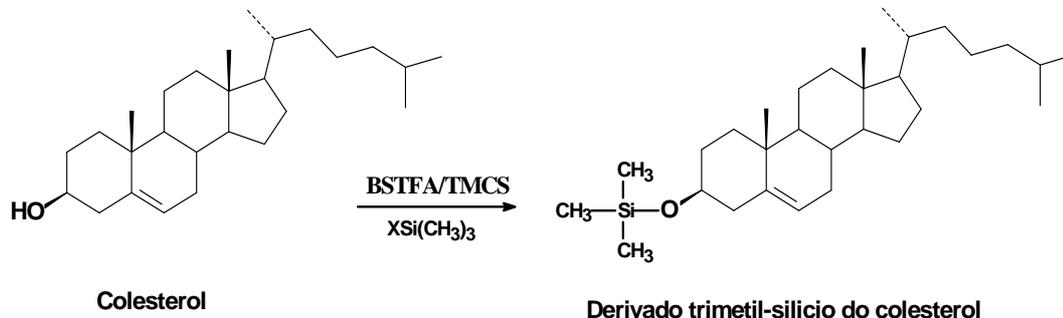


Figura 1.11 Reação de sililação do colesterol.

Fonte: Adaptado de Martins (2001)

Como, de forma geral, os processos de derivação são considerados demorados e onerosos, alguns trabalhos têm aplicado a técnica de derivação denominada *in situ*, *online*, *injection port derivatization* ou *on-column derivatization* que consiste em realizar o procedimento diretamente no cromatógrafo (WU & LEE, 2006, PARDASANI et al., 2007; FERNANDES et al., 2008; WU et al., 2009; XU et al., 2010).

A derivação *on line* foi desenvolvida objetivando simplificar o procedimento de derivação e melhorar a eficiência analítica de compostos orgânicos. Além disso, como é um procedimento que reduz o tempo de derivação, a degradação dos analitos devido à exposição à umidade é muito reduzida ou praticamente eliminada (WU et al., 2009).

CAPÍTULO 1 IMPACTO DOS MÉTODOS DE COCÇÃO NA COMPOSIÇÃO DE FILÉS DE MERLUZA (*Merluccius hubbsi*) E DE PESCADA-BRANCA (*Cynoscion leiarchus*)

RESUMO

Foi determinada a composição centesimal de filés de merluza (*Merluccius hubbsi*) e pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção (assado, grelhado, ensopado, frito). A cocção promoveu redução significativa nos teores de umidade ($p < 0,05$) em ambas as espécies de peixe. Os teores de proteínas, lipídios, carboidratos, cinzas e o valor energético das amostras foram condizentes com a literatura de acordo com a espécie avaliada. Os diferentes métodos de cocção promoveram alterações significativas ($p < 0,05$) para alguns nutrientes. Os filés fritos apresentaram o maior teor lipídico em base seca (28,90 g.100 g⁻¹ de filés de merluza e 25,80 g.100 g⁻¹ de filés de pescada-branca) devido à absorção de óleo do meio de cocção. O teor proteico dos filés não ficou comprometido a partir do tratamento térmico. Os teores de cinzas foram afetados pela cocção principalmente nos filés de merluza, havendo predomínio de redução do conteúdo com menor valor (2,56 g.100 g⁻¹, em base seca) para os filés de merluza no tratamento GFC. Foram determinados também os teores de sódio e potássio verificando-se que todos os tratamentos apresentaram uma relação sódio/potássio inferior a 1,0, fator favorável do ponto de vista nutricional. Verificou-se que não foi possível apontar um único método de cocção como o melhor, contudo, considerando-se o maior teor lipídico, maior valor calórico e menor teor proteico apresentado pelos filés fritos, este seria o método menos recomendado.

Keywords: composição química, tratamento térmico, proteínas, lipídios, sódio, potássio.

ABSTRACT

IMPACT OF COOKING METHODS ON THE COMPOSITION OF ATLANTIC HAKE (*MERLUCCIUS HUBBSI*) AND SMOOTH WEAKFISH (*CYNOSCION LEIARCHUS*) FILLETS. Proximate composition of raw Atlantic hake (*Merluccius hubbsi*) and smooth weakfish (*Cynoscion leiarchus*) fillets and in fillets subjected to different cooking methods (baking, grilling, simmering, frying) were determined. Cooking caused a significant decreased ($p < 0.05$) moisture content in samples from both fishes. The levels of protein, lipid, carbohydrate, ash and energy values in all of the samples were consistent with the literature according to the species studied. Different cooking methods promoted significant changes ($p < 0.05$) for some nutrients. The fried fillets had the highest lipid content on dry basis (28.90 g.100 g⁻¹ of Atlantic hake and 25.80 g.100 g⁻¹ of smooth weakfish fillets) related to oil absorption during the cooking process. The heat treatment did not influence the protein content. Ash level decreased especially in fillets of Atlantic hake (2.56 g.100 g⁻¹ dry basis) for in the treatment GCO. Sodium/potassium ratio was less than 1.0 for all treatments, it is positive factor from the point of view of nutrition. It is not possible appoint to a single method of cooking as the best, however, considering the highest lipid content, highest energy value and lowest protein content by fried fillets, this would be the least recommended method.

Keywords: chemical composition, heat treatment, proteins, lipids, sodium, potassium.

1 INTRODUÇÃO

A importância dos peixes como fonte alimentar tem reconhecimento mundial e sua utilização aumenta a cada ano. O consumo mundial de peixes passou de 114,3 milhões de toneladas em 2006 para 130,8 milhões de toneladas em 2011, correspondendo a 18,8 kg *per capita*/ano (FAO, 2012). No Brasil o consumo também aumenta a cada ano, contudo o consumo *per capita* de 9 kg/ano registrado em 2008/2009 (IBGE, 2010) ainda está aquém do preconizado pela Organização Mundial de Saúde que é de 12 kg/habitante/ano (BRASIL, 2010). Essa recomendação deve-se principalmente ao fato dos peixes fornecerem proteínas de alto valor biológico e

constituírem-se em uma das principais fontes dietéticas de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente de eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) pertencentes à série ômega 3. Estes ácidos são benéficos ao organismo humano especialmente na redução de mortalidade coronariana e menor risco de doença arterial coronariana (CATERINA, 2011).

Durante muito tempo, no Brasil, os dados de composição química de alimentos foram obtidos de tabelas que tinham como base, análises realizadas em outros países e, portanto, nem sempre totalmente adequados à realidade brasileira (MARCHINI et al., 1993). Bragagnolo & Rodriguez-Amaya (2001) enfatizam que cada país deve ter seu próprio banco de dados em relação à composição de alimentos, principalmente no que se refere aos compostos que influenciam de forma positiva ou negativa a saúde humana. Na década de 90 começaram a surgir as tabelas que traziam as análises de alimentos realmente brasileiras que, embora tenham contribuído muito para ampliação desta área da ciência de alimentos, ainda não conseguiram esgotar o assunto especialmente no que se refere aos diferentes tratamentos térmicos a que os alimentos podem ser submetidos (MARCHINI et al., 1993; LAJOLO & MENEZES, 1997; YANOMINE et al., 2005; SCHERR & RIBEIRO, 2011).

A composição química de peixes é bastante variável de acordo com a espécie, estação do ano, maturidade, sexo, idade, *habitat*, alimentação, estágio de desenvolvimento ou maturação (OGAWA, 1999; ORDÓÑEZ et al., 2002; ZOTOS & VOUZANIDOU, 2012). Além disto, os diferentes métodos de cocção utilizados no preparo dos peixes proporcionam modificações que alteram os conteúdos de seus nutrientes. O calor empregado na cocção, por si só, produz diversas modificações no produto *in natura*, incluindo alterações nos teores de umidade, de lipídios, proteínas, vitaminas e minerais (PUWASTIEN et al., 1999; BASSEY et al., 2014). Assim, faz-se necessário ampliar os estudos referentes à composição química das espécies de peixes usualmente consumidas no Brasil englobando todas as suas formas de preparo.

As unidades de alimentação e nutrição (UAN) são referências de consumo de alimentos em geral, tanto qualitativa quanto quantitativamente, já que representam os locais com grande número de refeições (estabelecimentos comerciais, restaurantes de indústrias, de escolas, de hospitais, dentre outros). A estimativa de utilização destes serviços para 2013 foi de 24 milhões/dia para empregados de empresas, e de 17 milhões nas escolas, hospitais e Forças Armadas (ABERC, 2013). Normalmente os peixes são incluídos nos cardápios de UAN em Minas Gerais cerca de 2 vezes ao mês,

sendo servidos na forma frita, cozida, assada e grelhada (AMARAL et al., 2009). Portanto, este estudo objetivou conhecer os teores de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, valor calórico, sódio e potássio das duas espécies de peixes mais consumidas nas UAN, em suas diferentes formas de preparo, buscando subsidiar na ampliação dos dados pertinentes à composição química de peixes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.4 AMOSTRAS

Filés de merluza (*Merluccius hubbsi*) e de pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) foram cedidos pelo Restaurante Universitário da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais. Amostras (30 kg) de cada espécie foram adquiridas congeladas de uma distribuidora de pescados congelados (Belo Horizonte, Brasil). Os filés foram mantidos à temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, em congelador Termisa[®] modelo BD 400 (Maracanaú, Brasil), até o momento de seu processamento, que ocorreu num período máximo de 30 dias após a aquisição e prazo inferior aos 180 dias de validade do produto.

2.5 COCÇÃO DAS AMOSTRAS

Os filés limpos e sem pele, apresentando aproximadamente 15 cm de comprimento, 6 cm de largura e 2 cm de espessura, foram previamente descongelados sob refrigeração ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Em seguida, amostras de cerca de 500 g do filé (cerca de 3 a 4 filés) de cada espécie de peixe, foram submetidas a oito diferentes métodos de cocção. Os métodos de cocção estudados foram: fritura (FRI), assado em forno elétrico (AFE), assado em forno combinado (AFC), grelhado em chapa elétrica (GRE), grelhado em forno combinado (GFC), ensopado em fogão (ENF), ensopado em forno combinado (EFC) e cocção em forno micro-ondas (MIC) (Figura 1.1). As condições de tempo e temperatura empregadas no processamento foram as normalmente adotadas pela unidade de alimentação. Ao final de cada processamento, todas as amostras tiveram a temperatura final medida utilizando-se termômetro digital portátil *Equitherm*[®] (Gravataí, Brasil). Após o preparo, cada amostra foi triturada e homogeneizada em

multiprocessador *Hamilton Beach Brands*[®] (Glen Allen, EUA), embalada a vácuo em plástico de poliamida e polietileno, sendo mantida congelada a -18 °C, até o momento das análises. As amostras foram descongeladas a 4 ± 1 °C. As amostras submetidas à cocção e *in natura* (CRU) foram preparadas em triplicatas e cada preparação foi analisada em três repetições (n = 9).

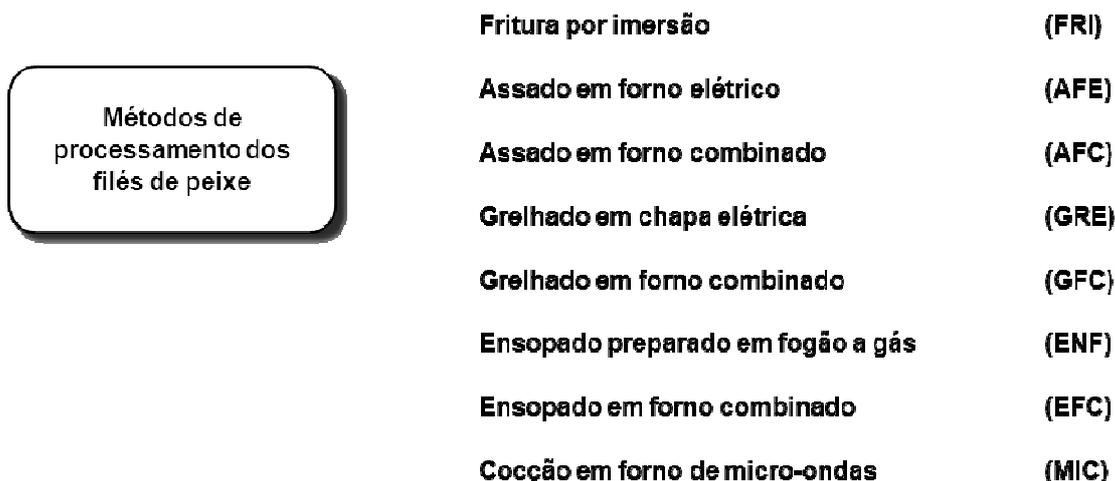


Figura 1.1 Métodos de preparo de filés de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*).

Fritadeira. No método de fritura por imersão foi utilizada fritadeira semi-industrial, de aço inox, Tedesco[®] (Caxias do Sul, Brasil), com capacidade máxima de 3,5 L de óleo em cada cesto. O termostato foi ajustado para manter a temperatura a 180 °C. Cada amostra foi submetida à fritura por três minutos sendo o óleo de soja totalmente substituído a cada amostragem de 500 g. As temperaturas finais médias para os filés de merluza foram de 89 °C e de 91 °C para os filés de pescada-branca.

Forno elétrico convencional. Foi utilizado um forno semi-industrial, sem ventilação forçada, ITC Eletro[®] (Guaramirim, Brasil), com temperatura mantida a 200 °C por 30 minutos. As amostras foram assadas em refratários de vidro, com período de 15 minutos para cada lado do filé. Os filés de merluza alcançaram temperatura final média de 89 °C e os filés de pescada-branca de 91 °C.

Chapa Elétrica. As amostras de filé grelhadas foram preparadas em equipamento *Multi-Grill Express Baby*[®] (Londrina, Brasil). A chapa foi pré-aquecida a 180 °C por 10 minutos e a amostra foi grelhada durante 4 minutos. As temperaturas

finais médias para os filés de merluza foram de 80 °C e para os filés de pescada-branca foram de 77 °C.

Forno combinado. Forno Combinado EC3 *Gourmet Prática Technicook*[®] (Pouso Alegre, Brasil) foi utilizado no preparo de filés, por meio de três diferentes métodos: assar, grelhar e ensopar. Para obtenção do peixe assado, os filés foram processados a temperatura de 180 °C por 25 minutos em vapor médio, alcançando temperatura média final de 84 °C para os filés de merluza e de 82 °C para os filés de pescada-branca. No preparo dos ensopados, os filés foram submetidos à cocção em vapor médio à temperatura de 150 °C por 30 minutos. A temperatura média final foi de 77 °C para os filés de merluza e de 74 °C para os filés de pescada-branca. As amostras foram grelhadas a 220 °C por 8 minutos e alcançaram temperatura média final de 87 °C para os filés de merluza e de 84 °C para os filés de pescada-branca

Fogão a gás. Na obtenção de filés ensopados foi utilizado fogão Continental 2001 *Maxim's Giromagic*[®] (São Paulo, Brasil). A amostra de cada tipo de filé foi colocada em utensílio de aço inox *Rochedo*[®] nº 22. De acordo com a necessidade, foram adicionados 100 mL de água para auxiliar no processo de cocção, que teve duração de 18 minutos. Os filés de merluza ensopados alcançaram temperatura média final de 92 °C e os filés de pescada-branca alcançaram 90 °C.

Micro-ondas. Foi utilizado forno micro-ondas *Maxi Gratine* inox *Brastemp*[®] (São Paulo, Brasil). Cada amostra de filé foi colocada num refratário de vidro e processada por 15 minutos, em potência máxima (820 W) e frequência de 60 Hz. As temperaturas finais médias para os filés de merluza foram de 82 °C e de 81 °C para os filés de pescada-branca.

2.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

2.6.1 UMIDADE

A umidade foi determinada por método gravimétrico, utilizando estufa Biomatic[®] (Porto Alegre, Brasil), baseado na remoção da água, por aquecimento à temperatura de 105 ± 5 °C, até peso constante, durante cerca de 20 h. Foram pesados cerca de 5 g ± de amostra em placas de Petri, previamente secas (105 °C/2 h) e com massa previamente determinada. Após secagem em estufa, as amostras foram transferidas para um dessecador e resfriadas até atingirem temperatura ambiente

(aproximadamente 25 °C) e, em seguida, sua massa foi determinada. Este procedimento foi repetido até a obtenção de massa constante. O cálculo do teor de umidade (%) foi realizado de acordo com a fórmula abaixo (AOAC, 2012).

$$\text{Cálculo: } \frac{100 \times N}{P}, \text{ sendo:}$$

N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g)

P = n° de gramas da amostra

2.3.2 CINZAS

As cinzas foram determinadas utilizando o método de resíduo por incineração em Mufla [Fornitec[®] (São Paulo, Brasil)] a 550 °C. As amostras foram pesadas (cerca de 5 ± 0,5 g) em cadinhos de porcelana, previamente submetidos a temperatura de 550 °C/2 h, resfriados e tarados. As amostras foram mantidas em mufla na seguinte ordem: mufla a 100 °C/30 min; 150 °C/30 min; 200 °C/30 min. Após a destruição da matéria orgânica, a mufla foi ajustada para 550 °C e as amostras mantidas nesta temperatura até a obtenção de cinzas claras. Em seguida foram transferidas para um dessecador, resfriadas até a temperatura ambiente e pesadas. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até peso constante. O cálculo do teor de cinzas (%) foi realizado conforme fórmula abaixo (AOAC, 2012).

$$\text{Cálculo: } \frac{100 \times N}{P}, \text{ sendo:}$$

N = n° de gramas de cinzas

P = n° de gramas da amostra

2.3.3 DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO

A determinação do teor de sódio e potássio foi realizada por fotometria de chama em fotômetro Analyser[®] 910M (São Paulo, Brasil), de acordo com metodologia preconizada pela AOAC (2012). Os cadinhos contendo as cinzas, obtidas anteriormente, foram lavados com 2,5 mL de HNO₃ concentrado e três vezes consecutivas com água ultra pura obtida pelo sistema MilliQ[®]. A seguir, a solução foi

quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume completado com água ultra pura. O fotômetro de chama foi previamente calibrado com os padrões de sódio e de potássio, e, em seguida efetuou-se as leituras das amostras.

2.3.4 PROTEÍNAS

A determinação de proteínas foi realizada de acordo com o método de *Kjeldahl* modificado. Foram pesados $0,25 \pm 0,01$ g da amostra em papel de seda e transferidos para o tubo de digestão (papel + amostra). Adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico e 2,5 g de mistura catalítica (dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6). As amostras foram levadas à capela e aquecidas em chapa elétrica (50 °C/1 h; 100 °C/1 h; 150 °C até se alcançar uma aparência líquida; 200 °C/1 h; e 250 °C até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido, pontos pretos). As amostras foram aquecidas por mais uma hora e resfriadas à temperatura ambiente.

A solução da cada amostra foi transferida para um frasco destilador de *Erlenmeyer*, adicionou-se 50 mL de ácido bórico (H_3BO_3) a 4 % contendo 3 gotas de indicador de Tashiro. O frasco foi acoplado a um destilador de nitrogênio [Tecnal[®] (Piracicaba, Brasil)] e a seguir, adicionou-se lentamente (gota a gota) solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 50 %, até a obtenção de coloração amarronzada. O vapor do destilador foi ligado e assim mantido, até a obtenção do dobro do volume inicial (100 mL). Em seguida, procedeu-se à titulação com ácido clorídrico (HCl 0,1 mol/L) padronizado. O cálculo do teor de proteínas (%) foi realizado conforme fórmula abaixo (AOAC, 2012).

Cálculo: $\frac{V \times 0,14 \times f}{P}$, sendo:

V = volume de ácido clorídrico (0,1 mol/L) gastos na titulação

P = n^o de g da amostra

f = fator de conversão (6,25)

2.3.5 LIPÍDIOS TOTAIS

A extração lipídica foi realizada de acordo com Folch et al. (1957). As amostras previamente descongeladas foram pesadas obtendo-se uma alíquota de $10 \pm 0,5$ g, que foi homogeneizada com auxílio de almofariz e pistilo. Adicionou-se 200 mL de solução de clorofórmio-metanol (2:1 v/v) à amostra seguindo-se de nova homogeneização por 3 minutos em *mixer*. O material resultante foi cuidadosamente filtrado em papel de filtro qualitativo (INLAB®, tipo 50, de 9 cm) e transferido para um funil de separação de 500 mL. O resíduo retido no papel de filtro foi retirado e novamente submetido à extração com 100 mL de clorofórmio-metanol (2:1), homogeneizado por mais 3 minutos em *mixer* e, novamente filtrado para o funil de separação. O resíduo restante no almofariz e em *mixer* foi lavado com 30 mL de clorofórmio-metanol (2:1) e transferido diretamente para o funil de separação. Foram adicionados ao funil de separação, 66 mL de cloreto de potássio a 0,74 % (7,4 g de KCl em 1000 mL de água destilada). O funil foi tampado e agitado por cerca de 1 minuto. Após 3 minutos de repouso para que ocorresse a separação das fases, a fase inferior, clorofórmica, foi transferida para um balão de fundo redondo de 250 mL (previamente seco a 105 °C durante 12 horas e tarado), contendo 5 g de sulfato de sódio anidro. Lavou-se o funil de separação e o papel de filtro com 30 mL de clorofórmio-metanol (2:1) que foram filtrados para o balão. O clorofórmio foi recuperado em evaporador rotatório, mantido a temperatura de no máximo 55 °C. O balão contendo o óleo foi resfriado em dessecador à temperatura ambiente e pesado. Após pesagem do balão, o resíduo foi ressuspenso com 10 mL de clorofórmio e transferido para tubo de Falcon sendo posteriormente evaporado sob fluxo de nitrogênio.

2.3.6 CARBOIDRATOS

O percentual de carboidratos nas amostras foi obtido por diferença (BRASIL, 2001).

$\% \text{ CHO} = 100 - (\% \text{ água} + \% \text{ PT} + \% \text{ LT} + \% \text{ CZ})$, sendo:

CHO= carboidratos

PT= proteínas

LT= lipídios totais

CZ= cinzas

2.3.7 VALOR ENERGÉTICO (VE)

Utilizando-se os fatores de conversão de Atwater de 4,0 kcal/g para proteína e carboidrato e de 9,0 kcal/g para gordura, empregou-se a expressão abaixo para o cálculo do valor energético (VE) (FAO, 2002).

$$\text{VE (kcal.100 g}^{-1}\text{)} = [(\% \text{ LT} \times 9 \text{ kcal.g}^{-1}) + (\% \text{ PT} \times 4 \text{ kcal.g}^{-1}) + \% \text{ CHO} \times 4 \text{ kcal.g}^{-1}], \text{ sendo:}$$

LT= lipídios totais

PT= proteína

CHO= carboidrato

2.3.8 CONVERSÃO DOS RESULTADOS EM BASE ÚMIDA PARA A BASE SECA

A partir dos resultados dos teores de umidade (% em base úmida) foram convertidos para a umidade (% em base seca) conforme fórmula abaixo (SILVA & RUFATO, 2000):

$$U' = [U/(100 - U)] \times 100, \text{ sendo:}$$

U' = % em base seca

U = % em base úmida

Posteriormente os resultados de cada nutriente (% NUT) que foram determinados inicialmente em base úmida foram convertidos para a base seca, utilizando-se regra de três simples:

$$\begin{array}{l} \% \text{ NUT} \quad \text{—} \quad U \\ X \quad \text{—} \quad U' \end{array}$$

% NUT = teor do nutriente de interesse obtido em base úmida

U' = % em base seca

U = % em base úmida

X = teor do nutriente de interesse obtido em base seca

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados por meio de análise de variância aplicada a esquema fatorial 2 x 9 (peixe x método de cocção). As diferenças entre os valores de acordo com o tipo de peixe e os métodos de cocção foram consideradas significativas utilizando o teste de Tukey para $\alpha = 0,05$ (MONTGOMERY, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TEOR DE UMIDADE

Os teores de umidade dos filés estão representados na Tabela. 1.1. Entre as duas espécies de peixe ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) predominando maior teor de umidade no filé de merluza CRU.

Tabela 1.1 Teor médio de umidade ($\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) determinado em filés de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*) crus e preparados por diferentes métodos de cocção

| Método de cocção | Teor de umidade ($\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) | |
|------------------|--|-----------------------------------|
| | Merluza | Pescada-branca |
| CRU | 81,16 ^{a,A} \pm 1,17 | 78,25 ^{a,B} \pm 0,39 |
| AFE | 75,24 ^{b,c,A} \pm 1,35 | 72,08 ^{b,c,B} \pm 0,01 |
| AFC | 67,25 ^{e,A} \pm 0,52 | 69,70 ^{c,A} \pm 1,98 |
| GFC | 70,42 ^{d,e,A} \pm 4,25 | 69,69 ^{c,A} \pm 0,96 |
| GRE | 71,97 ^{c,d,A} \pm 0,58 | 74,41 ^{a,b,A} \pm 0,51 |
| MIC | 67,43 ^{e,A} \pm 0,44 | 72,41 ^{b,c,B} \pm 1,41 |
| ENF | 78,40 ^{a,b,A} \pm 1,07 | 76,93 ^{a,A} \pm 1,55 |
| EFC | 72,72 ^{c,d,A} \pm 0,71 | 70,33 ^{b,c,A} \pm 3,20 |
| FRI | 60,15 ^{f,A} \pm 1,52 | 59,51 ^{d,B} \pm 0,82 |

CRU (peixe cru); AFE: assado em forno elétrico; AFC: assado em forno combinado; GFC: grelhado em forno combinado; GRE: grelhado em grill; MIC: aquecido em micro-ondas; ENF: ensopado em fogão; EFC: ensopado em forno combinado; FRI: frito em fritadeira. Média \pm desvio padrão ($n = 9$) indicada por uma mesma letra minúscula em uma mesma coluna e mesma letra maiúscula entre as colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os teores de umidade dos filés crus em ambas as espécies foram semelhantes aos que estão citados na Tabela Brasileira de Composição Química de

Alimentos (TACO) cuja umidade é de $82,10 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e $79,6 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ para os filés de merluza e pescada-branca crus, respectivamente (TACO, 2011). Saldanha & Bragagnolo (2007) também relataram valores de $78,6 \pm 1,9$ a $83,8 \pm 0,3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ nas amostras cruas de filé de merluza durante estocagem de 120 dias. Em relação aos filés de pescada-branca o teor de umidade ao longo de 120 dias de estocagem variou de $80,0 \pm 0,2$ a $77,1 \pm 2,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ nas amostras cruas (LIMA, 2010), portanto valores também semelhantes ao encontrado no presente trabalho.

A cocção promoveu uma redução no teor de umidade em todas as amostras, o que já era esperado devido à perda de água causada pelo tratamento térmico. O teor de umidade dos filés nos diferentes processos de cocção variou de $60 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a $78 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (merluza) e de $59 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a $76 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (pescada-branca). Resultados semelhantes foram publicados a partir de estudos, também realizados com pescados processados termicamente (AL-SHAGIR et al., 2004; WEBER et al., 2008; ERKAN et al., 2010; SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2010).

Os resultados do tratamento ENF não diferiram ($p > 0,05$) dos encontrados para CRU, nos dois tipos de peixe; o que é justificado pelo fato desse tratamento ter sido o único que envolveu a adição de água durante seu preparo. Fato semelhante ocorreu no trabalho de Marimuthu (2012), em que o teor de umidade dos filés de peixes crus diminuiu em todos os métodos de cocção avaliados (cozido, frito, assado e grelhado), exceto para os filés cozidos em água (temperatura da água $99 \text{ }^\circ\text{C}$ a $101 \text{ }^\circ\text{C}$, por 12 min). Weber et al. (2008) também relataram um decréscimo no teor de umidade após a cocção, exceto para os filés de peixes cozidos em água ($98 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 min).

Os menores teores de umidade encontrados para ambas as espécies, foram para o tratamento FRI, que diferiu significativamente dos demais (Tabela 1.1). Estes resultados são condizentes aos estabelecidos na TACO (2011) que são de $63,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ para o filé de merluza frito e $57 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ para o filé de pescada-branca frito. Os resultados também são condizentes com os apresentados por Gall et al. (1983), que avaliaram, utilizando filés de peixes marinhos, os métodos assado em forno convencional, grelhado, assado em micro-ondas e frito em óleo e constataram menores teores de umidade em filés fritos em óleo. A fritura é um processo no qual ocorre transferência simultânea de calor e de massa. O calor é transferido do óleo para o alimento, resultando na evaporação de água e, em paralelo, ocorre absorção de óleo pelo alimento (KROKIDA et al., 2000).

Um menor teor de umidade foi encontrado também em trutas arco-íris fritas, havendo diferenças significativas quando comparado com os outros métodos utilizados (cru, cozido, assado, grelhado), exceto para o de micro-ondas (GOKOGLU et al., 2004).

3.2 TEOR MÉDIO DOS NUTRIENTES NOS FILÉS CRUS

Em relação aos nutrientes, verificou-se que nos filés crus de merluza e de pescada-branca, os teores encontrados foram semelhantes aos que constam na TACO (2011), havendo maior diferença absoluta para o teor de lipídios no filé de pescada-branca (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 Teor médio de nutrientes determinado em filés de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*) crus em base úmida

| Parâmetro analisado | Presente estudo | | TACO (2011) | |
|--|-----------------|----------------|-------------|----------------|
| | Merluza | Pescada-branca | Merluza | Pescada-branca |
| Nutrientes | | | | |
| Proteína (g.100 g ⁻¹) | 15,86 | 18,03 | 16,6 | 16,30 |
| Lipídios (g.100 g ⁻¹) | 1,99 | 2,92 | 2,00 | 4,60 |
| Carboidratos (g.100 g ⁻¹) | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| Cinzas (g.100 g ⁻¹) | 0,98 | 0,79 | 1,10 | 0,90 |
| Valor calórico (kcal.g ⁻¹) | 81,35 | 98,44 | 89,00 | 111,00 |

As diferenças nos teores de lipídios encontrados nos filés de pescada-branca em relação à TACO (2011) correlacionam-se com o fato de que a composição lipídica varia tanto para indivíduos de espécies diferentes, quanto para aqueles de uma mesma espécie, em função do peso do animal, sexo, estado fisiológico, idade, tipo de músculo, época do ano (como em peixes migratórios), *habitat*, dieta alimentar e outros (ACKMAN, 1989; KÜÇÜKGÜLMEZ et al., 2007; KHITOUNI et al., 2010; ZOTOS & VOUZANIDOU, 2012).

Larsen et al. (2010) relataram que, além da dieta, estação do ano ou fatores genéticos que justificariam as diferenças encontradas no conteúdo de lipídios de

peixes, o método de extração também contribui para a variabilidade dos dados de constituição de nutrientes. No peixe cru, os lipídios estão ligados aos tecidos, o que dificulta a sua extração. Portanto, fatores mecânicos alteram o processo de extração lipídica gerando teores a mais ou a menos do que o esperado. Isto também explica as diferenças nos teores de lípidos encontrados no presente trabalho em relação aos que estão tabelados na TACO (2011).

Existem várias classificações para os peixes em função do teor de lipídios presentes em seu tecido muscular. Ackman (1989) e Kołakowska et al. (2003) classificaram peixes em quatro grupos: magro (< 2 %), de baixo teor de gordura (2-4 %), com médio teor de gordura (4-8 %) e portadores de alto teor de gordura (> 8 %). Com base nessa classificação, as espécies merluza e pescada-branca são classificadas como pertencentes à categoria de peixes com baixo teor de gordura.

Em relação ao teor de proteínas de pescados a variação média é de 16 a 21 %, com um teor máximo de 28 % (HUSS, 1995). Neste contexto, o teor de proteínas encontrado no filé CRU de pescada-branca foi condizente com a literatura. O teor proteico do filé de merluza CRU correlacionou-se com os que foram relatados por Zotos & Vouzanidou (2012). Estes autores estudaram a influência sazonal sobre seis espécies de peixes comerciais da Grécia e encontraram valores proteicos em pescada (*Merluccius merluccius*), peixe do mesmo gênero da merluza, variando de $14,17 \pm 0,19$ % (mês de abril) a $20,06 \pm 0,20$ % (mês de setembro). O menor teor de proteínas nos peixes está também associado à época de desova. De acordo com Eder e Lewis (2005) além da desova ser um período fisiológico de alta demanda energética, durante este processo os peixes não se alimentam, havendo um esgotamento dos lipídios, sendo que algumas espécies também passam a utilizar proteínas para suprir a carência energética.

Os teores de cinzas do filé de merluza foram semelhantes aos existentes na TACO (2011), havendo uma diferença maior para o resultado do filé de pescada-branca cujo teor foi inferior. As diferenças nos teores de minerais, representados pelas cinzas totais, encontrados na parte comestível dos peixes, são atribuídas não só a fatores intrínsecos, como também a fatores extrínsecos, incluindo temperatura e salinidade da água (FARKAS et al., 2003; FABRIS et al., 2006).

McMeans et al. (2007) relataram que as concentrações de minerais essenciais são reguladas pelo próprio peixe, para satisfazer as suas necessidades fisiológicas. Assim, as variações existentes resultam de diferentes necessidades dos

elementos essenciais para o bom funcionamento dos diferentes processos fisiológicos. No entanto, as informações disponíveis sobre essa regulação nos peixes marinhos, ainda é insuficiente.

Huss (1995) relata que normalmente as concentrações de carboidratos no músculo de peixes são muito baixas ($< 0,5\%$), motivo pelo qual é um parâmetro que geralmente não é quantificado. Este fato também foi observado no presente estudo, onde carboidratos foram quantificados por diferença dos teores dos demais nutrientes (umidade, proteínas, lipídios e cinzas). Os teores encontrados para merluza e pescada-branca foram equivalentes aos da TACO (2011), ou seja, os valores de carboidratos nos filés crus em ambas as espécies foram baixos.

3.3 TEORES DOS NUTRIENTES NOS FILÉS SUBMETIDOS AOS MÉTODOS DE COCÇÃO

Devido ao fato de que o teor de umidade reduz após a cocção e, conseqüentemente, tem influência direta nas concentrações dos nutrientes, levando a um aumento dos seus teores, os resultados para os tratamentos térmicos foram analisados tanto em base úmida quanto em base seca.

3.3.1 LIPÍDIOS

Os resultados dos teores de lipídios nos diferentes métodos de cocção estão compilados na Tabela 1.3. Em base úmida, para as duas espécies de peixe, o tratamento FRI foi o que resultou no maior teor lipídico diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos cujos dados foram expressos em base úmida. Weber et al. (2008) ao avaliarem a influência de diferentes métodos de cocção na composição de filés de peixes jundiá, relataram um conteúdo significativamente ($p < 0,05$) mais alto de lipídios somente em filés fritos, não encontrando diferenças entre o cru e os métodos cozido, assado, assado em micro-ondas e grelhado. Da mesma forma, Marimuthu et al. (2012) não observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nos teores de lipídios das amostras de peixe (*Channa striatus*) cru, cozido, assado e grelhado, havendo diferença somente para as amostras fritas. Em outros trabalhos com peixes foram

encontrados resultados semelhantes, como os publicados por Erkan et al. (2010) e Koubaa et al. (2012).

Tabela 1.3 Teor médio de lipídios ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) determinados em filés de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção

| Amostras | LIPÍDIOS ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) | | | |
|------------|--|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | Merluza | | Pescada-branca | |
| | Base úmida | Base seca | Base úmida | Base seca |
| CRU | 1,99 ^{cdA} ± 0,12 | 10,57 ^{bcA} ± 0,36 | 2,92 ^{bb} ± 0,18 | 13,45 ^{bb} ± 0,90 |
| AFE | 1,79 ^{dA} ± 0,08 | 7,26 ^{deA} ± 0,70 | 2,90 ^{bb} ± 0,07 | 10,40 ^{dB} ± 0,25 |
| AFC | 2,41 ^{cA} ± 0,07 | 7,35 ^{deA} ± 0,11 | 3,15 ^{bb} ± 0,16 | 10,40 ^{dB} ± 0,29 |
| GFC | 1,80 ^{dA} ± 0,12 | 6,14 ^{eA} ± 0,52 | 3,28 ^{bb} ± 0,08 | 10,82 ^{dB} ± 0,60 |
| GRE | 2,29 ^{cA} ± 0,18 | 8,15 ^{dA} ± 0,49 | 2,76 ^{bb} ± 0,13 | 10,78 ^{dB} ± 0,33 |
| MIC | 1,87 ^{dA} ± 0,12 | 5,74 ^{eA} ± 0,39 | 3,00 ^{bb} ± 0,05 | 10,89 ^{cdB} ± 0,60 |
| EFC | 2,42 ^{cA} ± 0,23 | 8,88 ^{cdA} ± 0,79 | 2,87 ^{bb} ± 0,18 | 9,70 ^{cdA} ± 0,44 |
| ENF | 2,47 ^{ba} ± 0,08 | 11,46 ^{ba} ± 0,61 | 2,91 ^{bb} ± 0,07 | 12,64 ^{bcB} ± 0,80 |
| FRI | 11,51 ^{aA} ± 0,39 | 28,90 ^{aA} ± 1,39 | 10,45 ^{ab} ± ,54 | 25,80 ^{ab} ± 1,04 |

CRU (peixe cru); AFE: assado em forno elétrico; AFC: assado em forno combinado; GFC: grelhado em forno combinado; GRE: grelhado em grill; MIC: aquecido em micro-ondas; ENF: ensopado em fogão; EFC: ensopado em forno combinado; FRI: frito em fritadeira. Média ± desvio padrão (n = 9) indicada por uma mesma letra minúscula em uma mesma coluna e mesma letra maiúscula entre as colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Saguy & Dana (2003) relataram que o aumento do teor de lipídios nos peixes fritos ocorre em função da penetração do óleo no alimento após a evaporação parcial da água durante o processo de fritura. Tal justificativa é condizente com os resultados encontrados no presente trabalho, já que, na avaliação das amostras em base seca, novamente o método FRI foi o que apresentou o maior teor de lipídios, tanto para o filé de merluza quanto para o filé de pescada-branca. A comparação do método FRI entre as espécies permitiu verificar diferenças significativas nos percentuais de lipídios sendo maior para o filé de merluza. Para este filé foi encontrado um menor teor lipídico inicial em comparação ao de pescada-branca, que contribuiu para uma maior absorção do óleo de cocção. Gall et al. (1983) e Garcia-Arias et al. (2003) relataram que filés de peixe que apresentam maior conteúdo lipídico inicial tendem a absorver menor quantidade de gordura do meio de cocção.

Verificou-se também que, para o filé de merluza, tanto em base úmida quanto na base seca, os métodos de cocção exerceram maior influência nos teores de lipídios havendo diferenças significativas entre alguns tratamentos, contrariamente ao que ocorreu com o filé de pescada-branca. Este resultado foi surpreendente, pois se esperava que o mesmo método empregado no preparo dos filés das duas espécies exercesse uma mesma influência, em função dos parâmetros tempo e temperatura empregados serem semelhantes. Assim sendo, os fatores inerentes às características das espécies estudadas, como as diferenças de composição química, interferiram mais no resultado pós-cocção do que o tratamento térmico em si. Entre as duas espécies de peixe foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos verificando-se maiores teores de lipídios para o filé de pescada-branca. Tal resultado é coerente já que o conteúdo de lipídios do filé de pescada-branca CRU foi superior ao do filé de merluza. Portanto, a perda foi proporcional, sendo que o teor de lipídios foi maior nos filés de pescada-branca.

Os menores teores de lipídios no filé de merluza, tanto em base úmida quanto em base seca foram observados nos tratamentos MIC, GFC, AFC, AFE e que não diferiram entre si. Tal resultado foi atribuído à variação de temperatura (180 °C a 220 °C) e do tempo de exposição (8 a 30 min) utilizados nestes tratamentos, gerando perdas de lipídios. De acordo com Sargent (1997) devido ao fato dos peixes não possuírem nenhum tecido adiposo, o excesso de gordura é armazenado no músculo periférico, na forma de triacilgliceróis. Este fato favorece a perda de gordura quando, na cocção são aplicadas altas temperaturas. Durante o cozimento a perda de gordura ocorre devido ao gotejamento, embora a quantidade perdida dependa da temperatura e do tempo gastos no processo (SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2008). Shozen et al. (1995) relataram que a redução do teor de lipídios durante a cocção deve-se à perda de gorduras e óleos de superfície, induzida pelo calor empregado e também por decomposição oxidativa de ácidos graxos presentes nos tecidos, causada pelo cozimento.

Os teores de lipídios, na base seca, encontrados para o filé de merluza variaram de $10,57 \pm 0,36$ % no CRU a $5,74 \pm 0,39$ % no MIC. Saldanha & Bragagnolo (2008) encontraram valores semelhantes em filés de merluza crus armazenados a -18 °C, com teores variando de $8,4 \pm 0,4$ % (0 dia) a $10,4 \pm 0,2$ % (120 dias de estocagem). Nos filé grelhados (175 °C/2 min de cada lado) os teores de lipídios variaram de $7,7 \pm 0,3$ % (0 dia) a $11,0 \pm 0,8$ % (120 dias de estocagem) que são

comparáveis aos encontrados nos filés preparados utilizando o método GRE ($8,15 \pm 0,49$ %) do presente trabalho, embora a temperatura e tempo utilizados tenham sido diferentes (180 °C/4 min de cada lado).

Em relação à pescada-branca, os teores de lipídios totais encontrados para o filé cru ($13,45 \pm 0,90$ %) também foram semelhantes aos encontrados por Sancho (2011), que foi de $16,1 \pm 0,7$ g.100 g⁻¹ na base seca. Da mesma forma que no presente estudo, no trabalho de Sancho (2011) as amostras controle cruas comparadas às amostras controle cozidas (95 ± 1 °C por 30 min) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em seus teores de lipídios totais.

3.3.2 PROTEÍNAS

Os teores de proteínas, expressos em base úmida e em base seca estão demonstrados na Tabela 1.4. Em ambas as espécies de peixe analisadas, nos diferentes tratamentos, os teores de proteínas, em base úmida foram significativamente superiores ao do CRU, com exceção do ENF. Entre os tratamentos também foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$), sendo que para o filé de merluza o maior teor foi do MIC e para o filé de pescada-branca o maior teor de proteínas foi para o tratamento FRI, que diferiu dos demais. Para as duas espécies, o menor valor proteico foi verificado nos filés submetidos aos métodos CRU e ENF, os quais não diferiram entre si. Considerando-se o teor de umidade encontrado, o resultado para os tratamentos CRU e ENF é coerente já que foram os que apresentaram os níveis mais elevados de umidade. Contudo, esperava-se que, para ambas as espécies, os maiores teores proteicos fossem para o FRI e isto só ocorreu para o filé de pescada-branca. Gokoglu et al. (2004) também relataram um maior teor de proteínas em amostras de trutas fritas (180 °C) e cozidas em micro-ondas (2450 MHz por 13 min), relacionando a concentração dos nutrientes com a maior perda de água induzida por estes métodos. Já Marimuthu et al. (2012) descreveram maiores teores proteicos nos filés fritos (180 °C por 15 min) e grelhados (em *grill*, 10 min cada lado, não citaram temperatura) em comparação aos filés de peixes crus e também consideraram que o aumento ocorreu em função da maior perda de umidade provocada pelos métodos de cocção.

Tabela 1.4 Teor médio de proteínas (g.100 g⁻¹) em filés de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção (base úmida e seca)

| Amostras | PROTEÍNAS (g.100 g ⁻¹) | | | |
|------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Merluza | | Pescada-branca | |
| | Base úmida | Base seca | Base úmida | Base seca |
| CRU | 15,86 ^{dA} ± 0,61 | 84,29 ^{aA} ± 2,53 | 18,03 ^{eB} ± 0,65 | 82,88 ^{abA} ± 1,64 |
| AFE | 20,55 ^{cA} ± 0,34 | 83,12 ^{aA} ± 4,25 | 23,98 ^{bcB} ± 1,01 | 85,91 ^{a,A} ± 3,59 |
| AFC | 26,01 ^{bA} ± 1,32 | 79,40 ^{abA} ± 3,77 | 24,00 ^{bcB} ± 1,72 | 79,50 ^{abA} ± 9,04 |
| GFC | 26,45 ^{bA} ± 0,63 | 90,59 ^{aA} ± 12,14 | 25,65 ^{bA} ± 0,16 | 84,69 ^{aA} ± 3,23 |
| GRE | 24,23 ^{bA} ± 1,12 | 86,41 ^{aA} ± 2,27 | 21,44 ^{dB} ± 0,44 | 83,78 ^{abA} ± 0,92 |
| MIC | 28,87 ^{aA} ± 1,04 | 88,61 ^{aA} ± 2,03 | 22,43 ^{cdB} ± 0,37 | 81,39 ^{abA} ± 3,06 |
| ENF | 18,11 ^{dA} ± 0,23 | 84,01 ^{aA} ± 4,71 | 19,04 ^{eA} ± 0,48 | 82,71 ^{abA} ± 4,48 |
| EFC | 21,84 ^{cA} ± 1,71 | 80,20 ^{abA} ± 8,18 | 25,20 ^{bB} ± 0,52 | 85,64 ^{aA} ± 10,00 |
| FRI | 26,52 ^{bA} ± 0,62 | 66,58 ^{b,A} ± 1,39 | 28,36 ^{ab} ± 0,33 | 70,06 ^{bA} ± 1,74 |

CRU (peixe cru); AFE: assado em forno elétrico; AFC: assado em forno combinado; GFC: grelhado em forno combinado; GRE: grelhado em grill; MIC: aquecido em micro-ondas; ENF: ensopado em fogão; EFC: ensopado em forno combinado; FRI: frito em fritadeira. Média ± desvio padrão (n = 9) indicadas por uma mesma letra minúscula em uma mesma coluna e mesma letra maiúscula entre as colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No presente trabalho, quando os resultados foram analisados em base seca os comportamentos foram diferentes em relação aos da base úmida. Os teores de proteínas dos filés de merluza e de pescada-branca, nos diferentes tratamentos, não diferiram do CRU, exceto em relação ao método FRI que apresentou o menor teor em ambas as espécies. Portanto, a concentração de proteínas não ocorreu somente pela perda de umidade. O menor teor de proteínas em peixes fritos tem sido atribuído à diluição causada pela absorção do óleo da fritura pelo alimento (STEINER-ASIEDU et al., 1991; GOKOGLU et al., 2004; KOUBAA et al., 2012), o que é condizente aos resultados do presente estudo. Na comparação entre as duas espécies de peixes não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) relacionadas a um mesmo método, o que sugere que eles exerceram influências similares no teor de proteínas, independentemente da espécie avaliada.

A RDC N°. 54, de 12 de novembro de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012) foi estabelecida com base nas “Diretrizes para o uso de declarações nutricionais e saudáveis” publicadas pelo Codex

Alimentarius/WHO/FAO (CODEX ALIMENTARIUS, 1997). De acordo com esta resolução para que um alimento seja considerado com alto conteúdo de proteína deverá apresentar um mínimo de 12 g de proteínas por 100 g ou 100 mL, em pratos preparados, conforme o caso (BRASIL, 2012). Com base nesta resolução, o tratamento térmico não comprometeu quantitativamente o valor proteico das duas espécies de peixes, portanto as preparações avaliadas são consideradas como alimentos de alto conteúdo de proteínas.

As quantidades de proteínas encontradas para as duas espécies de peixes estudadas, submetidas aos diferentes métodos de cocção, foram condizentes com outros trabalhos com peixes como o de Zotos et al. (2013) que avaliaram anchovas fritas durante 2, 3, 4 e 5 minutos em azeite de oliva e óleo de girassol (200 °C) e sardinhas assadas por 20, 40, 50 e 60 minutos em forno (200 °C) e também ao de Koubaa et al. (2012) que submeteram filés (*Mullus barbatus*) à fritura (5 min a 180 °C), vapor (10 min), micro-ondas (1.000 W por 8 min) e assado (220 °C por 10 min).

A qualidade proteica dos pescados é elevada, por fornecerem todos os aminoácidos essenciais, com um elevado teor de lisina. A lisina é um aminoácido limitante em cereais, tais como o arroz, milho e a farinha de trigo. Além disso, o valor biológico do pescado é próximo de 100, determinado pela alta absorção dos aminoácidos essenciais. A digestibilidade é alta, acima de 95 %, para a maioria das espécies de peixe (OETTERER, 2005). Portanto, os peixes são importantes fontes de proteínas na alimentação.

3.3.3 CINZAS

Em relação aos teores de cinzas (Tabela 1.5), por meio dos resultados encontrados na análise do filé de merluza na base úmida, foi possível demonstrar que os tratamentos influenciaram significativamente ($p < 0,05$) em seu conteúdo, predominando valores menores (ENF, AFE, GRE e GFC) em relação ao CRU. Para os filés submetidos ao tratamento FRI verificou-se um maior teor de cinzas, porém não diferiu significativamente ($p > 0,05$) dos valores encontrados para AFC e EFC.

Tabela 1.5 Teor médio de cinzas ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) em filés de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção

| Amostras | CINZAS ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) | | | |
|------------|--|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Merluza | | Pescada-branca | |
| | Base úmida | Base seca | Base úmida | Base seca |
| CRU | 0,98 ^{ba} ± 0,08 | 5,25 ^{aA} ± 0,71 | 0,79 ^{cb} ± 0,10 | 3,62 ^{bb} ± 0,51 |
| AFE | 0,59 ^{da} ± 0,05 | 2,37 ^{ca} ± 0,24 | 0,88 ^{cb} ± 0,05 | 3,14 ^{bb} ± 0,17 |
| AFC | 1,45 ^{aA} ± 0,11 | 4,42 ^{abA} ± 0,42 | 1,48 ^{aA} ± 0,08 | 4,91 ^{aA} ± 0,51 |
| GFC | 0,69 ^{cdA} ± 0,02 | 2,01 ^{ca} ± 0,41 | 0,93 ^{cb} ± 0,07 | 3,07 ^{bb} ± 0,32 |
| GRE | 0,72 ^{cdA} ± 0,05 | 2,56 ^{ca} ± 0,12 | 0,90 ^{cb} ± 0,07 | 3,53 ^{bb} ± 0,36 |
| MIC | 0,80 ^{bcA} ± 0,07 | 2,46 ^{ca} ± 0,23 | 0,82 ^{ca} ± 0,05 | 2,96 ^{ba} ± 0,12 |
| ENF | 0,55 ^{da} ± 0,01 | 2,54 ^{ca} ± 0,18 | 0,90 ^{cb} ± 0,09 | 3,90 ^{bb} ± 0,50 |
| EFC | 1,41 ^{aA} ± 0,06 | 5,15 ^{aA} ± 0,13 | 0,98 ^{cb} ± 0,05 | 3,32 ^{bb} ± 0,23 |
| FRI | 1,50 ^{aA} ± 0,11 | 3,76 ^{ba} ± 0,36 | 1,20 ^{bb} ± 0,04 | 2,96 ^{bb} ± 0,06 |

CRU (peixe cru); AFE: assado em forno elétrico; AFC: assado em forno combinado; GFC: grelhado em forno combinado; GRE: grelhado em grill; MIC: aquecido em micro-ondas; ENF: ensopado em fogão; EFC: ensopado em forno combinado; FRI: frito em fritadeira. Média ± desvio padrão (n = 9) indicadas por uma mesma letra minúscula em uma mesma coluna e mesma letra maiúscula entre as colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas amostras de pescada-branca em base úmida, somente os tratamentos AFC e FRI provocaram teores significativamente maiores do que o CRU e diferiram entre si ($p < 0,05$).

O tratamento FRI induziu ao menor teor de umidade (Tabela 1.1), o que justificou uma maior concentração do conteúdo de cinzas nas amostras de peixe de ambas as espécies. Em outros estudos, como no trabalho de Erkan et al. (2010), os teores de cinzas nos filés de peixes fritos (180 °C) foram superiores aos crus, cozidos ao vapor (2000 W, 10 a 12 min) e grelhados (180 °C por 30-40 min) tanto na base úmida quanto na base seca. Gall et al. (1983), Garcia-Arias (2003) e Gokoglu et al. (2004) também encontraram um maior teor de cinzas em peixes fritos (180 °C) e associaram este resultado, a perda de umidade causada pela fritura à concentração nos teores de cinzas nas amostras. Já Türkkan et al. (2008) não encontraram diferenças significativas ($p > 0,05$) nos teores de cinzas (base úmida) no peixe robalo entre os métodos frito (180 °C), assado (180 °C por 30 min) e cozido em micro-ondas (2450 MHz por 13 min) que apresentaram-se significativamente superiores ($p > 0,05$) ao do cru. Por outro lado, Koubaa et al. (2012) relataram teores de cinzas (base úmida)

significativamente menores ($p < 0,05$) nos peixes cozido a vapor (10 min), assado (220 °C por 10 min) e frito (180 °C por 5 min) em comparação ao cru, associando a redução nos teores de cinzas à perda de água que levou à lixiviação dos minerais.

No presente estudo, em base seca houve algumas variações na influência dos diferentes tipos de tratamentos sobre os teores de cinzas, em relação ao já relatado para a base úmida. Para o filé de merluza os tratamentos também influenciaram nos teores de cinzas causando uma redução significativa ($p < 0,05$) em comparação ao CRU, exceto para o método EFC e AFC. Os menores teores foram para o GFC, AFE, MIC, ENF e GRE que não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$). Nas amostras de filé de pescada-branca, novamente o maior teor de cinzas foi do AFC que diferiu dos demais métodos ($p < 0,05$). Os demais tratamentos não interferiram no conteúdo de cinzas, pois não diferiram significativamente do CRU ($p > 0,05$).

De forma semelhante ao presente estudo, Gall et al. (1983) trabalhando com quatro espécies de peixes (Garoupa, Pargo, Flórida Pompano e Cavala) justificaram um aparente aumento da concentração no teor de cinzas com as perdas de umidade pelo cozimento. Entretanto, quando os dados foram expressos em termos de matéria seca desengordurada, os filés cozidos em água, grelhado e micro-ondas tiveram um teor de cinzas inferior aos filés crus correspondentes a cada espécie. Conteúdos de cinzas foram perdidos quando os filés de espécies com pouca gordura foram assados, cozidos, fritos ou cozidos com micro-ondas. Não se observou redução no teor de cinzas em base úmida, seca ou seca desengordurada, quando os filés de Cavala ricos em gordura foram cozidos. Estes dados sugeriram uma relação entre as cinzas perdidas durante o cozimento e o teor de lipídios dos filés originais (GALL et al., 1983). De certa forma, no presente estudo pode-se sugerir relação semelhante entre a perda de cinzas e o teor de lipídios, já que o filé cru de pescada-branca teve um teor de lipídios significativamente maior ($p < 0,05$) do que o filé cru de merluza e apresentou menor perda de cinzas ($p < 0,05$) para os tratamentos ENF, AFE, GRE e GFC apesar do conteúdo inicial de cinzas ter sido inferior ao dos filés de merluza ($p < 0,05$).

Zotos et al. (2013) relataram uma redução significativa ($p \leq 0,05$) nos teores de cinzas nas amostras de anchovas fritas em óleo de girassol em relação às amostras cruas, entretanto, para sardinhas assadas em diferentes tempos (20 a 60 min), não encontraram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos teores de cinzas em relação às cruas.

3.3.4 SÓDIO

Foi observado um aumento no teor de sódio para o filé de merluza (base úmida) após a cocção. Os tratamentos que tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos filés crus foram EFC, AFC e FRI (Tabela 1.6). Em base úmida, no filé de pescada-branca, o tratamento térmico exerceu menor influência havendo diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao CRU somente para o tratamento AFC, no qual se encontrou o maior teor de sódio. Por se tratar de dados obtidos em base úmida, o aumento dos teores é explicado pela redução da umidade promovida pelo tratamento térmico e, conseqüente concentração do mineral.

Tabela 1.6. Teor médio de sódio ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) em filés de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção

| Método | SÓDIO ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) | | | |
|--------|--|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| | Merluza | | Pescada-branca | |
| | Base úmida | Base seca | Base úmida | Base seca |
| CRU | 56,16 ^{ba} ± 2,58 | 299,37 ^{ca} ± 30,48 | 82,99 ^{bb} ± 14,69 | 381,24 ^{abb} ± 63,36 |
| AFE | 91,44 ^{ba} ± 11,31 | 371,02 ^{bca} ± 61,01 | 76,62 ^{ba} ± 17,52 | 274,46 ^{bcb} ± 27,40 |
| AFC | 143,17 ^{aa} ± 18,90 | 437,62 ^{aba} ± 63,15 | 127,01 ^{aa} ± 7,38 | 453,02 ^{aa} ± 40,79 |
| GFC | 74,42 ^{ba} ± 0,60 | 255,46 ^{ca} ± 40,27 | 81,56 ^{ba} ± 11,51 | 268,98 ^{bca} ± 35,34 |
| GRE | 78,10 ^{ba} ± 12,42 | 279,34 ^{ca} ± 49,79 | 72,92 ^{ba} ± 11,41 | 285,53 ^{bca} ± 48,77 |
| MIC | 89,40 ^{ba} ± 9,05 | 274,26 ^{ca} ± 24,35 | 86,51 ^{ba} ± 2,97 | 313,95 ^{bca} ± 15,25 |
| ENF | 56,37 ^{ba} ± 5,55 | 261,78 ^{ca} ± 33,84 | 68,45 ^{ba} ± 3,05 | 293,56 ^{bca} ± 26,12 |
| EFC | 144,64 ^{aa} ± 21,52 | 531,11 ^{aa} ± 87,04 | 100,79 ^{abb} ± 5,98 | 343,54 ^{abcB} ± 53,76 |
| FRI | 141,32 ^{aa} ± 20,05 | 355,36 ^{bca} ± 55,93 | 98,68 ^{abb} ± 14,05 | 243,30 ^{cb} ± 29,81 |

CRU (peixe cru); AFE: assado em forno elétrico; AFC: assado em forno combinado; GFC: grelhado em forno combinado; GRE: grelhado em grill; MIC: aquecido em micro-ondas; ENF: ensopado em fogão; EFC: ensopado em forno combinado; FRI: frito em fritadeira. Média ± desvio padrão ($n = 9$) indicada por uma mesma letra minúscula em uma mesma coluna e mesma letra maiúscula entre as colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O tratamento AFC, para ambas as espécies em estudo, foi o que gerou maior aumento do teor de sódio. Como neste tratamento houve a aplicação de vapor, gerado pelo próprio forno combinado, durante todo o processo de cocção, pode-se inferir que o sódio presente na água que gerou o vapor foi adsorvido pela amostra. Este fato também explicaria o maior teor de sódio encontrado após o tratamento EFC, no qual também é utilizado o vapor. Scheibler et al. (2010) também consideraram uma adsorção do sódio em amostras de batatas submetidas a diferentes métodos de cocção (cozida, micro-ondas, vapor) para explicar o aumento ocorrido do mineral em todas as amostras analisadas.

Na literatura os resultados dos efeitos de cocção sobre os teores de sódio em peixes são variáveis. Rosa et al. (2007) relataram aumentos significativos ($p < 0,05$) nos teores de sódio (base úmida) de bagres africanos cozido ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 min), frito ($180\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min) e grelhado ($350\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min) em relação ao cru. Por outro lado, Ersoy (2011) observou uma redução significativa ($p = 0.000$) do teor de sódio, em base úmida, em todas as amostras do peixe enguia europeia submetidas aos métodos assar ($200\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min), grelhar ($200\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min), fritar ($200\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 min) e micro-ondas (2450 MHz , 4 min). Já Hosseini et al (2014) verificaram que assar e fritar não exerceram nenhum efeito significativo ($p > 0,05$) no conteúdo de sódio das amostras de peixe enquanto o cozimento em água fervente (5 min) e o micro-ondas (2450 MHz , 13 min) causaram um decréscimo do conteúdo de sódio ($p < 0,05$). O conteúdo de sódio de trutas arco-íris foi afetado significativamente pela cocção ($p < 0,05$) tendo aumentado após a cocção por micro-ondas e diminuído no cozimento em água (Gokoglu et al., 2004). Assim, a cocção parece exercer efeitos diversos no teor de sódio em diferentes espécies de peixe. Em base seca, para o filé de merluza, confirmou-se o aumento significativo ($p < 0,05$) do teor de sódio em relação ao CRU nos tratamentos AFC, EFC e FRI. Contrariamente para as amostras de filé de pescada-branca os tratamentos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao CRU, exceto o tratamento FRI que apresentou redução significativa. Pressupõe-se, neste caso, que o processo de fritura causou maior perda por carreamento do sódio junto com o vapor de água. Ersoy & Özeren (2009) observaram em amostras de bagres africanos aumento significativo ($p < 0,05$) dos teores de sódio, em base seca, para os métodos cozido, micro-ondas, assados e fritos, enquanto houve uma redução nas amostras grelhadas. Já Koubaa et al. (2012) encontraram uma redução significativa ($p < 0,05$) nos conteúdos de sódio de filés de peixe após todos os

métodos de cozimento (fritura, cozimento, assado em forno e micro-ondas), dados também fornecidos em base seca.

No presente estudo, embora o teor de sódio dos peixes crus tenha diferido entre si ($p < 0,05$), com maior teor para os filés de pescada-branca, após a cocção as diferenças entre as espécies dentro do mesmo tratamento foram, em sua maioria, insignificantes ($p > 0,05$). Os tratamentos EFC e FRI diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si (bases úmida e seca), e o tratamento AFE só diferiu entre os peixes quando analisado em base seca. Esperava-se que os métodos de cocção interferissem de forma similar em ambas as espécies, porém, como observado anteriormente, tais resultados reforçam a hipótese de que a cocção por si só não foi determinante do conteúdo mineral. TANNEMBAUM et al. (1993) apontam que as perdas minerais que ocorrem no processo de cocção são atribuídas ao processo de lixiviação que promove um arraste de constituintes hidrossolúveis, porém, Pedrosa & Cozzolino (2001) propõem também que a presença de outros constituintes nos alimentos impede a perda de minerais, durante a cocção, por se ligarem a eles, tal fato explicaria o fator diferencial entre as duas espécies de peixe estudadas.

Na RDC Nº. 54/2012 consta que um alimento possui baixo teor de sódio se apresentar, no máximo, 80 mg em 100 g ou 100 mL em pratos preparados, conforme o caso (BRASIL, 2012). Assim sendo, além do filé de merluza CRU, somente os tratamentos, ENF, GRE e GFC dos filés de merluza e os tratamentos ENF, GRE e AFE dos filés de pescada-branca foram considerados com baixo teor de sódio.

3.3.5 POTÁSSIO

Os teores de potássio dos filés de merluza, em base úmida, só foram alterados para os tratamentos AFC, FRI e EFC que aumentaram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao CRU. Para o filé de pescada-branca (base úmida), os aumentos nos teores de potássio detectados após a cocção não foram significativos ($p > 0,05$) em relação ao teor do CRU (Tabela 1.7).

Tabela 1.7 Teor médio de potássio (mg.100 g⁻¹) em em filés de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção

| Amostras | POTÁSSIO (mg.100 g ⁻¹) | | | |
|----------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Merluza | | Pescada-branca | |
| | Base úmida | Base seca | Base úmida | Base seca |
| CRU | 112,64 ^{CA} ± 10,13 | 597,35 ^{CA} ± 16,43 | 184,27 ^{abcB} ± 22,85 | 846,25 ^{ab} ± 90,84 |
| AFC | 417,86 ^{aA} ± 6,00 | 1276,06 ^{aA} ± 29,39 | 239,62 ^{ab} ± 5,07 | 792,44 ^{abcB} ± 39,81 |
| AFE | 118,47 ^{CA} ± 10,41 | 478,00 ^{cdA} ± 21,80 | 141,58 ^{CA} ± 27,49 | 507,18 ^{eA} ± 98,56 |
| GFC | 125,70 ^{CA} ± 15,46 | 426,56 ^{dA} ± 28,62 | 194,76 ^{abcB} ± 8,60 | 643,38 ^{cdeB} ± 44,26 |
| GRE | 142,92 ^{CA} ± 17,24 | 510,68 ^{cdA} ± 69,09 | 152,47 ^{bcA} ± 24,36 | 594,92 ^{deA} ± 85,75 |
| MIC | 140,66 ^{CA} ± 24,97 | 431,18 ^{dA} ± 70,92 | 189,63 ^{abcB} ± 22,64 | 690,08 ^{bcdB} ± 83,69 |
| ENF | 94,50 ^{CA} ± 4,32 | 437,58 ^{dA} ± 5,82 | 186,54 ^{abcB} ± 20,22 | 807,99 ^{abB} ± 56,81 |
| EFC | 312,68 ^{bA} ± 65,52 | 1145,67 ^{aA} ± 32,20 | 241,15 ^{ab} ± 24,00 | 813,70 ^{abB} ± 38,72 |
| FRI | 365,80 ^{abA} ± 20,47 | 918,91 ^{bA} ± 63,96 | 218,50 ^{abB} ± 55,92 | 539,34 ^{deB} ± 23,73 |

CRU (peixe cru); AFE: assado em forno elétrico; AFC: assado em forno combinado; GFC: grelhado em forno combinado; GRE: grelhado em grill; MIC: aquecido em micro-ondas; ENF: ensopado em fogão; EFC: ensopado em forno combinado; FRI: frito em fritadeira. Média ± desvio padrão (n = 9) indicadas por uma mesma letra minúscula em uma mesma coluna e mesma letra maiúscula entre as colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Gokoglu et al. (2004) verificaram que os teores de potássio (base úmida) de amostras de truta arco-íris grelhadas e cozidas em micro-ondas aumentaram significativamente ($p < 0,05$) enquanto nas amostras cozidas diminuíram significativamente ($p < 0,05$) e nas amostras fritas e assadas foram insignificantes ($p > 0,05$). Rosa et al. (2007) relataram aumentos significativos ($p < 0,05$) nos teores de potássio (base úmida) em peixes submetidos aos métodos de cocção frito e grelhado e não detectaram diferenças entre o cru e o cozido. Hosseini et al. (2014) só identificaram influência do cozimento em água que levou a um decréscimo significativo ($p < 0,05$) no conteúdo de potássio nas amostras de peixe, os demais métodos usados (assado, micro-ondas e frito) não exerceram nenhum efeito no conteúdo de potássio.

A análise em base seca demonstrou que os tratamentos térmicos exerceram influência diferente da relatada em base úmida nas duas espécies de peixe. Os teores de potássio dos filés de merluza diminuíram significativamente ($p < 0,05$) nos

tratamentos GFC, MIC e ENF e nos filés de pescada-branca no AFE, GFC, GRE, MIC e FRI em relação ao CRU. O aumento foi mantido para os tratamentos AFC, EFC e FRI nos filés de merluza. Pressupõe-se que nos tratamentos AFC e EFC que promoveram o aumento do teor de potássio, as condições de vapor utilizadas tenham contribuído para reduzir a lixiviação, promovendo da mesma forma que ocorreu com o sódio, uma adsorção do mineral na superfície do alimento.

Os teores de potássio dentro do mesmo tratamento comparando-se as duas espécies estudadas, tanto em base úmida quanto em base seca, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) exceto para o AFE e GRE. Novamente supõe-se que, por se tratarem de duas espécies distintas de peixe, a presença ou ausência de outros constituintes tenham interferido na preservação/perda do mineral durante a cocção. Destaca-se a diferença de resultados para o tratamento FRI entre as espécies já que nas amostras de merluza os teores de potássio foram significativamente mais altos e nas amostras de pescada-branca foram significativamente menores ($p < 0,05$) em comparação ao CRU. Em estudos envolvendo outras espécies de peixe foram também relatadas influências diferenciadas dos métodos de cocção aplicados sobre o teor de potássio. Marimuthu et al. (2012) encontraram o maior teor de potássio em base seca para as amostras de peixe cabeça de cobra frito e o menor para as amostras assadas. Ersoy & Özeren (2009) encontraram aumento significativo ($p < 0,05$) no teor de potássio (base seca) em relação ao cru em todas as amostras de bagres africanos analisadas: grelhada, assada, micro-ondas e frita. Em amostras de enguia européia submetidas aos métodos assar, grelhar, fritar e micro-ondas o teor de potássio reduziu significativamente ($p < 0,05$) em comparação ao cru (ERSOY, 2011).

3.3.6 RELAÇÃO SÓDIO/POTÁSSIO (Na/K)

A OMS recomenda uma ingestão de < 2 g/dia de sódio (5 g/dia de cloreto de sódio) em adultos objetivando reduzir a pressão arterial, risco de doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e doença cardíaca coronária em adultos (WHO, 2012a). Para o potássio a recomendação é de pelo menos 3510 mg/dia para adultos (WHO, 2012b). Um aumento da ingestão de potássio leva à redução da pressão arterial, diminui o risco de doenças cardiovasculares, tem efeitos benéficos sobre a densidade mineral óssea, e mitiga as consequências negativas do consumo elevado de sódio (WHELTON et al., 1997). Drewnowski et al (2012) relataram que a

relação sódio/potássio deveria ser inferior a 1,0. Da mesma forma, Rosa et al (2012) consideraram que a relação sódio/potássio inferior a 1,0 é interessante sob o ponto de vista nutricional e que relações maiores do que 1,5 têm sido associadas à incidência de hipertensão considerando as informações da Sociedade Americana para Ciências Nutricionais.

Os resultados da relação sódio/potássio do presente estudo (Tabela 1.8) foram todos inferiores a 1,0, independentemente do tratamento térmico aplicado. Em termos absolutos verificou-se, de forma geral, que no filé de merluza a relação foi maior do que no filé de pescada. Destaca-se o tratamento AFE que, em ambas as espécies, teve uma relação mais próxima de 1,0.

Tabela 1.8 Relação Na/K (mg.100 g⁻¹) em filés de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*) crus e submetidos a diferentes métodos de cocção

| Método | Relação Na/K (mg.100 g ⁻¹) | |
|--------|--|----------------|
| | Merluza | Pescada-branca |
| CRU | 0,50 | 0,45 |
| AFE | 0,77 | 0,54 |
| AFC | 0,34 | 0,53 |
| GFC | 0,59 | 0,42 |
| GRE | 0,55 | 0,48 |
| MIC | 0,64 | 0,46 |
| ENF | 0,60 | 0,37 |
| EFC | 0,46 | 0,42 |
| FRI | 0,39 | 0,45 |

CRU (peixe cru); AFE: assado em forno elétrico; AFC: assado em forno combinado; GFC: grelhado em forno combinado; GRE: grelhado em grill; MIC: aquecido em micro-ondas; ENF: ensopado em fogão; EFC: ensopado em forno combinado; FRI: frito em fritadeira.

Tanase et al (2011) publicaram o primeiro relatório sobre os teores de sódio e potássio a partir de análises em alimentos canadenses e verificaram que as proporções molares de sódio:potássio foram tipicamente altas ou baixas, com alguns valores próximos da unidade. Assim, com poucas exceções, alimentos ricos em sódio foram mais baixos em potássio, e vice-versa. Especificamente nas amostras de peixe, encontraram proporções de sódio:potássio de 0,18 em truta arco-íris e de 0,94 em uma mistura de hadoque, bacalhau e linguado. Embora muitos estudos disponíveis na literatura não façam referência direta a relação sódio/potássio, confirmou-se uma tendência do teor de potássio ser mais elevado do que o de sódio no tecido muscular

dos peixes (GOKOGLU et al. 2004; ERSOY & ÖZEREN, 2009, ERSOY et al. 2011; HOSSEINI et al. 2014).

Há uma preocupação com a população mundial que, de modo generalizado, aumentou o consumo de alimentos processados nos quais há uma remoção de potássio combinada a uma redução no consumo de frutas e vegetais, considerados as maiores fontes dietéticas desde mineral (HE & MACGREGOR, 2008). Assim, o fato da cocção do peixe não ter influenciado negativamente a relação sódio/potássio é um aspecto nutricional muito positivo.

He & MacGregor (2008) enfatizaram também os estudos epidemiológicos e clínicos que comprovaram que uma dieta rica em potássio além de reduzir a pressão arterial em indivíduos e a pressão arterial média da população, reduz a mortalidade por doença cardiovascular, impede ou retarda a progressão da doença renal, reduz a excreção urinária de cálcio e desempenha um papel importante na gestão de hipercalcúria e pedras nos rins e provavelmente diminui também o risco de osteoporose.

3.3.7 VALOR ENERGÉTICO

Todas as amostras apresentaram aumento nos valores energéticos (VE), em base úmida, após a cocção. Devido à escassez de trabalhos disponíveis na literatura foram realizados cálculos do VE a partir dos dados de nutrientes de peixes submetidos a diferentes métodos de cocção apresentados por alguns autores (Tabela 1.9), tendo como base a mesma metodologia utilizada no presente trabalho (FAO, 2002). Verificou-se que todos os métodos de cocção proporcionaram um aumento no VE para os peixes, provavelmente devido à redução do teor de umidade e aumento nos teores de proteínas e ou lipídios das amostras. Verificou-se também que tanto para os peixes de água salgada (merluza, pescada, anchova e badejo) quanto para os peixes de água doce (jundiá e truta arco-íris) há uma considerável variação do VE nas amostras cruas (Tabela 1.9). As variações nos VE dos peixes ocorrem em função da variação na composição química, especialmente nos teores de proteínas e lipídios que, como já citado, tanto em pescados provenientes de água marinha ou doce, variam de espécie para espécie e de indivíduo para indivíduo, dependendo não só de fatores geográficos e ambientais, mas também da idade, sexo, estado de maturação sexual, comportamento migratório, alimentação, entre outros (HUSS, 1995; GÜNER et al., 1998; OGAWA, 1999; MACEDO-VIEGAS et al., 2002; ORDÓÑEZ et al., 2002).

Tabela 1.9 Valores energéticos (kcal.g⁻¹) médios de estudos envolvendo diferentes espécies de peixe

| Amostras | Presente trabalho | | Weber et al. (2008) | Gokoglu et al. (2004) | Erkan et al. (2010) | |
|-------------|------------------------------|--|----------------------------------|--|---|---------------------------------|
| | Merluza (<i>M. hubbsi</i>) | Pescada-branca (<i>C. leiarchus</i>) | Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) | Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) | Anchova (<i>Dicentrarchus labrax</i>) | Badejo (<i>Sparus aurata</i>) |
| Cru | 81,36 | 98,46 | 84,59 | 110,16 | 189,41 | 58,63 |
| Cozido | 96,58 | 103,25 | 102,45 | 121,52 | 231,4 | 91,14 |
| Assado | 105,68* | 122,67* | 124,76 | 148,93 | Nd | Nd |
| Grelhado | 120,68 | 112,53 | 136,91 | 153,55 | 237,33 | 149,74 |
| Micro-ondas | 136,44 | 122,11 | 117,93 | 156,84 | Nd | Nd |
| Frito | 210,95 | 209,41 | 259,60 | 219,66 | 339,49 | 187,83 |

Nd= não determinado *Método AFC (Assado em forno elétrico)

Embora não tenha sido possível realizar uma análise estatística para comparação dos resultados com os estudos apresentados na Tabela 1.9, verificou-se que, dentre os métodos de cocção, o cozido proporcionou o menor VE absoluto para todos os peixes. Contudo, de acordo com a RDC nº 54 um alimento só será considerado de baixo VE se apresentar valores de no máximo 40 kcal.g⁻¹ em 100 g ou 100 mL em pratos preparados, conforme o caso (BRASIL, 2012). Assim, nenhum dos métodos proporcionou um alimento de baixo VE. Como era esperado, o método frito proporcionou o maior VE em todos os estudos devido, principalmente, à absorção do óleo de fritura que eleva as calorias de forma considerável já que cada grama de gordura proporciona 9 kcal (FAO, 2002).

Nas amostras de filé de merluza e de pescada-branca foram encontrados VE semelhantes (Tabela 1.10), principalmente para os métodos GRE, ENF, GFC, AFC e FRI, cujas diferenças foram inferiores a 10 %. Nos filés submetidos aos métodos CRU, AFE, MIC e EFC as diferenças foram superiores a 10 %, havendo predominância de VE mais altos para a pescada-branca, exceto em relação ao método MIC. As diferenças entre os VE dos filés CRU, AFE e EFC deveu-se aos maiores teores lipídicos e proteicos encontrados na pescada-branca. No caso do método MIC, que proporcionou maior VE para o filé de merluza, a diferença foi devido ao maior teor de proteínas.

Tabela 1.10 Valor energético das amostras cruas e submetidas a diferentes métodos de cocção em filés de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*)

| Amostras | Valor energético (kcal.g ⁻¹) | | |
|------------|--|----------------|----------------|
| | Merluza | Pescada-branca | % de diferença |
| CRU | 81,36 | 98,46 | 17,36 |
| GRE | 120,68 | 112,53 | 6,75 |
| AFE | 105,68 | 122,67 | 13,85 |
| MIC | 136,44 | 122,11 | 10,50 |
| ENF | 96,58 | 103,25 | 6,46 |
| GFC | 124,58 | 133,92 | 6,97 |
| EFC | 115,63 | 129,13 | 10,45 |
| AFC | 137,27 | 131,04 | 4,54 |
| FRI | 210,95 | 209,41 | 0,73 |

CRU (peixe cru); GRE (peixe chapeado); AFE (peixe assado em forno elétrico); MIC (peixe cozido em forno micro-ondas); ENF (peixe ensopado em fogão convencional); GFC (peixe grelhado forno combinado); EFC (peixe ensopado forno combinado); AFC (peixe assado forno combinado).

4 CONCLUSÃO

Os filés crus de merluza e pescada-branca apresentaram diferenças significativas em sua composição centesimal. Para os filés de merluza crus foram encontrados menores teores de lipídios, proteínas, Na, K e baixo valor energético. Em termos da relação Na/K foi observada uma semelhança para as duas espécies sendo inferior a 1,0, situação considerada ideal sob o ponto de vista nutricional.

Em relação aos diferentes métodos de cocção aplicados nas duas espécies de peixe, para o teor de lipídios houve maior redução proporcionada pelo MIC nos filés de merluza e pelo EFC nos filés de pescada-branca. O método FRI apresentou maior teor lipídico devido à absorção de óleo do meio de cocção. Em termos proteicos, os métodos de cocção aos quais as duas espécies foram submetidas não causaram reduções significativas, portanto todas as preparações foram consideradas de alto conteúdo proteico. Para os filés obtidos após todos os métodos de cocção foi encontrada uma relação Na/K adequada, pois todas foram inferiores a 1,0. O método ENF foi o que propiciou um menor valor energético, tanto para merluza como para a pescada-branca. Pelos resultados obtidos, em termos nutricionais, verificou-se que não é possível apontar um único método como o melhor, contudo, considerando-se o maior

teor lipídico, maior valor calórico e menor teor proteico apresentado pelos filés FRI, a fritura seria o método menos recomendado

CAPÍTULO 2 IMPACTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE COZÇÃO NO TEOR DE COLESTEROL E NA FORMAÇÃO DE 7-CETOCOLESTEROL EM FILÉS DE MERLUZA (*Merluccius hubbsi*) E DE PESCADA-BRANCA (*Cynoscion leiarchus*)

RESUMO

Os níveis de colesterol e 7-cetocolesterol foram medidos em filés de merluza (*Merluccius hubbsi*) e pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) crus e submetidos aos seguintes métodos de cocção: assado em um forno elétrico e micro-ondas; cozido, grelhado e assado em forno combinado; cozido em um fogão convencional; grelhado em chapa elétrica e frito em fritadeira. Os filés processados de ambas as espécies exibiram os níveis de colesterol significativamente ($p < 0,05$) menores do que as amostras cruas. A maior redução do teor de colesterol (64,92 % nos filés de merluza e 65,08 % nos filés de pescada-branca) ocorreu nos filés submetidos ao tratamento AFC. Em todas as amostras o 7-cetocolesterol foi detectado em níveis significativamente diferentes ($p < 0,05$), dependendo do método de cocção e do tipo de peixe. Os teores de 7-cetocolesterol foram mais elevados para os filés de merluza submetidos aos tratamentos GFC ($13,94 \pm 1,17 \mu\text{g.g}^{-1}$), AFE ($13,41 \pm 0,75 \mu\text{g.g}^{-1}$) e AFC ($12,00 \pm 1,24 \mu\text{g.g}^{-1}$), tratamentos nos quais foram utilizados altas temperaturas e tempos de cocção mais longos. O teor mais baixo de 7-cetocolesterol ($p < 0,05$) foi detectado no tratamento EFC ($6,90 \pm 0,21 \mu\text{g.g}^{-1}$ de filé de merluza e $6,47 \pm 0,28 \mu\text{g.g}^{-1}$ de filé de pescada-branca). Estes resultados indicam a necessidade de revisão dos procedimentos nos filés de peixe assados, objetivando o fornecimento de alimentos mais saudáveis.

Palavras-chave: peixe, oxidação do colesterol, processamento térmico, serviço de alimentação, CG/EM.

ABSTRACT

IMPACT OF DIFFERENT COOKING METHODS ON THE CHOLESTEROL CONTENT AND FORMATION OF 7-KETOCHOLESTEROL IN ATLANTIC HAKE (*MERLUCCIOUS HUBBSI*) AND SMOOTH WEAKFISH (*CYNOSCION LEIARCHUS*) FILLETS. The levels of cholesterol and 7-ketocholesterol were measured in raw Atlantic hake (*Merluccius hubbsi*) and smooth weakfish (*Cynoscion leiarchus*) fillets and in fillets subjected to the following cooking methods: baking in an electric or microwave oven; baking, grilling or stewing in a steam-convection oven; simmering on a stove; electric grilling; and deep frying. The processed fillets from both fishes exhibited significantly ($p < 0.05$) lower cholesterol levels than the raw samples. The greatest reduction of cholesterol (64.92% in fillets of Atlantic hake and 65.08% in the fillets of smooth weakfish) occurred in fillets subjected to the treatment BOS. In all of the samples, 7-ketocholesterol was detected at significantly ($p < 0.05$) different levels depending on the cooking method and the type of fish. The levels of 7-ketocholesterol were higher for fillets of Atlantic hake submitted to the GCO ($13.94 \pm 1.17 \mu\text{g.g}^{-1}$), BEO ($13.41 \pm 0.75 \mu\text{g.g}^{-1}$) and BOS treatments ($12.00 \pm 1.24 \mu\text{g.g}^{-1}$), in which high temperatures and long cooking times were used. The lowest level of 7-ketocholesterol ($p < 0.05$) was detected in fillets in the treatment SOS ($6.90 \pm 0.21 \mu\text{g.g}^{-1}$ of the Atlantic hake fillet and $6.47 \pm 0.28 \mu\text{g.g}^{-1}$ of the fillet smooth weakfish). These results indicate the necessity of revising the baking procedures for fish to increase the healthiness of food.

Keywords: fish, cholesterol oxidation, heat processing, food service, GC/MS.

1 INTRODUÇÃO

O colesterol (colest-5-en-3 β -ol), um componente essencial para a estrutura e funcionamento das membranas celulares (RAYNER et al., 2010), encontra-se em quantidades importantes em peixes e outros alimentos de origem animal (SOTO-RODRIGUEZ et al., 2008). Como um álcool insaturado, o colesterol é susceptível à oxidação, formando compostos conhecidos como produtos de oxidação de colesterol,

oxisteróis ou óxidos de colesterol (OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2010). Estes compostos constituem um grupo de esteróis semelhantes à estrutura de colesterol, mas que contém, como um complemento, um grupo hidroxila, cetona ou epóxido no anel esterol ou um grupo hidroxila na cadeia lateral da molécula (CARDENIA et al., 2013).

Embora o papel dos produtos de oxidação do colesterol da dieta na aterogênese seja controverso (STAPRANS et al., 2000; ANDO et al., 2002), há evidências de que os óxidos de colesterol dietéticos promoveram aterogênese em ratos (SOTO-RODRIGUEZ et al., 2009) e lesões hepáticas induzidas por hipercolesterolemia em coelhos (HUR et al., 2014). Além disso, vários óxidos de colesterol demonstraram ser citotóxico (MONIER et al., 2003; NURY et al., 2013), mutagênico (CHENG et al., 2005), carcinogênico (LINSEISEN et al., 2002, POIROT & SILVENTE-POIROT, 2012; POLI et al., 2013) e possuem efeitos biológicos indesejáveis, tais como a interferência no metabolismo de esterol e alterações nas propriedades da membrana celular (BÖSINGER et al., 1993; SCHROEPFER, 2000). Em alimentos submetidos ao calor, a oxidação do colesterol inicia-se principalmente por meio da remoção de um átomo de hidrogênio na posição do carbono C-7 do anel esterol seguido pela adição de uma molécula de oxigênio, conduzindo à formação de 7α e 7β -hidroperoxicolesterol. Estes hidroperóxidos prontamente se decompõem e sofrem desidratação adicional para formar 7-cetocolesterol durante o aquecimento de alimentos (SMITH, 1996). Outros produtos de oxidação de colesterol também podem ser formados por meio de oxidação em carbonos C-5 e C-6 do anel de esterol, tais como a produção de epóxidos $5,6\ \alpha$ -epoxicolesterol e $5,6\ \beta$ -epoxicolesterol. As oxidações na cadeia lateral promovem a formação de monohidroperóxidos, principalmente 20α -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 26-hidroxicolesterol, e seus produtos de degradação (BROWN & JESSUP, 2009).

Entre os vários produtos de oxidação do colesterol, 7-cetocolesterol tem provado ser um marcador útil de oxidação do colesterol em alimentos processados, uma vez que é produzido em grandes quantidades e nas fases iniciais do processo oxidativo, especialmente em peixe e outros produtos marinhos (PARK & ADIS, 1985; RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2012; RODRÍGUEZ-ESTRADA et al., 2014).

Peixes com maior teor lipídico são considerados um dos alimentos mais suscetíveis à oxidação pelo seu conteúdo de colesterol e ácidos graxos poli-insaturados (HUR et al., 2007). Os ácidos graxos poli-insaturados são altamente

susceptíveis à oxidação mesmo sob condições de aquecimento moderado e são fontes de radicais livres que aceleram os mecanismos de oxidação de colesterol (SMITH, 1987; KIM & NAWAR, 1991, XU et al., 2011). O peixe é por vezes consumido cru, mas geralmente é submetido à cocção que favorece a oxidação de lípidios podendo levar a perdas em seu valor nutricional (SALDANHA et al., 2008). A formação de óxidos de colesterol em peixes processados foi reportada anteriormente (OHSHIMA et al., 1993, SHOZEN et al., 1995; ECHARTE et al., 2001; ZUNIN et al., 2001; AL-SAGHIR et al., 2004; SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2008; SALDANHA et al, 2008;. SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2010). No entanto, existem poucos estudos sobre a influência de diferentes métodos de cocção em peixes merluza (*Merluccius hubbsi*) e pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*). Estes peixes são muito utilizados em serviços de alimentação brasileiros, mas o conhecimento disponível sobre o efeito dos métodos de cocção, usualmente empregados nesses estabelecimentos sobre a formação de produtos de oxidação do colesterol nos peixes processados é ainda limitado. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a formação de 7-cetocolesterol em filés de merluza e de pescada-branca, processados por métodos de cocção comumente empregados nos serviços de alimentação, incluindo grelhar, ensopar, fritar e assar em diferentes equipamentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Filés de merluza (*Merluccius hubbsi*) e de pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) foram cedidos pelo Restaurante Universitário da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais. Amostras (30 kg) de cada espécie foram adquiridas congeladas de uma distribuidora de pescados congelados (Belo Horizonte, Brasil). Os filés foram mantidos à temperatura de -18 °C, em congelador Termisa[®] modelo BD 400 (Maracanaú, Brasil), até o momento de seu processamento, que ocorreu num período máximo de 30 dias após a aquisição e prazo inferior aos 180 dias de validade do produto.

2.2 COCÇÃO DAS AMOSTRAS

Os filés limpos e sem pele, apresentando aproximadamente 15 cm de comprimento, 6 cm de largura e 2 cm de espessura, foram previamente descongelados sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$). Em seguida, amostras de cerca de 500 g do filé (cerca de 3 a 4 filés) de cada espécie de peixe, foram submetidas a oito diferentes métodos de cocção (fritura, assado em forno elétrico, assado em forno combinado, grelhado em chapa elétrica, grelhado em forno combinado, ensopado em fogão, ensopado em forno combinado e cocção em forno micro-ondas. Ao final de cada processamento, todas as amostras tiveram a temperatura final medida utilizando-se termômetro digital portátil *Equitherm*[®] (Gravataí, Brasil). Após o preparo, cada amostra foi triturada e homogeneizada em multiprocessador *Hamilton Beach Brands*[®] (Glen Allen, EUA), embalada a vácuo em plástico de poliamida e polietileno e mantida congelada a -18°C , até o momento das análises. As amostras foram descongeladas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. As amostras submetidas à cocção e *in natura* (CRU) foram preparadas em triplicatas e cada preparação foi analisada em três repetições ($n = 9$).

As condições de tempo e temperatura empregadas no processamento foram as normalmente adotadas pela unidade de alimentação. No método de fritura (FRI) foi utilizada fritadeira semi-industrial, de aço inox, *Tedesco*[®] (Caxias do Sul, Brasil), com capacidade máxima de 3,5 L de óleo em cada cesto. O termostato foi ajustado para manter a temperatura a 180°C . Cada amostra foi submetida à fritura por três minutos sendo o óleo de soja substituído a cada amostragem de 500 g. Em forno elétrico convencional (AFE) utilizou-se um forno semi-industrial, sem ventilação forçada, *ITC Eletro*[®] (Guaramirim, Brasil), com temperatura mantida a 200°C por 30 minutos. As amostras foram assadas em refratários de vidro, com período de 15 minutos para cada lado do filé. As amostras de filé grelhadas (GRE) foram preparadas em chapa elétrica *Multi-Grill Express Baby*[®] (Londrina, Brasil). A chapa foi pré-aquecida a 180°C por 10 minutos e a amostra foi grelhada durante 4 minutos. No Forno Combinado EC3 *Gourmet Prática Technicook*[®] (Pouso Alegre, Brasil) os filés foram submetidos a três diferentes métodos: assar (AFC), grelhar (GFC) e ensopar (EFC). Para obtenção do peixe assado, os filés foram processados a temperatura de 180°C por 25 minutos em vapor médio. No preparo dos ensopados, os filés foram submetidos à cocção em vapor médio à temperatura de 150°C por 30 minutos. As amostras foram grelhadas a 220°C por 8 minutos. O fogão a gás *Continental 2001 Maxim's Giromagic*[®] (São Paulo, Brasil)

foi usado para ensopar os filés (ENF). A amostra de cada tipo de filé foi colocada em utensílio de aço inox *Rochedo*[®] nº 22. De acordo com a necessidade, foram adicionados 100 mL de água para auxiliar no processo de cocção, que teve duração de 18 minutos. Foi utilizado um forno micro-ondas *Maxi Gratine* inox *Brastemp*[®] (São Paulo, Brasil) para assar os filés (MIC). Cada amostra de filé foi colocada num refratário de vidro e processada por 15 minutos, em potência máxima (820 W) e frequência de 60 Hz.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1 PADRÕES E REAGENTES

Foram utilizados o 5 α -colestano ($\geq 97\%$) como padrão interno e os padrões de colesterol ($\geq 99\%$) e 7-cetocolesterol, obtidos da Sigma-Aldrich Co. Ltd (Milford, EUA). Clorofórmio, n-hexano e metanol, todos em grau HPLC, e hidróxido de potássio, cloreto de potássio, sulfato de sódio anidro e piridina foram adquiridos da Merck Brasil (Rio de Janeiro, Brasil). O reagente BSTFA/TMCS 99:1 (N,O-bis(trimetilsilil)/trimetilclorosilano) foi adquirido da Sigma-Aldrich Co. Ltd (Milford, EUA). Foram preparadas soluções estoque de 5 α -colestano na concentração de $0,5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, colesterol nas concentrações de $0,4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 7-cetocolesterol nas concentrações $0,05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,005\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, em n-hexano e armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por período máximo de 6 meses. Toda água utilizada foi obtida utilizando sistema MilliQ (Millipore[®], São Paulo, Brasil).

2.3.2 EXTRAÇÃO LIPÍDICA

A extração lipídica foi realizada de acordo com Folch et al., 1957. Logo após descongelamento, uma alíquota de $10 \pm 0,5\text{ g}$ de filé, foi homogeneizada com auxílio de almofariz e pistilo. Ao material triturado adicionou-se 200 mL de clorofórmio-metanol (2:1 v/v), sendo a mistura homogeneizada durante 3 minutos com auxílio de um *mixer*. A mistura foi filtrada para um funil de separação de 500 mL utilizando-se papel de filtro qualitativo (INLAB[®], tipo 50, de 9 cm). A fração residual foi cuidadosamente retirada do papel de filtro e novamente extraída com 100 mL de clorofórmio-metanol (2:1),

homogeneizada por mais 3 minutos no *mixer* e novamente filtrada para o funil de separação. O resíduo restante no almofariz e no *mixer* foi lavado com 30 mL de clorofórmio-metanol (2:1) e transferido diretamente para o funil de separação. A este, foram adicionados 66 mL de cloreto de potássio a 0,74 % (7,4 g de KCl em 1000 mL de água destilada). O funil foi tampado e a mistura submetida à agitação por cerca de 1 minuto. Após 3 minutos de repouso para ocorrer a separação das fases, a fase inferior (clorofórmio-metanol) foi transferida para um balão de fundo redondo de 250 mL (previamente seco a 105 °C durante 12 horas), contendo 5 g de sulfato de sódio anidro. O funil de separação e o papel de filtro foram lavados com 30 mL de clorofórmio-metanol (2:1), que também foram transferidos para o balão de fundo redondo. O clorofórmio foi retirado da solução e recuperado utilizando rotavapor em temperatura de no máximo 55 °C. Após pesagem do balão, o resíduo foi dissolvido com 10 mL de clorofórmio e transferido para tubo de Falcon e posteriormente evaporado utilizando fluxo de nitrogênio. Os tubos contendo o material oleoso obtido do filé de peixe foram mantidos em *freezer* a -18 °C, até o momento da extração do colesterol e 7-cetocolesterol.

2.3.3 EXTRAÇÃO DO COLESTEROL E 7-CETOCOLESTEROL

O material oleoso extraído das amostras de filé de peixe, foram submetidas a reação de saponificação, de acordo com procedimento sugerido por Chen & Chen, 1994. À alíquota do material oleoso, foram adicionados 20,0 µL da solução de 5 α-colestano (padrão interno) seguido de homogeneização em vórtex por 1 minuto. A seguir, foram adicionados 20 mL de KOH 1 mol.L⁻¹ em metanol, mantendo a mistura por 18 horas, a 25-30 °C, sob agitação mecânica nas duas primeiras e nas duas últimas horas do procedimento. Os frascos foram envoltos em papel alumínio para reduzir a exposição à luz. Para separação da fração insaponificável, logo após o término da reação foram adicionados 10 mL de água ultra pura, sendo a mistura imediatamente submetida a extração em funil de separação, por três vezes consecutivas com 10 mL de n-hexano. A fração orgânica foi lavada com 10 mL de KOH 1 mol.L⁻¹ em metanol e, por três vezes consecutivas, com 10 mL de água ultra pura. O extrato obtido foi filtrado em papel Whatman n° 1 contendo sulfato de sódio anidro e o material retido no filtro lavado com 20 mL de n-hexano (MORALES-AIZPURÚA & TENUTA-FILHO, 2005). Este solvente foi retirado utilizando evaporador rotatório a

40 °C sob vácuo, e o resíduo dissolvido com 1 mL de piridina e transferido para *vials* para análise cromatográfica.

2.3.4 DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA

As análises foram realizadas por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas em equipamento Shimadzu® (Tóquio, Japão), modelo GCMS-QP2010 Plus. As condições cromatográficas foram as seguintes: gás de arraste, hélio 5.0 analítico (White Martins®); vazão do gás de arraste, 1,46 mL.min⁻¹; velocidade linear da fase móvel, 45,0 cm.s⁻¹; modo de injeção *splitless*; volume injetado, 2 µL. A temperatura de interface foi de 280 °C e a temperatura da coluna inicialmente foi de 100 °C mantida por 1 min, aumentando para 200 °C a 10 °C.min⁻¹; depois para 250 °C a 15 °C.min⁻¹; depois para 280 °C a 3 °C.min⁻¹ e sendo mantida nessa temperatura por 5 min. O tempo de corrida foi de 26,67 min. A coluna utilizada foi a ZB-5HT inferno (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano), 30 m de comprimento, diâmetro de 0,25 mm e 0,10 µm de filme. Para a derivação foi utilizado o reagente de silição N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida/trimetilclorosilano 99:1 (BSTFA/TMCS) (WU et al., 2009). A derivação do analitos foi *on-line*, isto é, realizada diretamente no injetor do cromatógrafo. Neste procedimento o modo de injeção foi modificado para que amostra e reagente de derivação fossem injetados simultaneamente permitindo que a reação ocorresse no injetor, com a seguinte sequência: amostra, ar, BSTFA/TCM, ar. A aquisição dos dados ocorreu no modo SIM (íons seletivamente monitorados) utilizando razão massa carga (m/z) dos íons de maior intensidade sendo m/z 217, 218, 357 e 372 para 5α-colestano e m/z 357 para a quantificação e 217 para confirmação; para o colesterol foram utilizados m/z 129, 329, 368, 458 e o m/z 329 para a quantificação e 458 para confirmação; para o 7-cetocolesterol foram utilizados m/z 367, 457 e 472 e o m/z 367 para a quantificação e 472 para identificação. Os tempos de retenção foram de 15,9, 17,2 e 20,9 minutos para o 5 α-colestano, colesterol e 7-cetocolesterol, respectivamente.

A quantificação dos analitos foi realizada por padronização interna e curva de calibração preparada utilizando óleo de girassol, selecionado para compensação de possíveis interferentes. As curvas foram construídas em triplicatas e em seis níveis. As concentrações utilizadas foram de 10 µg mL⁻¹ para o padrão interno; 10 a 450 µg.mL⁻¹ para o colesterol e 0,1 a 15 µg.mL⁻¹ para o 7-cetocolesterol. As soluções padrão

utilizadas para a construção da curva de calibração foram preparadas em n-hexano, no dia de sua utilização, a partir de diluição das soluções estoque.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados utilizando-se o *software* CG-EM *Solutions* com base na relação sinal/ruído (S/R) dos analitos nos cromatogramas das soluções menos concentradas da curva de calibração. Foram adotadas as relações sinal-ruído $LD = S/R > 3$ e $LQ = S/R > 10$, sendo: S a intensidade do sinal obtido pelo analito com uma concentração conhecida e R o ruído gerado no mesmo tempo de retenção do analito quando este não está presente (AOAC *International*, 1998).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o ajuste da curva de calibração foi utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários, após verificação dos pressupostos de normalidade, independência dos resíduos, homogeneidade de variância e desvio da linearidade, de acordo com Souza e Junqueira (2005). Os dados foram avaliados por meio de análise de variância aplicada a esquema fatorial 2 x 9 (peixe x método de cocção). As diferenças entre os valores de acordo com o tipo de peixe e os métodos de cocção foram consideradas significativas utilizando o teste de Tukey para $\alpha = 0,05$.

Os coeficientes de correlação produto-momento (r) ou correlação de Pearson foram calculados para a relação entre os teores de colesterol e 7-cetocolesterol nos filés de peixe com um nível de significância de $p < 0,01$ (MONTGOMERY, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela aplicação do método dos mínimos quadrados ordinários (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005) constatou-se que os métodos analíticos utilizados apresentaram curvas de calibração lineares na faixa de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $450 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o colesterol e de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o 7-cetocolesterol, com coeficientes de determinação (R^2) sempre maiores que 0,990. Pela análise dos perfis dos gráficos de resíduos em função da concentração dos analitos verificou-se que não ocorreram tendências óbvias de desvio da linearidade, bem como a presença de valores dispersos detectados pelo

teste de resíduos padronizados Jackknife (Figura 2.1). A variância foi homogênea ($p > 0,05$), os resíduos da regressão foram independentes ($p > 0,20$) e seguiram distribuição normal ($p > 0,10$) e não foram observados desvios significativos da linearidade ($p > 0,05$) para as duas curvas.

Cardenia et al (2012) também relataram coeficientes de determinação (R^2) variando de 0.966 a 0.999 ao usarem a CG/EM na análise de óxidos de colesterol evidenciando a linearidade obtida com a curva dentro das concentrações testadas.

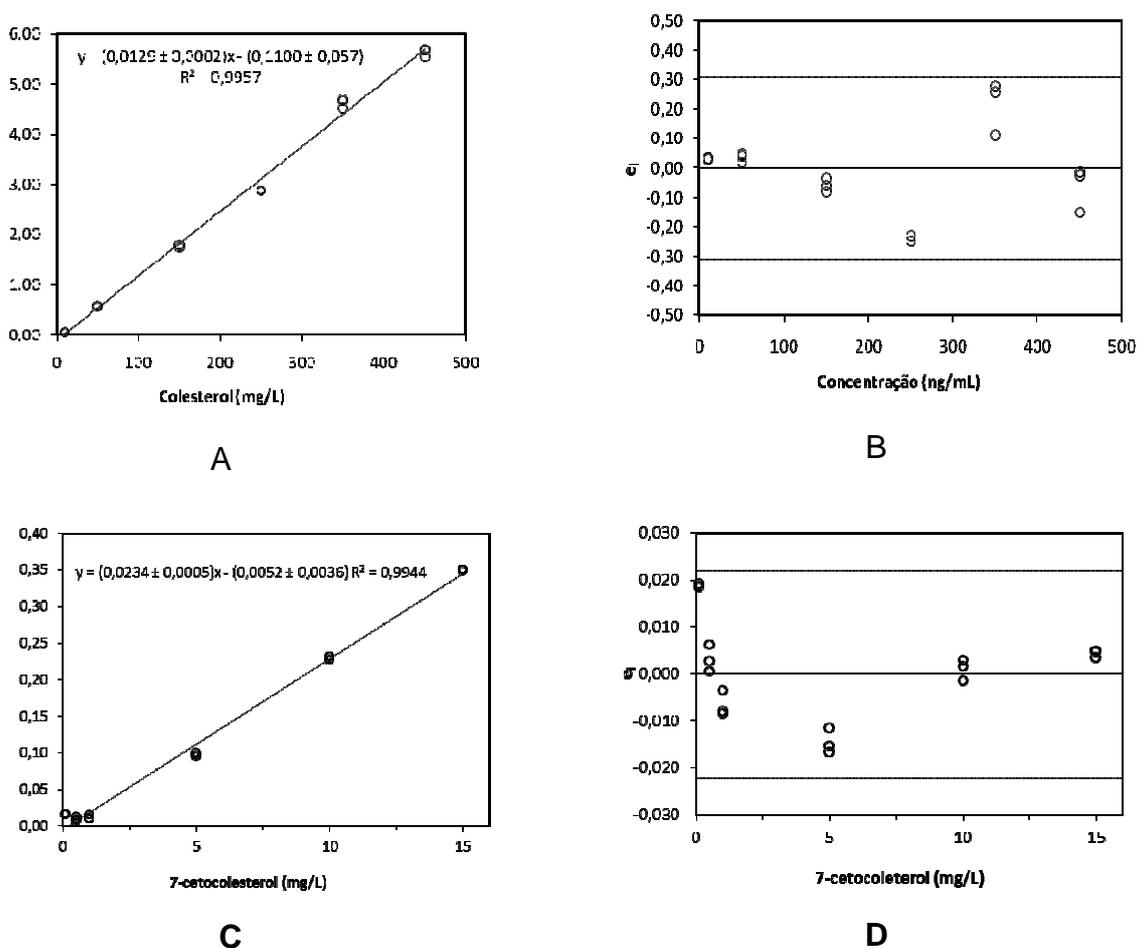


Figura 2.1 Curvas de calibração (A e B) e gráficos de resíduos do colesterol (C) e 7-cetocolesterol (D) utilizados na quantificação das amostras.

Por meio de análise por CG-EM com detecção em modo de íons seletivamente monitorados foram obtidos os cromatogramas dos padrões do 5- α colestano (padrão interno), colesterol e 7-cetocolesterol (anexo A) bem como os

cromatogramas das análises das amostras dos filés de peixe, exemplificados no anexo B.

3.1 AMOSTRAS CRUAS

Os teores de umidade, lipídios totais, colesterol e 7-cetocolesterol dos filés de merluza (*Merluccius hubbsi*) e pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) são apresentados na Tabela 2.1, em base úmida.

Tabela 2.1 Umidade, lipídios totais, colesterol e 7-cetocolesterol (base úmida) em filés crus de merluza (*M. hubbsi*) e de pescada-branca (*C. leiarchus*)

| Analito* | Merluza | Pescada-branca |
|--|----------------------------|----------------------------|
| Umidade (g.100 g ⁻¹) | 81.16 ^a ± 0.95 | 78.25 ^b ± 0.34 |
| Lipídios totais (g.100 g ⁻¹) | 1.99 ^b ± 0,12 | 2.92 ^a ± 0,18 |
| Colesterol (mg.100 g ⁻¹) | 62,71 ^b ± 6,06 | 74,16 ^a ± 3,96 |
| 7-cetocolesterol (µg.100 g ⁻¹) | 0,045 ^a ± 0,009 | 0,050 ^a ± 0,001 |

*Os valores representam a média ± desvio padrão de nove resultados (três lotes analisados em três repetições). Os sobrescritos em letras minúsculas (a, b) diferenciam (p < 0,05) as médias entre os peixes pelo teste de Tukey.

Embora os teores de lipídios de tecidos de peixes variem com a espécie, sexo, origem geográfica, estação e outros fatores ambientais (BECHTEL, 2003; ÖZOGUL et al, 2007), os valores de lipídios encontrados nos filés se encaixam bem dentro da faixa determinada por outros autores para ambas as espécies (MÉNDEZ & GONZALES, 1997; SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2008; SANCHO et al., 2011). Comparando-se os peixes houve diferença significativa (p < 0,05) sendo que na pescada-branca foi encontrado maior teor de lipídio e menor de umidade do que nos filés de merluza. Este resultado é igualmente consistente com o relatado por Waters (1983) e Rebah et al. (2010), que descreveram que a quantidade de lipídios em peixes é inversamente proporcional ao conteúdo de água.

Tal como observado para lipídios totais, o teor de colesterol nos filés de pescada-branca foi significativamente maior (p < 0,05) que o dos filés de merluza (Tabela 2.1). Este achado está de acordo com Osman et al. (2001) que observaram

que em peixes marinhos a tendência para um aumento no lípidio total é seguida por um aumento dos níveis de colesterol.

Os resultados de colesterol em base úmida foram superiores aos valores que constam na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011), que corresponde a 51 mg.100 g⁻¹ de colesterol para filés de merluza crus e 65 mg.100 g⁻¹ de colesterol para pescada-branca. Em outros estudos, os valores de colesterol foram semelhantes ao do presente estudo para a mesma espécie de peixe (MATHEW et al., 1999; SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2010; SANCHO et al., 2011; ZOTOS & VOUZANIDOU, 2012). A variação entre os resultados pode ser atribuída a fatores como região geográfica, estação do ano, maturidade, espécie, sexo, tipo de alimento disponível, condições de criação (OSMAN et al., 2001; RASOARAHONA et al., 2005), além de métodos analíticos (SPIRIC et al., 2010; GEORGIU et al., 2014). MATHEW et al. (1999) sugeriram que a quantidade de colesterol nos tecidos dos peixes parece ser geneticamente determinada, uma vez que a quantidade de colesterol foi constante dentro de uma família, mas variou entre famílias diferentes. As quantidades de colesterol encontradas para a família Sciaenidae foram de 60,20 ± 12,16 mg.100 g⁻¹ (MATHEW et al., 1999), valores semelhantes ao apresentado na Tabela 2.2 para pescada-branca pertencente à mesma família. Pesquisas envolvendo a família Merlucciidae encontraram valores de colesterol variando de acordo com a sazonalidade, como Zotos & Vouzanidou (2012), que relataram variações de 71,91 a 123,70 mg de colesterol em 100 g de *Merluccius merluccius* ao longo do ano.

De acordo com a RDC N^o. 54, de 12 de novembro de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para que um alimento seja considerado com baixo conteúdo de colesterol deverá apresentar um máximo de 20 mg.100 g⁻¹ ou 100 mL em pratos preparados, conforme o caso (ANVISA, 2012). A resolução tem como base as “diretrizes para o uso de declarações nutricionais e saudáveis” publicadas pelo *Codex Alimentarius/WHO/FAO* (CODEX ALIMENTARIUS, 1997). Assim, ambas as espécies estudadas não devem ser consideradas alimentos portadores de baixo teor de colesterol. É importante destacar que, muitas vezes, há um equívoco na generalização de que carnes de peixe são alimentos de baixo teor de colesterol.

Estudos realizados anteriormente demonstraram que o 7-cetocolesterol não está presente em amostras cruas ou aparece em níveis muito baixos (SEÇKIN & METIN, 2005; SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2010). Isso foi confirmado, uma vez que

foram observadas quantidades pequenas de 7-cetocolesterol nos filés crus de merluza e pescada-branca, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles. Todas as amostras analisadas no presente estudo estavam em condições idênticas às consumidas em um estabelecimento de serviço de alimentação e foram armazenadas congeladas por menos de 30 dias antes de serem analisadas. Assim, considerou-se que a oxidação nas amostras cruas foi negligenciável. Saldanha et al. (2008) demonstraram que em sardinhas frescas cruas e descongeladas houve um maior aumento nos níveis de 7-cetocolesterol após o armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, variando de 1,2 a $2,7\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ após 30 dias, atingindo $9,1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ depois de 120 dias de armazenamento.

3.2 MÉTODOS DE COCÇÃO

O tempo e temperatura aplicados nos diferentes métodos de cocção dos filés de peixe e a temperatura interna do produto final estão apresentados na Tabela 2.2.. As condições dos métodos deveram-se à reprodução das formas de cocção de peixes em Unidades de Alimentação e Nutrição e ou à recomendação do fabricante do equipamento.

As pesquisas que englobam a influência dos métodos de cocção na formação de óxidos de colesterol são muito variáveis no que se refere ao tipo de método empregado, bem como nas espécies de peixe estudadas, o que dificultou a comparação quantitativa com os resultados deste estudo. As condições utilizadas para assar os filés em forno elétrico ou combinado (AFE, AFC e GFC) foram mais fortes do que as utilizadas para os outros métodos. Isto resultou em produtos finais com a temperatura interna perto de $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os valores de temperatura interna registrados para as amostras assadas foram mais elevados do que os utilizados por Charley & Geortz (1958) para o salmão assado ($70\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e por Mai et al. (1978), que obtiveram as temperaturas internas finais de $82\text{ }^{\circ}\text{C}$ após a cocção de filés de três espécies de peixe a $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12-15 min. As amostras GRE e MIC foram processadas em tempo mais curto ou à temperatura mais baixa do que o grupo de assados e atingiu a temperatura interna ao redor de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Saldanha & Bragagnolo (2010) também grelharam filés de merluza a $165\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 min e obtiveram uma temperatura interna de $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ no produto final.

Tabela 2.2 Condições de tempo e temperatura utilizadas em diferentes métodos de cocção e temperaturas internas alcançadas pelos filés de merluza (*M. hubbsi*) e pescada-branca (*C. leiarchus*) após o processamento

| Amostras | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Temperatura Interna final (°C) | |
|----------|------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|
| | | | Merluza | Pescada-branca |
| AFE | 200 | 30 | 89 ± 2 ^{abA} | 87 ± 4 ^{abA} |
| AFC | 180 | 25 | 84 ± 2 ^{bcA} | 82 ± 3 ^{bcA} |
| GFC | 220 | 8 | 87 ± 1 ^{abA} | 84 ± 2 ^{bcB} |
| GRE | 180 | 4 | 80 ± 2 ^{cdA} | 77 ± 2 ^{deA} |
| MIC | —* | 15 | 82 ± 1 ^{cA} | 81 ± 2 ^{cdA} |
| ENF | 96 | 18 | 92 ± 1 ^{aA} | 90 ± 1 ^{aA} |
| EFC | 150 | 30 | 77 ± 1 ^{dA} | 74 ± 2 ^{eA} |
| FRI | 180 | 3 | 89 ± 1 ^{abA} | 91 ± 2 ^{aA} |

*820 W e 60 Hz; AFE: assado em forno elétrico; AFC: assado em forno combinado; GFC: grelhado em forno combinado; GRE: grelhado em grill; MIC: aquecido em micro-ondas; ENF: ensopado em fogão; EFC: ensopado em forno combinado; FRI: frito em fritadeira. Os valores de temperaturas internas finais correspondem a médias ± desvio padrão de três resultados. Letras minúsculas sobrescritas (a-e) diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as temperaturas internas médias alcançadas por meio dos diferentes métodos de cocção para o mesmo peixe. Letras maiúsculas sobrescritas (A-B) diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as temperaturas internas médias dos dois peixes obtidos usando o mesmo método de cocção, como determinado pelo teste Tukey.

As condições operacionais utilizadas no presente trabalho para o cozimento de micro-ondas foram mais suaves do que aquelas utilizadas por Weber et al. (2008), que aqueceram os filés de bagre em potência 10 (950 W) por 30 minutos para obter uma temperatura interna de 92 °C no produto final. As amostras ENF e FRI alcançaram a temperatura interna próxima de 90 °C, mas, neste último caso, o tempo de processamento foi o mais curto entre todos os métodos empregados (Tabela 2.2). As condições de fritura foram semelhantes às utilizadas por Mai et al. (1978) para fritar os filés de peixe (190 °C / min 2-4; 85-88 °C). Nas amostras ENF, água fervente foi adicionada para auxiliar no processo de cocção e os extratos residuais foram incorporados às amostras durante a análise. Sancho et al. (2011) processaram almôndegas de filés de pescada-branca por fervura das amostras a 95 °C por 30 min e as amostras alcançaram temperatura interna de 91 °C. No método EFC a superfície do produto foi mantida úmida durante o processamento, pois houve a utilização de vapor. Estas amostras foram processadas em condições mais suaves em comparação aos

demais métodos o que resultou em menor temperatura interna do produto final (Tabela 2.2).

3.3 FORMAÇÃO DE 7-CETOCOLESTEROL

A relação entre os teores de colesterol e de 7-cetocolesterol em merluza (A) e pescada-branca (B) crus e preparados por diferentes métodos de cocção está apresentada na Figura 2.2, em base seca.

Os níveis de colesterol nas amostras cozidas foram significativamente ($p < 0,05$) mais baixos do que nas amostras cruas. Esta redução foi acompanhada por um aumento no teor de 7-cetocolesterol nas amostras cozidas para ambos os peixes. Estes resultados estão em conformidade com outros estudos (SHOZEN et al., 1995; OHSHIMA et al., 1996; CANDELA et al., 1997; ECHARTE et al., 2001; Al-SAGHIR et al., 2004; SALDANHA et al., 2008, SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2008, e STEPHEN et al., 2010) em peixes processados por diferentes métodos.

Os filés de merluza tiveram teores mais baixos de lipídios totais e colesterol (Tabela 2.2), mas teores mais altos de 7-cetocolesterol do que os filés de pescada-branca nas amostras submetidas à cocção (Figura 2.2). Sabe-se que a oxidação do colesterol ocorre como um sistema dependente de vários fatores, que inclui as características do alimento em si, tais como o conteúdo de água, o pH, a concentração, as formas físicas e químicas de colesterol, tipo de ácido graxo presente, teor de antioxidantes ou pró-oxidantes, bem como, a interação entre os componentes e os produtos de degradação durante o processamento e armazenamento (SHOZEN et al., 1995, OHSHIMA et al., 1996; CARDENIA et al., 2013). De acordo com Ansorena et al. (2013), a matriz de alimentos e sua composição química são fatores-chave para a oxidação do colesterol, especialmente o grau de insaturação da fração lipídica. Outro fator importante refere-se à presença do ferro nos tecidos musculares, tanto na forma heme quanto não-heme. Ambas as formas (sendo o ferro não-heme sob a forma de ferro livre) possuem atividades pró-oxidantes e contribuem para a iniciação da oxidação lipídica (ORLIEN et al., 2000). Durante a cocção a desnaturação de proteínas leva à liberação de ferro cataliticamente ativo a partir de metaloproteínas. O ferro iônico desempenha um papel importante na oxidação por catalisar a degradação por hidroperóxidos, os subprodutos primários de oxidação lipídica (HUR et al., 2007)

Foram observados coeficientes de correlação de Pearson negativos e significativos ($p < 0,001$) entre os teores de colesterol e 7-cetocolesterol para ambos os peixe, merluza e pescada-branca (Figura 2.2).

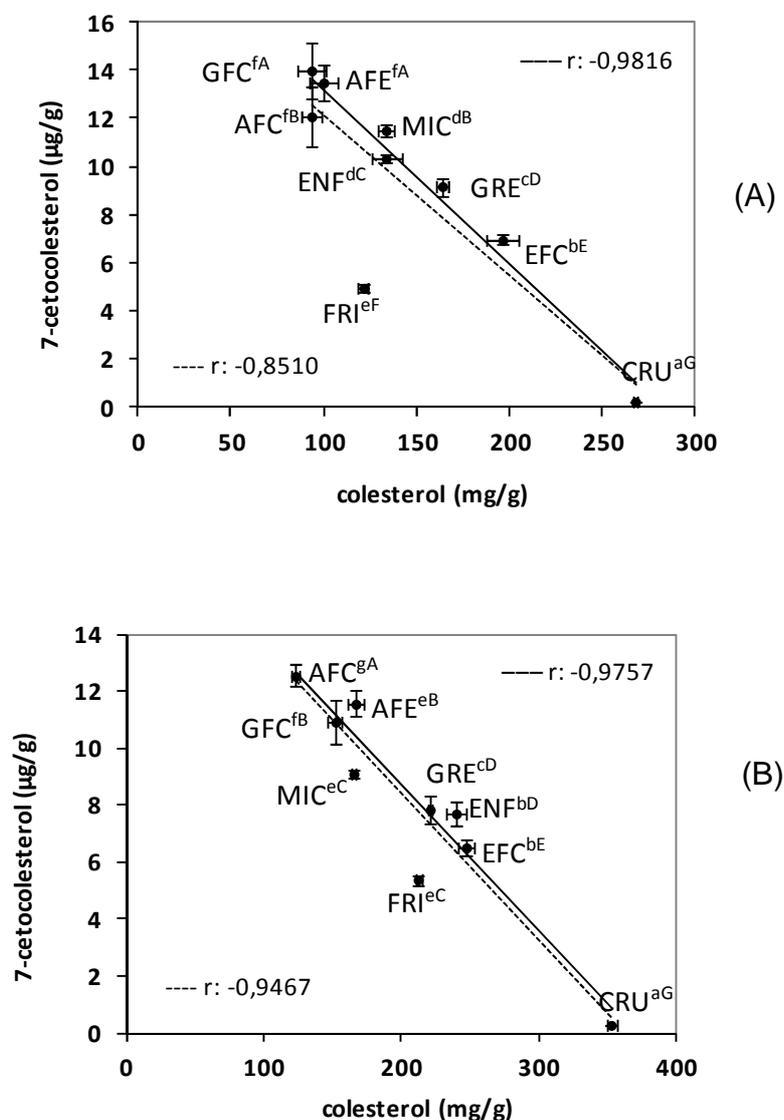


Figura 2.2 Correlação entre os conteúdos (base seca) de colesterol e 7-cetocolesterol em diferentes métodos de cocção empregados para filés de merluza (A) e de pescada-branca (B).

CRU (peixe cru); GRE (peixe grelhado); AFE (peixe assado em forno elétrico); MIC (peixe cozido em forno micro-ondas); ENF (peixe ensopado em fogão convencional); GFC (peixe grelhado em forno combinado); EFC (peixe ensopado em forno combinado); AFC (peixe assado em forno combinado). Média \pm desvio padrão ($n = 9$) discriminados pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05. O expoente em letras minúsculas (a-g) diferencia os os tratamentos no mesmo peixe no que diz respeito ao teor de colesterol. O expoente em letras maiúsculas (A-G) diferencia os tratamentos no mesmo peixe no que diz respeito ao teor de 7-cetocolesterol; ---- Análise de correlação incluindo amostras FRI; r: coeficiente de correlação produto-momento de Person.

Com exceção das amostras submetidas ao tratamento FRI, os dados demonstraram que a redução do teor de colesterol das demais amostras submetidas à cocção pode ser diretamente relacionada ao processo oxidativo, tal como indicado pelo aumento linear do nível de 7-cetocolesterol associado ao declínio dos teores de colesterol. Saldanha et al. (2008) também encontraram uma correlação negativa ($r \leq -0,84$) entre os valores de colesterol e a quantidade de óxidos de colesterol em sardinhas assadas ou armazenadas por 120 dias. Correlações entre teor de colesterol e formação de óxidos de colesterol durante o cozimento e armazenamento de filés de merluza foram observadas por Saldanha & Bragagnolo (2008). No entanto, o 7-cetocolesterol não foi detectado nas amostras grelhadas e armazenadas, mas os produtos 19-OH e 25-OH foram os óxidos proeminentes em todas as amostras. No presente trabalho, confirmou-se o papel de 7-cetocolesterol como um marcador de oxidação do colesterol nas amostras aquecidas (Rodriguez-Estrada et al., 2014), uma vez que este óxido pôde ser quantificado em todos os filés preparados, mostrando uma tendência significativa ($p < 0,01$) de aumento em seu teor, seguido pela diminuição do teor de colesterol.

No presente trabalho, os teores de 7-cetocolesterol nas amostras em base úmida variaram de $1,88 \mu\text{g. g}^{-1}$ a $3,52 \mu\text{g. g}^{-1}$ de filé nas amostras processadas de merluza e de $1,75 \mu\text{g. g}^{-1}$ a $3,79 \mu\text{g. g}^{-1}$ de filé nas amostras de pescada-branca. Portanto, verificou-se que as duas espécies apresentaram a mesma tendência à oxidação.

3.4 AMOSTRAS APÓS FRITURA

Os filés FRI apresentaram menor quantidade de 7-cetocolesterol do que a esperada para a redução do colesterol, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos em ambos os peixes. A inclusão ou não das amostras FRI no cálculo dos coeficientes de correlação de Pearson implicou em uma variação de $r = -0,8510$ para $r = -0,9816$ para merluza e de $r = -0,9467$ para $r = -0,9757$ para pescada-branca (Figura 2.2). Estes resultados podem ser explicados por fatores concomitantes. Em primeiro lugar, o curto tempo de exposição ao tratamento térmico em que o peixe foi submetido durante a fritura não permitiu que a temperatura interna ficasse muito elevada, conforme demonstrado na Tabela 2.2.

De acordo com Sánchez-Muniz et al (1992), em alimentos com alto teor de água, tais como filés de peixe, a temperatura do óleo de fritura tem pouca influência sobre o dano térmico nos alimentos. A temperatura no interior dos alimentos não se eleva acima de 100 °C devido à evaporação da água. Além disso, o alimento não inicia a absorção do óleo de fritura até que a maior parte da água nele contida seja evaporada.

Saguy & Dana (2003) relataram que o aumento no teor de lipídios no peixe frito deve-se à penetração do óleo em uma rede uniforme, semelhante a uma esponja que se forma após a evaporação parcial da água no final do processo de fritura. Assim, o óleo quente atua sobre o alimento por um tempo muito curto, como apontam Stephen et al. (2010).

Outro fator relacionado às mudanças significativas no teor de colesterol diz respeito às trocas que ocorrem entre os lipídios presentes nos peixes e o óleo de fritura. Durante a fritura, a eluição de colesterol para o meio de fritura ocorre, conforme relatado por Candela et al. (1997) e Wu & Lillard (1998). Além disso, as amostras fritas normalmente absorvem óleo no fim da fritura, o que levaria a uma diluição do teor de colesterol. Sánchez-Muniz et al. (1992) observaram que o teor de colesterol de sardinhas diminuiu significativamente após a fritura, principalmente devido à absorção do óleo de fritura. Deve-se considerar também a presença de tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais, que são antioxidantes importantes. Os antioxidantes favorecem a eliminação de radicais livres que são produzidos durante o aquecimento e que estão associados a processos de oxidação lipídica. Os antioxidantes presentes em óleos vegetais também possuem a propriedade de evitar a oxidação do colesterol e simultaneamente reduzir a produção de óxidos de colesterol durante o aquecimento (XU et al., 2005).

Os resultados para as amostras fritas estão de acordo com os valores de Al-Shagir et al. (2004) que observaram quantidades elevadas de óxidos de colesterol após a fritura de filés de salmão, mas não com os resultados de Simon et al. (2012), que não encontraram nenhum efeito sobre a oxidação do colesterol proporcionado pela fritura de camarão pitu, uma vez que não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos conteúdos de 7-cetocolesterol e colestanoetriol entre as amostras cruas e fritas. No entanto, Echarte et al. (2001) observaram também que o teor de colesterol nas amostras fritas foi menor do que nos filés de salmão cru. Da mesma forma, a diminuição no teor de colesterol foi observada por Mai et al. (1978) em filés de truta do lago, otário branco e *bluegill* fritos em frigideira e sob imersão. Estes métodos

causaram uma redução significativa ($p < 0,05$) no teor de colesterol de todas as espécies estudadas, atribuída à eluição do colesterol para o óleo de fritura.

3.5 AMOSTRAS ASSADAS

Os métodos AFE, AFC e GFC provocaram reduções significativas do teor de colesterol ($p < 0,05$), associado a um aumento, também significativo ($p < 0,05$) nos valores de 7-cetocolesterol em relação às amostras cruas, apesar das diferenças dentro deste grupo de tratamentos observadas entre os peixes (Figura 2.2). Conforme já demonstrado anteriormente, estes métodos tiveram tempo e temperatura de processamento mais elevados assim como a temperatura interna final maior (Tabela 2.2). Isto pode explicar o maior nível de 7-cetocolesterol e menor teor de colesterol encontrado neste grupo de tratamentos. Estudos anteriores de Mai et al. (1978) indicaram que as condições de temperatura e tempo de cozimento são fatores importantes que podem afetar a composição final dos alimentos processados, incluindo a oxidação de compostos. A avaliação do efeito do processamento térmico na formação de óxidos de colesterol em alimentos sugere que o binômio tempo-temperatura é um fator preponderante para o processamento dos filés, apresentando influência direta na taxa de oxidação (PIE et al., 1991; MORGAN et al., 1992; KESAVARAO et al., 1996). De acordo com Tai et al. (1999), a combinação de temperatura elevada, disponibilidade de oxigênio e de ácidos graxos poli-insaturados é especialmente determinante na formação de óxidos de colesterol em alimentos. Xu et al. (2005) constataram que a perda de colesterol por meio de aquecimento é extremamente rápida quando a temperatura é superior a 175 °C. De acordo com Osada et al. (1993b), o tempo de aquecimento também desempenha importante papel na formação de óxidos de colesterol.

O efeito de um forno convencional de cozimento no teor de colesterol em filés de peixe-gato foi examinado por Wu & Lillard (1998), mas estes autores relataram que a concentração de colesterol aumentou quando os filés foram cozidos (teores em base úmida), possivelmente devido à perda de água. Por outro lado, Echarte et al. (2001), analisaram óxidos de colesterol em salmão assados a 200 °C durante 30 minutos e também observaram redução do teor de colesterol, sendo o 7-cetocolesterol um dos óxidos mais importantes detectados em todas as amostras, resultados apresentados em base úmida.

3.6 AMOSTRAS GRELHADAS

Embora as amostras GRE tenham sido processadas à mesma temperatura das amostras assadas, o tempo de processamento utilizado para grelhar foi muito mais curto. Isto resultou em temperaturas internas inferiores para o grupo GRE (Tabela 2.2) e menor teor de 7-cetocolesterol do que o observado para o grupo de assados (Figura 2.2). Vários estudos têm relatado as formações de produtos da oxidação do colesterol em peixes grelhados com detecção de 7-cetocolesterol (SHOZEN et al, 1995; ECHARTE et al, 2005; SALDANHA et al, 2008; SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2010). Ohshima et al. (1996) sugeriram que o mecanismo de oxidação de colesterol durante a grelhagem de peixes ocorre com a formação de peróxidos, principalmente a partir de ácidos graxos poli-insaturados presentes nos triacilgliceróis. Estes peróxidos são decompostos termicamente e atacam a molécula de colesterol gerando seus óxidos. Saldanha & Bragagnolo (2010) demonstraram que, quando os filés de merluza foram grelhados, o teor de colesterol reduziu de $249 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ para $214 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ enquanto os níveis totais de óxidos aumentaram de $8,79 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a $19,35 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra.

3.7 AMOSTRAS ENSOPADAS

As amostras submetidas ao tratamento ENF apresentaram altas temperaturas internas (Tabela 2.2). No entanto, embora a redução no teor de colesterol e a quantidade de 7-cetocolesterol detectada nestas amostras tenha sido significativa ($p < 0,05$), foram menores do que as amostras assadas e grelhadas. Sancho et al. (2011) cozinharam almôndegas de pescada-branca em água fervente e não detectaram nenhuma alteração dos teores de colesterol e de óxidos de colesterol indicando que o tratamento térmico não influenciou significativamente ($p > 0,05$) a oxidação do colesterol nas amostras cozidas em água. Por outro lado, Moura e Tenuta-Filho (2002) constataram que tanto o conteúdo de colesterol quanto de 7-cetocolesterol reduziram após a cocção de camarão-rosa em água. Esta redução foi relacionada à eluição destes compostos para o meio de cocção durante a fervura. No entanto, no presente trabalho, a água adicionada no processo de cocção das amostras ENF não foi descartada, sendo a água residual incluída quando as amostras foram trituradas. Obara et al. (2006) relataram que a água influencia significativamente os processos de

oxidação de lipídios em produtos alimentares, mas o seu papel em tais processos pode ser o de estimular ou inibir as reações de oxidação. De acordo com Smith et al. (2002), a água pode promover a oxidação lipídica por meio de redução da viscosidade e facilitar o movimento das moléculas ou pode inibir, reduzindo a difusão do oxigênio para os locais de oxidação. Deste modo, apesar da temperatura interna das amostras ENF terem sido altas, a água adicionada para cozinhar pode ter exercido algum efeito protetor reduzindo o processo de oxidação de colesterol nas amostras, possivelmente, reduzindo a disponibilidade de oxigênio.

3.8 AMOSTRAS PROCESSADAS POR MICRO-ONDAS

Em relação ao tratamento MIC, o teor de 7-cetocolesterol no filé de pescada-branca foi menor do que o esperado para a redução observada do teor de colesterol como ocorreu para as amostras de merluza (Figura 2.2). Embora a diminuição da quantidade de colesterol tenha sido comparável entre os peixes (cerca de 2 vezes em relação às amostras cruas), as quantidades de 7-cetocolesterol nas duas espécies foram bastante diferentes após o aquecimento. O conteúdo de 7-cetocolesterol aumentou cerca de 60 vezes na merluza, ao passo que um aumento de 38 vezes foi observado em pescada-branca. Isto pode ser atribuído tanto à degradação de 7-cetocolesterol quanto à formação de outros compostos dependentes da espécie. É sabido que outros produtos de oxidação de colesterol estão presentes em sistemas alimentares, além do 7-cetocolesterol (OHSHIMA et al, 1996; TAI et al, 1999). Além disso, a degradação térmica do colesterol conduz, não só à formação de óxido, mas também à formação de outros produtos de maior ou menor massa molar, tais como polímeros e produtos voláteis (PARK & ADDIS, 1986; CHIEN et al., 1998). O 7-cetocolesterol sofre degradação térmica, no entanto, tem sido utilizado como um marcador de oxidação do colesterol, pois é formado de forma rápida e contínua (RODRIGUEZ-ESTRADA et al., 1997). Especialmente em peixes e outros alimentos marinhos, 7-cetocolesterol tem sido considerado o produto mais comum da oxidação do colesterol (RODRÍGUEZ-CARPENA et al, 2012; RODRIGUEZ-ESTRADA et al, 2014).

No processamento de alimentos por micro-ondas o alimento absorve a energia liberada pelo equipamento e, internamente, a converte em calor por interações com partículas carregadas e moléculas polares (BUDD & HILL, 2011). As ondas

penetram o alimento que absorve a energia, assim, menos energia fica disponível para penetrar. Portanto, a absorção de energia e a distribuição da temperatura durante o aquecimento por micro-ondas não é uniforme, resultando em pontos quentes e frios do produto aquecido (VADIVAMBAL & JAYAS, 2010; LIU et al, 2014). O desempenho do aquecimento é afetado por propriedades dielétricas, geometria e disposição dos produtos alimentícios no equipamento (BHATTACHARYA & BASAK, 2006). A capacidade de aquecimento de um produto alimentar quando exposto a micro-ondas é dependente de sua constante dielétrica e fator de perda dielétrica, que corresponde ao limite do material para converter energia eletromagnética em energia térmica (TAHER & FARID, 2001). O tempo de cocção diminui com o aumento do teor de lipídios da mesma forma que a constante dielétrica e o fator de perda dielétrica diminuem com o aumento do teor de lipídios (CHANDRASEKARAN et al., 2013). Assim, as diferenças observadas entre os tecidos dos peixes, como demonstrado nos teores de lipídios totais e de umidade para os filés crus (Tabela 2.1), explicam o comportamento específico para cada espécie após o processamento por micro-ondas. No entanto, em ambos os peixes, a redução do colesterol e a formação de 7-cetocolesterol ocorreu em um menor grau, em oposição ao cozimento em forno convencional ou forno combinado (Figura 2.2).

A literatura disponível sobre o efeito do processamento de micro-ondas em lipídios e oxidação de colesterol em peixes ainda é escassa, e os efeitos relatados variam consideravelmente. Wu & Lillard (1998) examinaram o impacto do aquecimento por micro-ondas, sobre o conteúdo de colesterol em filés de bagre e encontraram alterações significativas nas concentrações de colesterol após o aquecimento. Weber et al. (2008) avaliaram a influência do aquecimento por micro-ondas e outros métodos de cocção na composição e oxidação de ácidos graxos dos filés de jundiá e relataram um aumento significativo nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas amostras processadas. No entanto, o cozimento em forno de micro-ondas não afetou a composição de ácidos graxos dos filés de jundiá. Uma correlação positiva entre os valores de TBARS e conteúdo total de óxidos de colesterol ($r=0,718$, $p < 0,01$) foi observada por Zanardi et al. (2009) em carne de porco irradiada.

De acordo com Ansorena et al. (2013), a matriz de alimentos e sua composição química são fatores chave para a oxidação do colesterol, especialmente o grau de insaturação da fração lipídica. Türkkan et al. (2008) determinaram a influência do micro-ondas na composição de ácidos graxos de robalo e descobriram que as

perdas de ácidos graxos ômega 3 foram maiores do que nas amostras de peixe preparadas por outros métodos de cocção. Stephen et al. (2010) observaram que o teor de ácidos graxos monoinsaturados aumentou em atum aquecido com o aumento do tempo de processamento, enquanto que teores de ácidos graxos poli-insaturados reduziram ligeiramente com o aumento da duração do aquecimento por micro-ondas. Por outro lado, Larsen et al. (2010) ao preparar salmão por aquecimento em micro-ondas e outras técnicas comuns de consumo observou que o perfil de ácidos graxos apresentou apenas pequenas diferenças entre os métodos de cocção.

3.9 AMOSTRAS PROCESSADAS NO FORNO COMBINADO

No presente trabalho foram estudadas a influência de três condições de ajuste de métodos de cocção nos níveis de colesterol e 7-cetocolesterol dos dois peixes processados no forno combinado (Tabela 2.2). Duas condições envolveram a cocção com umidade gerada por 50% de saturação de vapor e diferentes temperaturas (AFC e EFC), e a outra no modo convecção, a alta temperatura e curto tempo, simulando a grelhagem (GFC).

A utilização do forno combinado tornou-se ampla em todos os serviços de alimentação comerciais ou institucionais devido ao fato de permitir a aplicação de diferentes métodos de cocção (cozinhar, fritar, assar, grelhar) com ou sem aplicação de vapor. O uso do forno combinado gera economia de energia e de tempo de preparo. Os produtos alimentícios cozidos desta forma são caracterizados pela sua capacidade de manter um alto valor nutritivo e propriedades sensoriais atraentes (DANOWSKA-OZIEWICZ et al., 2007). No entanto, não existem publicações na literatura sobre a utilização de fornos combinados e seus efeitos sobre a oxidação do colesterol em peixes e há escassez de informação sobre a qualidade dos produtos finais, sendo os dados limitados e contraditórios (BARBANTI & PASQUINI, 2005; MORA et al., 2011). De acordo com Murphy et al. (2001), a cocção por forno combinado envolve a transferência simultânea de calor e massa em um processo complexo. O calor é transferido a partir do ar quente para o produto. A umidade é absorvida pelo produto em alta condição de umidade durante o processo de cocção ou a umidade é evaporada do produto em condições de baixa umidade. Durante a cocção, o fluxo de calor varia com o tempo de processamento, bem como as propriedades térmicas e físicas do produto, que se alteram com a temperatura e teor de umidade (BOWERS et al., 2012),

aumentando a complexidade para avaliação dos fenômenos envolvidos no processo. Como demonstrado anteriormente, as condições utilizadas nos tratamentos AFC e GFC resultaram em elevadas temperaturas internas dos produtos finais (Tabela 2.2) e grandes efeitos sobre a oxidação do colesterol avaliados pelo conteúdo de 7-cetocolesterol das amostras (Figura 2.2), independentemente do uso de vapor em AFC ou menor tempo de preparo em GFC. A temperatura aplicada no método em GFC foi muito superior à utilizada para o AFC; no entanto, o vapor quente provoca a liberação de uma grande quantidade de calor latente quando há condensação na superfície da amostra, como demonstrado por Vittadini et al. (2005) em carne de porco cozida. Isto provoca um aumento da quantidade de calor disponível dentro do forno e pode resultar num aumento rápido da temperatura nas amostras, como relatado por Murphy et al. (2001) em peito de frango. Já nas amostras do método EFC, as condições de cocção simularam o cozimento em água, mantendo a superfície do produto úmido e desfavorecendo o desenvolvimento de crosta na superfície da amostra. Além disso, a menor temperatura de ajuste usada no tratamento EFC gerou temperaturas internas médias dos produtos finais de 7 °C a 8 °C mais baixas do que a temperatura média das amostras assadas (Tabela 2.2). Gradientes de temperatura diferentes nas amostras podem ter um impacto importante sobre a velocidade e o grau de alterações nos seus componentes (VITTADINI et al., 2005). Estes resultados explicariam os menores teores de 7-cetocolesterol formados nas amostras do EFC, em comparação aos demais tratamentos. Embora tenha havido uma redução do teor de colesterol e um aumento do teor de 7-cetocolesterol livres nestas amostras em comparação aos filés CRU, o EFC foi o tratamento que resultou em menor diminuição dos teores de colesterol e menores teores do óxido 7-cetocolesterol dentre todos os filés tratados.

4 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que os níveis de colesterol em amostras de peixe cozidas foram significativamente menores do que nas amostras cruas, com maior redução nos filés de pescada-branca (65,08 %) e nos filés de merluza (64,92 %) submetidos ao tratamento AFC. As reduções nos teores de colesterol foram acompanhadas por um aumento nos teores de 7-cetocolesterol em todas as amostras processadas para as duas espécies de peixe. As amostras EFC que foram mantidas

em condições mais suave de tempo e temperatura e com uma superfície de maior umidade, obtiveram menor temperatura interna, pequena redução no teor de colesterol, e um teor relativamente baixo de 7-cetocolesterol em comparação às demais amostras. Por outro lado, as amostras cozidas em fornos elétrico e combinado, com tempos e temperaturas mais altos, apresentaram reduções do teor de colesterol associado a um aumento importante da quantidade de 7-cetocolesterol. Considerando-se a toxicidade dos produtos de oxidação do colesterol, de acordo com os resultados obtidos, destacou-se a necessidade de rever os procedimentos de cozimento para garantir o fornecimento de alimentos mais saudáveis.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) na composição centesimal dos filés crus de merluza e pescada-branca. Menores teores de lipídios, proteínas, Na, K e baixo valor energético foram para os filés de merluza.

A relação Na/K observada foi inferior a 1,0, para as duas espécies de peixe tanto cruas quanto submetidas aos métodos de cocção, situação considerada ideal sob o ponto de vista nutricional.

Os métodos de cocção influenciaram na composição centesimal, sendo que o teor de lipídios foi menor para o MIC nos filés de merluza e para o EFC nos filés de pescada-branca.

O método FRI apresentou maior teor lipídico fato atribuído à absorção de óleo do meio de cocção.

Em termos proteicos, os métodos de cocção aos quais as duas espécies foram submetidas não causaram reduções significativas, portanto todas as preparações foram consideradas de alto conteúdo proteico.

O método ENF foi o que propiciou um menor valor energético, tanto para merluza como para a pescada-branca.

Pelos resultados obtidos, em termos nutricionais, não foi adequado apontar um único método como o melhor. Porém, devido ao maior teor lipídico, maior valor calórico e menor teor proteico apresentado pelos filés fritos, a fritura foi considerada como sendo a forma de preparo menos recomendada.

Os níveis de colesterol em amostras de peixe cozidas foram marcadamente menores do que nas amostras cruas. Essa redução foi acompanhada por um aumento

no teor de 7-cetocolesterol nas amostras cozidas para as duas espécies de peixe, indicando a oxidação do colesterol.

As amostras EFC foram mantidas em condições mais brandas de tempo e temperatura e com uma superfície mais úmida, resultando assim, em menor temperatura interna, pequena redução no teor de colesterol, e um teor relativamente baixo de 7-cetocolesterol em comparação às demais amostras. Portanto, o método EFC foi o melhor dentre os demais métodos estudados, em relação à oxidação do colesterol não levando também a alterações indesejáveis na composição centesimal.

Para as amostras cozidas em fornos elétrico e combinado com maior tempo e temperaturas mais elevadas, observou-se reduções do teor de colesterol associadas a um aumento importante da quantidade de 7-cetocolesterol.

Considerando-se a toxicidade dos produtos de oxidação do colesterol, os resultados do presente trabalho constatou-se a necessidade de rever os procedimentos de cozimento das espécies de peixe estudadas e também de outras espécies para propiciar o fornecimento de alimentos mais saudáveis.

SUGESTÕES

Estudos envolvendo a aplicação de tempos e temperaturas mais brandas nos serviços de alimentação que mantenham as mesmas características sensoriais de aceitação dos peixes e menor probabilidade de oxidação.

Desenvolver estudos envolvendo o uso de antioxidantes associados aos métodos de cocção dos peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABABOUC, L. *Fisheries and Aquaculture topics. Composition of fish. Topics Fact Sheets*. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome: FAO; 2005
Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/topic/12318/en>. Acesso em 20 out. 2012.
- ABERC (Associação Brasileira de Empresas de Refeições Coletivas). *Mercado Real*.
Disponível em <http://www.aberc.com.br/mercadoreal.asp?IDMenu=21>. Acesso em 04 ab. 2013.
- ABREU, E. S.; SPINELLI, M. G. N.; ZANARDI, A. M. P. *Gestão de unidades de alimentação e nutrição: um modo de fazer*. 3.ed. São Paulo: Metha, 2009. 384 p.
- ACKMAN, R. Fatty acids. In: _____. *Marine biogenic lipids, fats and oils*. Boca Raton: CRC Press, 1989, p. 103 - 137.
- AGREN, J. J.; HALLIKAINEN, M.; VIDGREN, H.; MIETTINEN, T. A.; GYLLING, H. Postprandial lipemic response and lipoprotein composition in subjects with low or high cholesterol absorption efficiency. *Clin. Chim. Acta.*, v. 366, p. 309-315, 2006.
- AKUTSU, R. C.; BOTELHO, R. A.; CAMARGO, E. B.; SÁVIO, K. E. O.; ARAÚJO, W. C. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. *Rev. Nutr.*, v. 18, p. 669-680, 2005.
- ALEXANDROV, P.; CUI, J. G.; ZHAO, Y.; LUKIW, W. J. 24S-hydroxycholesterol induces inflammatory gene expression in primary human neural cells. *Neuroreport*, v. 16, p. 909–913, 2005.
- AI-SAGHIR, S.; THURNER, K.; WAGNER, K-H; FRISCH, G.; LUF, W.; RAZZAZI-FAZELI, E.; ELMADFA, I. Effects of Different Cooking Procedures on Lipid Quality and Cholesterol Oxidation of Farmed Salmon Fish (*Salmo salar*). *J. Agricult. Food Chem.*, v. 52, p. 5290-5296, 2004.
- AMARAL, C. A. A.; JUNQUEIRA, R. G.; COUTRIM, M. X.; FREITAS, M. T. *Frequência de utilização e métodos de cocção de peixes preparados em unidades de alimentação e nutrição*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO

- COLETIVA I, 2009, Porto Alegre. Resumos...Porto Alegre: Federação Nacional dos Nutricionistas, 2009. p. 38.
- ANSORENA, D.; BARRIUSO, B.; CARDENIA, V.; ASTIASARÁN, I.; LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. Thermo-oxidation of cholesterol: Effect of the unsaturation degree of the lipid matrix. *Food Chem.*, v. 141, p. 2757–2764, 2013.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official methods of analysis*, 19 ed., Gaithersburg: AOAC International, 2012.
- ARAÚJO, W. M. C.; MONTEBELLO, N. M.; BOTELHO, R. B. A.; BORGIO, L. A. *Alquimia dos Alimentos*. Brasília: Editora Senac, 2007. 557p.
- BADAWI, H. K. Sodium and potassium in the edible portions of thirty fish species. *Mar. Biol.*, v.12, p. 151-153, 1972.
- BADIANI, A.; STIPAB, S.; BITOSSI, F.; GATTAA, P. P.; VIGNOLAC, G.; CHIZZOLINI, R. Lipid composition, retention and oxidation in fresh and completely trimmed beef muscles as affected by common culinary practices. *Meat Sci.*, v. 60, p. 169-186, 2002.
- BAGGIO, S.R.; VICENTE, E.; BRAGAGNOLO, N. Cholesterol oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid composition in turkey meat. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5981-5986, 2002.
- BARBANTI, D.; PASQUINI, M. Influence of cooking conditions on cooking loss and tenderness of raw and marinated chicken breast meat. *LWT - Food Sci. Technol.*, v. 38, p. 895–901, 2005.
- BASSEY, F. I.; OGUNTUNDE, F. C.; IWEGBUE, C. M. A.; OSABOR, V. N.; EDEM, C. A. Effects of processing on the proximate and metal contents in three fish species from Nigerian coastal waters. *Food Sci. Nutr.*, v. 2, p. 272–281, 2014.
- BECHTEL, P. J. Properties of different fish processing by-products from pollock, cod and salmon. *J. Food Process. Preserv.*, v. 27, p. 101 – 116, 2003.

- BERGMANN, M. L. A.; BERGMANN, G. G.; HALPERN, R.; RECH, R. R.; CONSTANZI, C. B.; ALLI, L. R. Associated factors to total cholesterol: school based study in southern Brazil. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 97, p. 17-25, 2011.
- BHATTACHARYA, M.; BASAK, T. On the analysis of microwave power and heating characteristics for food processing: Asymptotes and resonances. *Food Res. Int.*, v. 39, p. 1046-1057, 2006.
- BIASI, F. Evidence of cell damage induced by major components of a diet compatible mixture of oxysterols in human colon cancer CaCo-2 cell line. *Biochimie*, v. 95, p. 632-640, 2013.
- BIGGERSTAFF, K. D.; WOOTEN, J. S. Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. *Adv. Physiol. Educ.*, v. 28, p. 105-106, 2004.
- BJÖRKHEM, I. Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. *J. Lipid. Res.*, v. 33, p. 455-471, 1992.
- BJÖRKHEM, I.; EGGERTSEN, G. Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 12, p. 97-103, 2001.
- BÖSINGER, S.; LUF, W.; BRANDL, E. Oxysterols: Their Occurrence and Biological Effects. *Int. Dairy J.*, v.3, p. 1-33, 1993.
- BOWERS L. J.; DIKEMAN M. E.; MURRAY, L.; STRODA, S. L. Cooked yields, color, tenderness, and sensory traits of beef roasts cooked in an oven with steam generation versus a commercial convection oven to different endpoint temperatures. *Meat Sci.*, v. 92, p. 97–106, 2012.
- BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 60, p. 53-57, 2001.
- BRASIL. ANVISA. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução – RDC nº 40, de 21 de março de 2001. Regulamento técnico para rotulagem nutricional de alimentos e bebidas embaladas. Brasília, 2001.

- BRASIL. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC 54 de 12 de novembro de 2012: dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. Brasília: 2012, 18 p.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2010. 129 p.
- BROWN, A. J.; JESSUP, W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 142, p.1-28, 1998.
- BROWN, A. J.; JESSUP, W. Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol. Aspects Med.*, v. 30, p. 111-122, 2009.
- BUDD, C. J.; HILL, A. D. C. A comparison of models and methods for simulating the microwave heating of moist foodstuffs. *Int. J. Heat Mass. Tran.*, v. 54, p. 807-817, 2011.
- CABONI, M. F.; BOSELLI, E.; MESSIA, M. C.; VELAZCO, V.; FRATIANNI, A.; PANFILLI, G.; MARCONI, E. Effect of processing and storage on the chemical quality markers of spray-dried whole egg. *Food Chem.*, v. 92, p. 293–303, 2005.
- CANDELA, M.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Effects of frying and warmholding on fatty acids and cholesterol of sole (*Solea solea*), codfish (*Gadus morrhua*) and hake (*Merluccius merluccius*). *Food Chem.*, v. 58, p. 227-231, 1997.
- CARDENIA, V.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; BOSELLI, E.; LERCKER, G. Cholesterol photosensitized oxidation in food and biological systems. *Biochimie*, v. 95, p. 473-481, 2013.
- CARREIRA, R.; WAGENER, A. L. R.; FILEMAN, T.; READMAN, J. W. Distribuição de coprostanol (5 β (H)-coleston-3 β -ol) em Sedimentos Superficiais da Baía de Guanabara: Indicador da poluição recente por Esgotos domésticos. *Quím. Nova*, v. 24, p. 37-42, 2001.
- CARRERO, J. J.; MARTÍN-BAUTISTA, E.; BARÓ, L.; FONOLLÁ, J.; JIMÉNEZ, J.; BOZA, J. J.; LÓPEZ-HUERTAS, E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos

- omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutr. Hosp.*, v. 20, p. 63-69, 2005.
- CATERINA, R. n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 364; p. 2439-2450, 2011.
- ÇENGEL, Y. A.; BOLES, M. A. *Termodinâmica*. 3ª. Ed. Lisboa: Editora McGraw-Hill, 2001. 900 p.
- CERTÍK, M.; ANDRÁSI, P.; SAJBIDOR, J. Effect of Extraction Methods on Lipid Yield and Fatty Acid Composition of Lipid Classes Containing γ -Linolenic Acid Extracted from Fungi. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 73, p. 357-365, 1996.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. H.; FERRIER, D. R. *Bioquímica ilustrada*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 544 p.
- CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, S.; BASAK, T. Microwave food processing - A review. *Food Res. Int.*, v. 52, p. 243-261, 2013.
- CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, S.; BASAK, T. Microwave Material Processing—A Review. *AIChE Journal*, v. 58, p. 330-363, 2012.
- CHEN, B. H.; CHEN, Y. C. Evaluation of analysis of cholesterol oxides by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, v. 661, p. 127-136, 1994.
- CHEN, J. S.; YEN, G. C. Cholesterol oxidation products in small sun-dried fish. *Food Chem.*, v. 50, p.167-170, 1994.
- CHEN, Y. C.; CHIEN, J. T.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Formation and Inhibition of Cholesterol Oxidation Products during Marinating of Pig Feet. *J. Agric.Food Chem.*, v. 60, p. 173-179, 2012.
- CHENG, Y. W.; KANG, J. J.; SHIH, Y. L.; LO, Y. L.; WANG, C.F. Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. *Food Chem. Toxicol.*, v. 43, p. 617-622, 2005.
- CHIEN, J. T.; WANG, H. C., CHEN, B. H. Kinetic model of the cholesterol oxidation during heating. . *J. Agric. Food Chem.*, v.46, p. 2572-2577, 1998.

- CHURCH, S. M. EuroFIR Synthesis report No. 7: food composition explained. *Nutr. Bull.*, v. 34, p. 250-272, 2009.
- CODEX ALIMENTARIUS (WHO/FAO) *Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables* (CAC/GL 23). 1997. 9 p.
- CONCHILLO, A.; ANSORENA, D.; ASTIASARA, I. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *J. Sci. Food Agric.*, v. 85, p. 141–146, 2005.
- CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 71, p. 171-175, 2000.
- COOK, R.P.; MACDOUGALL, J.D. Experimental atherosclerosis in rabbits after feeding cholestanetriol. *Br. J. Exp. Pathol.*; v. 49, p. 265-271, 1968.
- CORDEIRO, Livia Gebara Muraro Serrate. *Esteróis como marcadores moleculares da contaminação fecal no sistema estuarino Iguaçu-Sarapuí, noroeste da Baía de Guanabara (RJ)*. 2006. 170 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Departamento de Química, Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- CUSHING, S. D.; BERLINER, J. A.; VALENTE, A. J.; TERRITO, M. C.; NAVAB, M.; PARHAMI, F.; GERRITY, R.; SCHWARTZ, C. J.; FOGELMAN, A. M. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein-1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 87, p. 5134–5138, 1990.
- DANOWSKA-OZIEWICZ, M.; KARPIŃSKA-TYMOSZCZYK, M.; BOROWSKI, J. The effect of cooking in a steam-convection oven on the quality of selected dishes. *J. Foodserv.*, v. 18, p.187–197, 2007.
- DEREWIAKA, D. & OBIEDZIŃSKI, M. Cholesterol oxides content in selected animal products determined by GC-MS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v. 112, p. 1130–1137, 2010.

- DIN, J. N.; NEWBY, D. E.; FLANPAN, A. D. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *Br. Med. J.*, v. 328, p. 30-35, 2004.
- DOMENE, S. M. A. *Técnica Dietética: teoria e aplicações*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011. 260 p.
- DYER, A. R.; ELLIOTT, P.; SHIPLEY, M. Urinary electrolyte excretion in 24 hours and blood pressure in the INTERSALT Study. II. Estimates of electrolyte-blood pressure associations corrected for regression dilution bias. The INTERSALT Cooperative Research Group. *Am. J. Epidemiol.*, v. 139, p. 940–951, 1994.
- ECHARTE, M.; CONCHILLO, A.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Óxidos de colesterol en langostinos frescos y congelados, crudos y a La Plancha. *Nutr. Hosp.*, v. 20, p. 293-296, 2005.
- ECHARTE, M.; ZULET M. A.; ASTIASARAN, I. Oxidation Process Affecting Fatty Acids and Cholesterol in Fried and Roasted Salmon. *J. Agricult. Food Chem.*, v. 49, p. 5662-5667, 2001.
- EDER, E. B.; LEWIS, M. N. Proximate composition and energetic value of demersal and pelagic prey species from the SW Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 291, p. 43–52, 2005.
- EGAN, M. B.; FRAGODT, A.; RAATS, M. M.; HODGKINS, C.; LUMBERS, M. The importance of harmonizing food composition data across Europe. *Eur. J. Clin. Nut.*, v. 6, p. 813-821, 2007.
- ERKAN, N., ÖZDEN, O. SELÇUK, A. Effect of frying, grilling and steaming on aminoacid composition of marine fishes. *J. Med Food.*, v. 13, 2010.
- ERSOY B., ÖZEREN A. The effect of cooking methods on mineral and vitamin contents of African catfish. *Food Chem.*, v. 115, p. 419–422, 2009.
- ERSOY, B. Effects of cooking methods on the proximate, mineral and fatty acid composition of European eel (*Anguilla anguilla*). *Int. J. Food Sci. Tech.*, v. 46, p. 522–527, 2011.

- ESCOTT-STUMP, S.; MAHAN, K. L.; RAYMOND, J. L. *Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia*, 13 ed. 2013. Elsevier. 1256 p.
- FABRIS, G.; TUROCZY, N. J.; STAGNITTI, F. Trace metal concentration in edible tissue of snapper, flathead, lobster, and abalone from coastal waters of Victoria, Australia. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v. 63, p. 286-292, 2006.
- FAO (Food and Agricultural Organization). *Food energy - methods of analysis and conversion factors*. Food and Nutrition Paper 77. Report of a workshop. Rome, 2002. Disponível em <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y5022e/y5022e00.pdf>. Acesso em 23 jan. 2014.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Roma, 2012. 231 p.
- FARKAS, A.; SALANKI, J.; SPECZIÁR, A. Age- and size-specific patterns of heavy metals in the organs of freshwater fish *Abramis brama* L. populating a low contaminated site. *Water Res.*, v. 37, p. 959-964, 2003.
- FENTON, M. Chromatographic separation of cholesterol in foods. *J. Chromatogr. A*, v. 624, p. 369-388, 1992.
- FERNANDES, C.; HOECK, E. VAN; SANDRA, P.; LANÇAS, F. M. Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction. *Anal. Chim. Acta*, v. 614, p. 201-217, 2008
- FERREIRA, Juliana de Souza. *Avaliação do coeficiente de partição do colesterol entre duas fases: solução saponificada e hidrocarbonetos*. 2000. 133 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- FERREIRA, M. W.; BRESSAN, M. C.; SOUZA, X. R., VIEIRA J. O.; FARIA, P. B.; ANDRADE, P. L. Efeito dos métodos de cocção sobre a composição química e perfil lipídico de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757). *Ciênc. Agrotecn.*, v. 31, p. 798-803, 2007.

- FEYNMAN, R. P. *Física em 12 Lições- Fáceis e Não Tão Fáceis*. Rio de Janeiro: Ediouro. 1999. 308 p.
- FILHO, A. C. *Peixes: costa brasileira*. 3.ed. São Paulo: Editora Melro, 1999. 283 p.
- FIORITI, J. A. SIMS, R. J. Autoxidation products from cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 44, p. 221-224, 1967.
- FNIC-DRI (Food and Nutrition Information Center - Dietary Reference Intakes). *Report Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)*. Baltimore: National Academy of Sciences. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, p.542-587, 2005.
- FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, v. 226, p. 497-509, 1957.
- GALL, K. L.; OTWELL, W. S.; KOBURGER, J. A.; APPLIEDORF, H. Effects of four cooking methods on the proximate, mineral and fatty acid composition of fish fillets. *J. Food Sci.*, v. 48, p. 1068–1074, 1983.
- GARCÍA-ARIAS, M. T.; ÁLVAREZ PONTES, E.; GARCÍA-LINARES, M. C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Cooking–freezing–reheating (CFR) of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. Effect of different cooking and reheating procedures on the proximate and fatty acid compositions. *Food Chem.*, v. 83, p. 349–356, 2003.
- GELEIJNSE, J. M.; GILTAY, E. J.; GROBBEE, D. E.; DONDEERS, A. R. T.; KOK, F. J. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J. Hypertens.*, v. 20, p.1493–1499, 2002.
- GEORGIU, C. A.; CONSTANTINOU, M. S., KAPNISSI-CHRISTODOULOU, C. P. Sample preparation: A critical step in the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chem.*, v. 145, p. 918–926, 2014.
- GOKOGLU, N.; YERLIKAYA, P.; TOPUZ, O. K.; BUYUKBENLI, H. A. Effects of Plant Extracts on Lipid Oxidation in Fish Croquette during Frozen Storage. *Food Sci. Biotechnol.*, v. 21, p. 1641-1645, 2012.

- GOKOGLU, N., YERLIKAYA, P., CENGIZ, E. Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chem.*, v. 84, p. 19-22, 2004.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P. B.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxic.*, v. 34, p. 193-211, 1996.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; GRAU, A.; JORDÁN, A.; BOATELLA, J. Oxysterol formation in spray-dried egg processed and storage under various conditions: prevention and relationship with other quality parameters. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 229-2243, 1997.
- GUARDIOLA, J.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Formación de derivados oxidados del colesterol em alimentos. *Grasas Aceites*, v. 46, p. 202-212, 1995.
- GÜNER, S.; DINCER, B.; ALEMDAG, N.; COLAK, A.; TÜFEKCI, M. Proximate Composition and Selected mineral content of Commercially Important Fish Species from the Black Sea. *J. Sci. Food Agric.*, v. 78, p. 337-342, 1998.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. *Antioxidants in nutrition, health, and disease*. New York: Oxford University Press, 1994. 160p.
- HAARD, N. F. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Res. Int.*, v. 25, p. 289-307, 1992.
- HARRISON, G. G. Fostering data quality in food composition databases: applications and implication for public health. *J. Food Compos. Anal.*, v. 17, p. 259-265. 2004.
- HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Effect of modest salt reduction on blood pressure. *J Hum. Hypertens.*, v.16, p. 761-770, 2002.
- HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Potassium intake and blood pressure. *Am. J. Hypertens.*, v. 12, p. 849–851,1999.
- HEE-KIM, J.; JANG, S. J.; YONG-JU, K. Formation of cholesterol oxides in saury (*Cololabis seira*) during pan frying, deep fat frying, and microwave cooking. *Food Sci. Biotechnol.*, v.9, p. 48-51, 2000.

- HEVERIN, M.; DICZFALUSY, U.; PARINI, P.; FEINSTEIN, E.; BJÖRKHEM, I.; MEANEY, S.; BRAFMAN, A.; SHAFIR, M.; OLIN, M.; SHAFATI, M.; VON BAHR, S.; LARSSON, L.; LÖVGREN-SANDBLOM, A. Studies on the cholesterol-free mouse: strong activation of LXR-regulated hepatic genes when replacing cholesterol with desmosterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 27, p. 2191–2197, 2007.
- HOLMES, R. P.; YOSS, N. L. 25-Hydroxysterols increase the permeability of liposomes to Ca²⁺ and other cations. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 770, p.15-21, 1984.
- HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the live. *J. Clin. Invest.*, v. 109, p. 1125-1131, 2002.
- HOSSEINI, H. Effect of different cooking methods on minerals, vitamins and nutritional quality indices of kutum roach (*Rutilus frisii kutum*). *Food Chem.*, v. 148, p. 86–89, 2014.
- HUR, S. J.; NAM, K. C.; MIN, B.; DU, M.; SEO, K. I.; AHN, D.U. Effects of Dietary Cholesterol and Its Oxidation Products on Pathological Lesions and Cholesterol and Lipid Oxidation in the Rabbit Liver. *BioMed. Res. Int.*, p.1-7, 2014.
- HUR, S. J., PARK, G. B., JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPS) in animal products. *Food Control.*, v.18, p. 939-947, 2007.
- HUSS, H. H. Quality and quality changes on fresh fish. In: FAO Fisheries Technical paper - 348. Rome: FAO, 1995. 203 p.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *POF 2008/09 mostra desigualdades e transformações no orçamento das famílias brasileiras*. 2010. Disponível em <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=1648>. Acesso em 04 abr. 2013.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Analytical Chemistry Division Commission on Analytical Nomenclature. *Pure Appl. Chem.*, v. 64, p. 819, 1993.

- JAMES, C. S. *Analytical chemistry of foods*. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 178 p.
- JAVITT, N. B. 25R, 26-hydroxycholesterol revisited: synthesis, metabolism, and biologic roles. *J. Lipid Res.*, v. 43, p. 665–670, 2002.
- JAVITT, N. B. Oxysteroids: a new class of steroids with autocrine and paracrine functions. *Trends Endocrinol. Metab.*, v. 15, p. 393–397, 2004.
- JING, K; WU, T.; LIM, K. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* v. 13, p. 1162-1177, 2013.
- JOVINGE, S.; OVINGE, S.; ARES, M. P. S.; KALLIN, B.; NILSSON, J. Human monocytes/macrophages release TNF- α in response to Ox-LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.*, v. 16, p. 1573–1579, 1996.
- JUSAKUL, A.; YONGVANIT, P.; LOILOME, W.; NAMWAT, N.; KUPER, R. Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids Health Dis.*, v.10, p. 1-8, 2011.
- KAWAKAMI, S. K.; MONTONE, R. C. An efficient ethanol-based analytical protocol to quantify faecal steroids in marine sediments. *J. Brazil Chem. Soc.*, v. 13, p. 226-232, 2002.
- KEMMO, S.; OLLILAINEN, V.; LAMPI, A-M.; PIIRONEN, V. Determination of stigmasterol and cholesterol oxides using atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Chem.*, v. 101, p. 1438–1445, 2007.
- KESAVA-RAO, V.; KOWALE, B. N.; BABU, N. P.; BISHT, G. S. Effect of cooking and storage on lipid oxidation and development of cholesterol oxidation products in water buffalo meat. *Meat Sci.*, v. 43, p. 179-185, 1996.
- KHITOUNI I. K; ABDELMOULEH, A.; BOUAIN, A.; MIHOUBI N. B. Variations of the chemical composition of five coastal catch fish species of the Gulf of Gabes (Tunisia). *Cybiurn*, v. 34, n. 2, p. 175-183, 2010.
- KIM, S.; SANDLER, D. P.; GALANKO, J.; MARTIN, C.; SANDLER, R. S. Intake of Polyunsaturated Fatty Acids and Distal Large Bowel Cancer Risk in Whites and African Americans. *Am. J. Epidemiol.*, v. 171, p. 969–979, 2010.

- KIM, S. K.; NAWAR, W. W. Oxidative Interactions of Cholesterol with Triacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.12, p. 931 – 934, 1991.
- KLAG, M. L.; FORD, D. E; MEAD, L. A.; HE, J.; WHELTON, P. K; LIANG, K-Y.; LEVINE, D. M. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 328, p. 313-318, 1993.
- KOŁAKOWSKA, A., OLLEY, J., DUNSTAN, G. *Fish lipids*. In: Z.E. SIKORSKI, A. KOŁAKOWSKA (Eds.), Chemical and functional properties of food lipids, NW:CRC Press, 2003, p. 221-264.
- KOUBAA, A.; MIHOUBI, N. B.; ABDELMOULEH, A.; BOUAIN, A. Comparison of the effects of four cooking methods on fatty acid profiles and nutritional composition of red mullet (*Mullus barbatus*) muscle. *Food Sci. Biotechnol.*, v. 21, p. 1243-1250, 2012.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. American Heart Association. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, v. 106, p. 2747-2757, 2002.
- KROKIDA, M. K.; OREOPOULOU, V.; MAROULIS, Z. B. Water loss and oil uptake as a function of frying time. *J. Food Eng.*, v. 44, p. 39–46, 2000.
- KÜÇÜKGÜLMEZ, A.; ÇELİK, M.; ERSOY, B.; YANAR, Y.; SANGÜN, L. Seasonal variations in proximate and fatty acid compositions of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and lizardfish (*Saurida undosquamis*), from the northeastern mediterranean sea. *J. Muscle Foods*, v. 19, p. 352–361, 2008.
- KUVER R. Mechanisms of oxysterol-induced disease: insights from the biliary system. *Clin Lipidol.*, v. 7, p. 537–548, 2012.
- KWITEROVICH, P. O. The effect of dietary fat, antioxidants, and pro-oxidants on blood lipids, lipoproteins, and atherosclerosis. *J. Am. Diet. Assoc.*, v. 97, p. 31-43, 1997.
- LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. *Atividades nacionais sobre composição de alimentos no Brasil, 1995–1997*. In Simposio FAO/SLAN/LATINFOODS sobre Composición de

- Alimentos. XI Congresso da Sociedad Latinoamericana de Nutrición. SLAN 97, Guatemala. 1997.
- LARSEN, D.; QUEK S. Y.; EYRES, L. Effect of cooking method on the fatty acid profile of New Zealand King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Food Chem.*, v. 119, p. 785–790, 2010.
- LARSSON, D. A.; BAIRD, S.; NYHALAH, J. D.; YUAN, X. M.; LI, W. Oxysterols mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects. *Free Radical Biol. Med.*, v. 41, p. 902–910, 2006.
- LEAF A. Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Cardiovasc. Med.*, v. 8, p. S27-29, 2007.
- LEBOVICS V.; LUGASI, A.; HOVARI, J.; AUBOURG, S. P. Partial inhibition of cholesterol oxides formation in frozen fish pre-treated with a plant extract. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v. 44, p. 342–348, 2009.
- LEE, H. W.; CHIEN, J. T; CHEN, B. H. Inhibition of cholesterol oxidation in marinated foods as affected by antioxidants during heating. *Food Chem.*, v. 108 p. 234–244, 2008.
- LEE, H.S.; CHANG, J. S.; BAEK J. A.; CHUNG, M. Y.; LEE, H. C.; RHIM, B. Y.; SOK, D. E.; RHO, M-C.; KIM Y. K.; KIM, K. TNF- α activates death pathway in human aorta smooth muscle cell in the presence of 7-ketocholesterol. *Biochemic. Biophys. Res. Commun.*, v. 333, p. 1093-1099, 2005.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Oxidized products of cholesterol: Dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J. Nutr. Biochem.*, v. 13, p. 700-719, 2002.
- LI, S. C. X.; CHERIAN, G.; AHN, D. U.; HARDIN, R. T.; SIM, J. S. Storage, heating and tocopherols affect cholesterol oxides formation in food oils. *J. Agric. Food Chem.*, v. 44, p. 3830-3834, 1996.

- 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*. 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G.; MILLER, A. B. Plasma 7beta-hydroxycholesterol as a possible predictor of lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 11, p. 1630-1637, 2002.
- LIU, S.; YU, X.; FUKUOKA, M.; SAKAI, N. Modeling of fish boiling under microwave irradiation. *J. Food Engin.*, v. 140, p. 9-18, 2014.
- LOMBARDI-BOCCIA, G.; LANZI, S.; AGUZZI, A. Aspects of meat quality: trace elements and B vitamins in raw and cooked meats. *J. Food Comp. Anal.*, v. 18, p. 39-46, 2005.
- LONGO, S. NAKASATO, M.; COSTA, R. P.; LOTTENBERG, A. M.; FISBERG, M.; QUINTÃO, E. Alimentação e ácidos graxos n-3 e n-6. In *Ácidos graxos n-3 e n-6, na prevenção de doenças cardiovasculares*. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 77, p. 287-310, 2001.
- LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 53, p. 595-607, 2009.
- LUTHRA, S.; FARDIN, B.; DONG, J.; HERTZOG, D.; KAMJOO, S.; GEBREMARIAM, S.; BUTANI, V.; NARAYANAN, R.; MUNGCAL, J. K.; KUPPERMANN, B. D.; KENNEY, M. C. Activation of caspase-8 and caspase-12 pathways by 7-ketocholesterol in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 47, p. 5569-75, 2006.
- LÜTJOHANN, D.; BREUER, O.; AHLBORG, G.; NENNESMO, I.; SIDÉN, Å.; DICZFALUSY, U.; BJÖRKHEM, I. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 93, p. 9799–9804, 1996.

- LUZIA, L. A.; SAMPAIO, G. R.; CASTELLUCCI, C. M. N.; TORRES, E. A. F. S. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chem.*, v. 83, 93–97, 2003.
- LYONS, M. A.; BROWN, A. J. Molecules in focus: 7-ketocholesterol. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 31, p. 369-375, 1999.
- MACEDO-VIEGAS, E. M.; SOUZA, M. L. R.; ZUANON, J. A. S.; FARIA, R. H. S. Rendimento e composição centesimal de filés in natura e pré-cozido em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Wallbaum). *Acta Sci.*, v. 24, p. 1191-1195, 2002.
- MAHAFFEY, K. R.; SUNDERLAND, E. M.; CHAN, H. M.; CHOI, A. L.; GRANDJEAN, P.; MARIËN, K.; OKEN, E.; SAKAMOTO, M.; SCHOENY, R.; WEIHE, P.; YAN, C-H.; YASUTAKE, A.. Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. *Nutrition Reviews*, v. 69, p. 493–508, 2011.
- MAHLEY, R. W.; HUANG, Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J. Clin. Invest.*, v. 117, n. 1, p. 94-98, 2007.
- MAI, J.; SHIMP, J; WEIHRAUCH, J.; KINSELLA, E. Lipids of fish fillets: changes following cooking by different methods. *J. Food Sci.*, v. 43, p. 1669-1674, 1978.
- MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 99, n. 2, p.755-761, 2012.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília, 7 jul. 1952. Seção 1, p. 10785.
- MARCHINI, J. S. VITALI, L. H.; JORDÃO JUNIOR, A.; RODRIGUES, M. M. P. Determinação de macronutrientes em alimentos normalmente consumidos pela população brasileira. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 53, p. 11-16, 1993.

- MARIMUTHU, K.; THILAGA, M.; KATHIRESAN, S.; XAVIER, R.; MAS, R. H. M. H. Effect of different cooking methods on proximate and mineral composition of striped snakehead fish (*Channa striatus*, Bloch). *J. Food Sci. Technol.*, v. 49, p. 373–377, 2012.
- MARTINS, César Castro. Avaliação de introdução de esteróides fecais e hidrocarbonetos marcadores geoquímicos em sedimentos da baía do Almirantado, Península Antártica. 2001. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; JESÚS, P. M.; SANTAELLA, M.; ROS, G. The content and nutritional significance of mineral on fish flesh in the presence and absence of bone. *Food Chem.*, v. 71, p. 503-509, 2000.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 360 p.
- MATHEW, S.; AMMU, K.; VISWANATHAN, N. P.G.; DEVADASAN, K. Cholesterol content of Indian fish and shellfish. *Food Chem.*, v. 66, p. 455-461, 1999.
- MAYSER, P.; MROWIETZ, U.; ARENBERGER, P.; BARTAK, P.; BUCHVALD, J.; CHRISTOPHERS, E.; JABLONSKA, S.; SALMHOFER, W.; SCHILL, W. B.; KRÄMER, H. J.; SCHLOTZER, E.; MAYER, K.; SEEGER, W.; GRIMMINGER, F. Omega-3 fatty acid-based lipid infusion in patients with chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 38, p. 539-547, 1998.
- MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Increase of Cholesterol Oxidation and Decrease of PUFA as a Result of Thermal Processing and Storage in Eggs Enriched with n-3 Fatty Acids. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, p. 5028–5034, 2009.
- MCMEANS, B. C.; BORGÅ, K.; BECHTOL, W. R.; HIGGINBOTHAM, D.; FISK, A. T. Essential and non-essential element concentrations in two sleeper shark species collected in arctic waters. *Environ. Pollut.*, v. 148, p. 281-290, 2007.

- MÉNDEZ, E., GONZÁLEZ R. M. Seasonal changes in the chemical and lipid composition of fillets of the Southwest Atlantic hake (*Merluccius hubbsi*). *Food Chem.*, v. 59, p. 213 – 217, 1997.
- MEYNIER, A.; ANDRE, A.; LHERMINIER, J.; GRANDGIRARD, A; DEMAISON, L. Dietary oxysterols induce in vivo toxicity of coronary endothelial and smooth muscle cells. *Eur. J. Nutr.*, v. 44, p. 393–405, 2005.
- MIGUET, C.; MONIER, S.; BETTAIEB, A.; ATHIAS, A.; BESSÉDE, G.; LAUBRIE, A.; LEMAIRE, S.; NÉEL, D.; GAMBERT, P.; LIZARD, G. Ceramide generation occurring during 7 β -hydroxycholesterol- and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. *Cell Death Differ.*, v. 8, p. 83-99. 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Ministério da saúde incentiva consumo regular de peixe*. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agenzia-saude/noticias-anteriores-agenzia-saude/2531>. Acesso em 23 jan. 2013.
- MONIER, S.; NÈGRE-SALVAYRE, A.; BESSÉDE, G.; LEMAIRE-EWING, S.; NÉEL, D.; GAMBERT, P.; LIZARD, G.; SAMADI, M.; PRUNET, C.; DENANCE, M.; LAUBRIET, A.; ATHIAS, A.; BERTHIER, A.; STEINMETZ, E.; JÜRGENS, G. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.303, p. 814-824, 2003.
- MONTGOMERY, D. C. *Introduction to Statistical Quality Control*. Wiley: Nova York. 2013, 749 p.
- MORA, B.; CURTI, E.; VITTADINI, E.; BARBANTI, D. Effect of different air/steam convection cooking methods on turkey breast meat: Physical characterization, water status and sensory properties. *Meat Sci.*, v. 88, p. 489–497, 2011.
- MORAES, F. A.; COTA, A. M.; CAMPOS, F. M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Perdas de vitamina C em hortaliças durante o armazenamento, preparo e distribuição em restaurantes. *Ciênc. Saúde Coletiva*, v. 15, p. 51-62, 2010.

- MORALES-AIZPURÚA, I. C. & TENUTA-FILHO. Oxidation of cholesterol in mayonnaise during storage. *Food Chem.*, v. 89, p. 611–615, 2005.
- MOREL, D. W.; LIN, C. Y. Cellular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. *J. Nutr. Biochem.*, v. 7, p. 495–506, 1996.
- MORGAN, J. N.; ARMSTRONG, D. J. Quantification of cholesterol oxidation in egg yolk powder spray-dried with direct heating. *J. Food Sci.*, v. 57, p. 43-45, 1992.
- MORRIS, R. C.; SCHMIDLIN, O.; FRASSETTO, L. A.; SEBASTIAN, A. Relationship and interaction between sodium and potassium. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 25, p. 262S-270S, 2006.
- MOURA A. F. P.; TENUTA-FILHO, A. Efeito do processamento sobre os níveis de colesterol e 7-cetocolesterol em camarão-rosa. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 22, p. 117-121, 2002.
- MURPHY, R. Y.; JOHNSON, E. R.; DUNCAN, L. K.; CLAUSEN, E. C.; DAVIS, M. D.; MARCH, J. A. Heat Transfer Properties, Moisture Loss, Product Yield, and Soluble Proteins in Chicken Breast Patties During Air Convection Cooking. *Poult. Sci.*, v. 80, p. 508-514, 2001.
- NCEP (National Cholesterol Education Program). *Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adult*. In: Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program. *JAMA*, v. 285, p. 2486-2497, 2001.
- NEEKHRA, A.; LUTHRA, S.; CHWA, M.; SEIGEL, G.; GRAMAJO, A. L.; KUPPERMANN, B. D.; KENNEY, M. C. Caspase-8, -12, and -3 activation by 7-ketocolesterol in retinal neurosensory cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 48, p. 1362-1367, 2007.
- NURY, T.; SAMADI, M.; ZARROUK, A.; RIEDINGER, J. M.; LIZARD, G. Improved synthesis and in vitro evaluation of the cytotoxic profile of oxysterols oxidized at C4 (4 α - and 4 β -hydroxycholesterol) and C7 (7-ketocolesterol, 7 α - and 7 β -hydroxycholesterol) on cells of the central nervous system. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 70, p. 558 – 567, 2013.

- O'CALLAGHAN, Y. C.; WOODS, J. A.; O'BRIEN, N. M. Comparative study of the cytotoxicity and apoptosis-inducing potential of commonly occurring oxysterols. *Cell. Biol. Toxicol.*, v.17, p.127-137, 2001.
- O'DONNELL, M. J.; YUSUF, S.; MENTE, A.; GAO, P.; MANN, J. F.; TEO, K.; MCQUEEN, M.; SLEIGHT, P.; SHARMA, A. M.; DANS, A.; PROBSTFIELD, J.; SCHMIEDER, R. E. Urinary Sodium and Potassium Excretion and Risk of Cardiovascular Events. *JAMA*, v. 306, p. 2229-2238, 2011.
- OBARA, A.; OBIEDZIŃSKI, M.; KOŁCZAK, T. The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray- and freeze-dried egg powders. *Food Chem.*, v. 95, p. 173–179, 2006.
- OETTERER M. *Proteínas do pescado*. Universidade de São Paulo. 2005 Disponível em <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Proteinas%20pescado.pdf>. Acesso em 24 out. 2012.
- OETTERER, M. *Industrialização do pescado cultivado*. Guaíba: Agropecuária, 2002. 200 p.
- OGAWA, M. *Química do pescado: Umidade e Proteína*. In: OGAWA, M.; MAIA, E. L.(Eds), *Manual de Pesca, Ciência e Tecnologia do Pescado*. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1999. v. I, p. 29 - 48.
- OHSHIMA, T.; SHOZEN, K.; USHIO, H.; KOIZUMI, C. Effects of Grilling on Formation of Cholesterol Oxides in Seafood Products Rich in Polyunsaturated Fatty Acids. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v. 29, p. 94–99, 1996.
- OHSHIMA, T.; LI, N.; KOIZUMI C. Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 70, p. 595-600, 1993.
- OHYAMA, Y.; DICZFALUSY, U.; FEINSTEIN, E.; BJÖRKHEM, I.; MEANEY, S.; HEVERIN, M.; EKSTRÖM, L.; BRAFMAN, A.; SHAFIR, M.; ANDERSSON, U.; OLIN, M.; EGGERTSEN, G. Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes. *J. Biol. Chem.*, v. 281, p. 3810-3820, 2006.

- OLIVEIRA, F. R., LIRA, G. M. Óxidos de colesterol em pescado. *B. ceppa*, v. 27, p. 143-152, 2009.
- ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnología de Alimentos – Alimentos de Origen Animal*, Porto Alegre: Artmed, v. 2, 2002. 279 p.
- ORLIEN, V.; HANSEN, E.; SKIBSTED, L. H. Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *Eur Food Res Technol.*, v. 211, p. 99–104, 2000.
- OSADA, K.; KODAMA, T.; CUI, L.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Levels and formation of oxidized cholesterols in processed foods. *J. Agric. Food Chem.*, v.41, p. 1893-1898, 1993a.
- OSADA, K.; KODAMA, T.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Oxidation of cholesterol by heating. *J. Agric. Food Chem.*, v. 41, p. 1198-1202, 1993b.
- OSMAN, H.; SURIAH, A. R.; LAW, E. C. Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malasian waters. *Food Chem.*, v. 73, p. 55-56, 2001.
- OTAEGUI-ARRAZOLA, A.; MENÉNDEZ-CARREÑO, M., ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Oxysterols: A world to explore. *Food Chem. Toxicol.*, v. 48, p. 3289–3303, 2010.
- ÖZOGUL, Y., ÖZOGUL, F., ALAGOZ, S. Fatty acid profiles and fat contents of commercially important seawater and freshwater fish species of Turkey: A comparative study. *Food Chem.*, v. 103, p. 217–223, 2007.
- PALANCA, V.; RODRÍGUEZ, E.; SEÑORÁNS, J.; REGLERO, G. Bases científicas para el desarrollo de productos cárnicos funcionales con actividad biológica combinada. *Nutr. Hosp.*, v. 21, p. 199-202, 2006.
- PANIANGVAIT, P.; KING, A. J.; JONES, A. D.; GERMAN, B. G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.*, v. 60, p. 1159-1174, 1995.
- PARDASANI, D.; MAZUMDER, A.; GUPTA, A. K.; KANAUIA, P. K.; TAK, V.; DUBEY, D. K. Determination of hydrolytic degradation products of nerve agents by injection port fluorination in gas chromatography/mass spectrometry for the verification of the

- Chemical Weapons Convention. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 21, p. 3109–3114, 2007.
- PARK, S. W.; ADDIS, P. B. HPLC Determination of C-7 Oxidized Cholesterol Derivatives in Foods. *J. Food Sci.*, v. 50, p. 1437-1441, 1985.
- PARK, S. W.; ADDIS, P. B. Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *J. Food Sci.*, v. 51, p.1380-1381,1986.
- PASIN, G.; SMITH, G. M.; OMAHONY, M. Rapid determination of total cholesterol in egg yolk using commercial diagnostic cholesterol reagent. *Food Chem.*, v. 61, p. 255-259, 1998.
- PATEL, M. D., THOMPSON, P. D. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis*, v, 186, p.12-19, 2006.
- PEDROSA, L. F. C.; COZZOLINO, S. M. F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. *Ciênc. Tecnol. Alimentos*, v. 21, , p. 154-157, 2001.
- PENAZZI, G.; CABONI, M. F.; ZUNIN, P.; EVANGELISTI, F.; TISCORNIA, E.; TOSCHI, T. G.; LERCKER, G. Routine high performance liquid chromatographic determination of free 7-ketocholesterol in some foods by two different analytical methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 72, p. 1523-1527, 1995.
- PERKINS, E. G. *Analysis of fats, oils and derivatives*. Illinois: Society Champaign, 1993. 664 p.
- PETRÓN, M. J.; GARCÍA-REGUEIRO, J. A.; MARTÍN, L.; MURIEL, E.; ANTEQUERA, T. Identification and Quantification of cholesterol and cholesterol oxidation products in different types of iberian hams. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 5786–5791, 2003.
- PHILIPPI, S. T. *Nutrição e Técnica Dietética*. São Paulo, Manole: 2008. 390 p.
- PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; TOIVO, J. I.; SWANK, M. A.; SIMPKINS, A. H. Free and sterified sterols composition of edible oils and fats. *J. Food Comp. Anal.*, v.15, p. 123-142, 2002.

- PIE, J. E.; SPAHIS, K.; SEILLAN, C. Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.*, v. 39, p. 250-254, 1991.
- PIKULEVA, I. A. Cholesterol-metabolizing cytochromes P450: implications for cholesterol lowering. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, v. 4, p. 1403–1414, 2008.
- POIROT, M., SILVENTE-POIROT, S. Cholesterol-5,6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer. *Biochimie*, v. 95, p. 622 – 631, 2013.
- POLI, G.; SOTTERO, B.; GARGIULO, S.; LEONARDUZZI, G. Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Mol. Aspects Med.*, v. 30, p. 180–189, 2009.
- POLI, G.; BIASI, F.; LEONARDUZZI, G. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biol.*, v. 1, p. 125–130, 2013.
- PROENÇA, R. P. C. *Inovação tecnológica na produção de alimentação coletiva*. Florianópolis: Insular. 3 ed. 2009. 136 p.
- PRUNET, C.; MONTANGE, T.; VEJUX, A.; LAUBRIET, A.; ROHMER, J. F.; RIEDINGER, J. M.; ATHIAS, A.; LEMAIRE-EWING, S.; NEEL, D.; PETIT, J. M.; STEINMETZ, E.; BRENOT, R.; GAMBERT, P.; LIZARD, G. Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytometry A.*, v. 69, p. 359-73, 2006.
- PUWASTIEN, P.; JUDPRASONG, K.; KETWAN, E.; VASANACHITT, K.; NAKNGAMANONG, Y.; BHATTACHARJEE, L. Proximate composition of raw and cooked thai freshwater and marine fish. *J. Food Comp. Anal.*, v. 12, p. 9-16, 1999.
- RADER, D. J.; JAYE, M. Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. *Curr Opin Lipidol.*, v. 11, p. 141-147, 2000.
- RASOARAHONA, J. R. E.; BARNATHAN, G.; BIANCHINI, J-P.; GAYDOU, E. M. Influence of season on the lipid content and fatty acid profiles of three tilapia species (*Oreochromis niloticus*, *O. macrochir* and *Tilapia rendalli*) from Madagascar. *Food Chem.*, v. 91, p. 683–694, 2005.

- RAYNER, K. J.; SUÁREZ, Y.; DÁVALOS, A.; PARATHATH, S.; FITZGERALD, M. L.; TAMEHIRO, N.; FISHER, E. A.; MOORE, K. J.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. MiR-33 Contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*, v. 328, p. 1570-1573, 2010.
- RAZZAZI-FAZELI, E.; KLEINEISEN, S.; LUF, W. Determination of cholesterol oxides in processed food using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Chromatogr. A*, v. 896, p. 321–334, 2000.
- REBAH, F. B.; ABDELMOULEH, A.; KAMMOUN, W.; YEZZA, A. Seasonal variation of lipid content and fatty acid composition of *Sardinella aurita* from the Tunisian coast. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, v. 90, p. 569–573, 2010.
- RHO, M-C.; YOUNG, K. K.; JONG, S. C.; HYUN, S. L.; JIN, A. B.; MI, Y. C.; HAN, C. L.; HWAN, W. L.; BYONG, Y. R.; REIDY, M. A.; KIM, K. 7-Ketocholesterol predisposes human aorta smooth muscle cells to Fas-mediated death. *J. Mol. Cell Cardiol.*, v. 39, p. 823-32. 2005.
- ROBERTS, W. C. Atherosclerosis risk factors are there ten, or is there only one? *Atherosclerosis*, v. 79, p. 1146-1148, 1992.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. *Análise de colesterol em alimentos: perspectiva histórica e tendências atuais*. In: SEMINÁRIO COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE, 1996, Campinas. Anais...Campinas: Centro de química de alimentos e nutrição aplicada, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996. p. 59-64.
- RODRÍGUEZ-CARPENA, J-G.; MORCUENDE, D.; PETRÓN, M. J.; ESTÉVEZ, M. Inhibition of Cholesterol Oxidation Products (COPs) Formation in Emulsified Porcine Patties by Phenolic-Rich Avocado (*Persea americana* Mill.) Extracts. *J. Agr. Food Chem.*, v. 60, p. 2224–2230, 2012.
- RODRÍGUEZ-ESTRADA, M. T.; PENAZZI, G.; CABONI, M. F.; BERTACCO, G.; LERCKER, G. Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburguers. *Meat Sci.*, v. 45, p. 365-75. 1997.

- RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T., GARCIA-LLATAS, G., LAGARD, M. J. 7-Ketocholesterol as marker of cholesterol oxidation in model and food systems: When and how. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, v. 446, p. 792–797, 2014.
- RODRÍGUEZ-ESTRADA, M. T., LERCKER, G.; GARCIA, H. S. Cholesterol oxidation in traditional Mexican dried and deep-fried food products. *J. Food Comp. Anal.*, v. 21, p. 489– 495, 2008.
- ROSA, F.C. *Composição química e métodos de cocção de carcaça de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com ômega-3*. 2003. 131 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Lavras: Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- ROSA, R.; BANDARRA, N. M.; NUNES, M. L. Nutritional quality of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell1822): A positive criterion for the future development of the European production of Siluroidei. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v. 42, p. 342–351, 2007.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature*, v. 362, p. 801–809, 1993.
- ROSS, N., BOTS, M. L., KATAN, M. B. Replacement of Dietary Saturated Fatty Acids by Trans Fatty Acids Lowers Serum HDL Cholesterol and Impairs Endothelial Function in Healthy Men and Women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 21, p. 1233-1237, 2001.
- ROUSSI, S.; GOSSÉ, F.; AOUDE-WERNER, D.; ZHANG, X.; GEOFFROY, P.; MIESCH, M.; MARCHIONI, E.; RAUL, F. Perturbation of polyamine metabolism and its relation to cell death in human colon cancer cells treated by 7 β -hydroxycholesterol and 7 β -hydroxysitosterol. *Int. J. Oncol.*, v. 29, p. 1549–1554, 2006.
- RUIZ-GUTIÉRREZ; V.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J. Chromatogr. A*, v. 885, p. 321–341, 2000.
- RUSSEL, D. W. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 1529, p. 126-135, 2000.

- RYAN, E.; CHOPRA, J.; MCCARTHY, F.; MAGUIRE, A. R.; O'BRIEN, N. M. Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *Br. J. Nutr.*, v. 94, p. 443–451, 2005.
- SAGUY, I. S., DANA D. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. *J. Food Eng.*, v. 56, p. 143–152, 2003.
- SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC Separation and Determination of 12 Cholesterol Oxidation Products in Fish: Comparative Study of RI, UV, and APCI-MS Detectors. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 4107–4113, 2006.
- SALDANHA, T., & BRAGAGNOLO, N. Effects of grilling on cholesterol oxide formation and fatty acids alterations in fish. *Cienc. Tecnol. Alimentos*, v. 30, p. 385-390, 2010.
- SALDANHA, T., BENASSI, M. T., BRAGAGNOLO, N. Fatty acid contents evolution and cholesterol oxides formation in Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) as a result of frozen storage followed by grilling. *LWT - Food Sci. Technol.*, v. 41, p.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, p. 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 Chem.*, v. 106, p. 619–627, 2008.
- SAMPAIO, G. R.; BASTOS, D. H. M.; SOARES, R. A. M.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. F. S. Fatty acids and cholesterol oxidation in salted and dried shrimp. *Food Chem.*, v. 95, p. 344–351, 2006.
- SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J., VIEJO, J. M., MEDINA, R. Deep-Frying of Sardines in Different Culinary Fats. Changes in the Fatty Acid Composition of Sardines and Frying Fats. *J. Agr. Food Chem.*, v. 40, p. 2252-2256, 1992.

- SANCHO, R. A. S.; LIMA, F. A.; COSTA, G. G.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Effect of Annatto Seed and Coriander Leaves as Natural Antioxidants in Fish Meatballs during Frozen Storage. *J. Food Sci.*, v. 76, p. 848 – 845, 2011.
- SANDER, B. D.; SMITH, D. E.; ADDIS, P.B.; PARK, S.W. Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products. *J. Food Sci.*, v. 54, p. 874-879, 1989.
- SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; MAGNONI, C. D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A. M. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 100, p. 1-40, 2013.
- SARAVANAN, P.; DAVIDSON, N. C.; SCHMIDT, E. B.; CALDER, P. C. Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet*, v. 376, p. 540-550, 2010.
- SARGENT, J. R. Fish oils and human diet. *Br. J. Nutr.*, v. 78, p. 5-13, 1997.
- SARTORI, A. G. O.; AMANCIO R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. *Rev. SAN*, v. 19, p. 83-93, 2012.
- SASAZUKI, S. Intake of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids and development of colorectal cancer by subsite: Japan Public Health Center–based prospective study. *Int. J. Cancer*, v. 129, p. 1718–1729, 2011.
- SCHEIBLER, J. ETHUR, E. M.; DAL BOSCO, S. M.; MARCHI, M. I. Quantificação de micronutrientes em vegetais submetidos a diferentes métodos de cocção para doente renal crônico. *ConSci. Saúde*, v. 9, p. 549-555, 2010.
- SCHERR C.; RIBEIRO, J. P. Colesterol e Gorduras em Alimentos Brasileiros: Implicações para a Prevenção da Aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 92, p. 180-185, 2009.
- SCHERR C.; RIBEIRO, J. P. Composição química de alimentos: implicações na prevenção da aterosclerose. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 57, p. 153-157, 2011.

- SCHONNING, C.; LEEMING, R.; STENSTROM, T. A. Faecal contamination of source-separated human urine based on the content of faecal sterols. *Water Res.*, v. 36, p. 1965-1972, 2002.
- SCHROEPFER, G. J. J. Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes. *Physiol. Rev.*, v. 80, p. 361-554, 2000.
- SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B. M. R.; WENNIG, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*, v. 77, p. 1473-1482, 2009.
- SECKIN, A. K.; METIN, M. The effect of process temperature and time on the occurrence of the products of cholesterol oxidation in butter. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v. 40, p. 903–906, 2005.
- SHOZEN, K.; OHSHIMA, T.; USHIO, H.; KOIZUMI, C. Formation of cholesterol oxides in marine fish products induced by grilling. *Fisheries. Sci.*, v. 61, p. 817-821, 1995.
- SIEKMEIER, R.; SCHARNAGL, H.; KOSTNER, G. M.; GRAMMER, T.; STOJAKOVIC, T.; MARZ, W. Lipoprotein(a) – Structure, Epidemiology, Function and Diagnostics of a Cardiovascular Risk Marker. *Open Clin. Chem. J.*, v. 1, p. 79-91, 2008.
- SIERRA, S.; LARA-VILLOSLADA, F.; OLIVARES, M.; JIMÉNEZ, J.; BOZA, J.; XAUS, J. La expresión de IL-10 interviene en la regulación de la respuesta inflamatoria por los ácidos grasos omega 3. *Nutr. Hosp.*, v. 19, p. 376-382, 2004.
- SILVA, J. S.; RUFFATO, S. *Determinação da umidade do café*. In: SILVA, J. S. Secagem e armazenagem do café- tecnologia e custos. Viçosa, MG: Editora Aprenda Fácil, 2000. p. 133-148.
- SILVA, S. M. C. S.; BERNARDES, S. M. *Cardápio: guia prático para a elaboração*. São Paulo: Atheneu, 2001. 195 p.
- SIMON, S. J. G. B.; SANCHO, R. A. S.; LIMA, F. A.; CABRAL, C. C. V. Q.; SOUZA, T. M.; BRAGAGNOLO, N.; LIRA, G. M. Interaction between soybean oil and the lipid fraction of fried pitu prawn. *LWT - Food Sci. Technol.*, v. 48, p. 120-126, 2012.

- SMITH, A. L.; SHIRAZI, H. M.; MULLIGAN, S. R. Water sorption isotherms and enthalpies of water sorption by lysosyme using quartz crystal microbalance/heat conduction calorimeter. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1594, p. 150–159, 2002.
- SMITH, L. L. Cholesterol Autoxidation 1981-1986. *Chem. Phys. Lipids*, v. 44, p. 87-125, 1987.
- SMITH, L.L. Review of progress in sterol oxidation: 1987-1995. *Lipids*, v. 31, p. 453-487, 1996.
- SOARES, L. V. *Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos*. Barueri: Manole, 2006. 337 p.
- SONODA, Daniel Yokoyama. *Demanda por pescados no Brasil entre 2002 e 2003*. 2006. 118 p. Tese (Doutorado em Ciências).– Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- SOTO-RODRÍGUEZ, I.; ALEXANDER-AGUILERA, A.; ZAMUDIO-PEREZ, A.; CAMARA-CONTRERAS, M.; HERNANDEZ-DIAZ, G.; GARCIA, H. S. Alteration of Some Inflammatory Biomarkers by Dietary Oxysterols in Rats. *Inflammation*, v. 35, p. 1302-1307, 2012.
- SOTO-RODRÍGUEZ, I.; CAMPILLO-VELAZQUEZ, P. J.; ALEXANDER-AGUILERA, A.; RODRÍGUEZ-ESTRADA, M. T.; LERCKER, G.; GARCIA, H. S. Biochemical and histopathological effects of dietary oxidized cholesterol in rats. *J. Appl. Toxicol.*, v. 29, p. 715–723, 2009.
- SOTO-RODRÍGUEZ, I.; CAMPILLO-VELÁZQUEZ, P. J.; ORTEGA-MARTÍNEZ, J.; RODRÍGUEZ-ESTRADA, M. T.; LERCKER, G.; GARCIA, H. S. Cholesterol oxidation in traditional Mexican dried and deep-fried food products. *J. Food Comp. Anal.*, v. 21, p. 489 – 495, 2008.
- SOTTERO, B.; GAMBA, P.; GARGIULO, S.; LEONARDUZZI, G.; POLI, G. Cholesterol oxidation products and disease: an emerging topic of interest in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.*, v. 16, p. 685–705, 2009.

- SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chim. Acta.*, v. 552, p. 25–35, 2005.
- SPARKMAN, O. D; PENTON, Z.; KITSON, F. G. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry - A Pratical Guide*. 2.ed. London: Academic Press, 2011. 632 p.
- SPIRIC, A.; TRBOVIC, D.; VRANIC, D.; DJINOVIC, J.; PETRONIJEVIC, R.; MATEKALO-SVERAK, V. Statistical evaluation of fatty acid profile and cholesterol content in fish (common carp) lipids obtained by different sample preparation procedures. *Anal. Chim. Acta*, v. 672, p. 66–71, 2010.
- STAMPFER, M. J.; KRAUSS, R. M.; MA, J.; BLANCHE P. J.; HOLL, L. G.; SACKS, F. M.; HENNEKENS C. H. Prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *JAMA*, v. 276, p. 882–888, 1996.
- STAPRANS, I.; PAN, X. M.; RAPP, J. H.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K. R. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL receptor- and apolipoprotein E- deficient mice. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 20, p. 708–714, 2000.
- STEINBERG, D. Antioxidants and atherosclerosis. *Circulation.*, v. 81, p. 1420-1425, 1991.
- STEINBERG, D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat. Med.*, v. 8, p. 1211–1217, 2002.
- STEINER-ASIEDU, M.; JULSHAMN, K.; LIE O. Effect of Local Processing Methods (Cooking, Frying and Smoking) on Three Fish Species from Ghana: Part I. Proximate Composition, Fatty Acids, Minerals, Trace Elements and Vitamins. *Food Chem.*, v. 40, p. 309-321, 1991.
- STEPHEN, N. M.; SHAKILA, J. R.; JEYASEKARAN, G.; SUKUMAR, D. Effect of different types of heat processing on chemical changes in tuna. *J. Food Sci. Technol.*, v. 47, p. 174–181, 2010.
- STOCKER, R.; KEANEY, J. F. J. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.*, v. 84, p. 1381-1478, 2004.

- STOLL, B. A. Breast cancer and western diet: role of fatty acids and antioxidant vitamins. *Eur. J. Cancer*, v. 34, p.1852-1856, 1998.
- TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos). Núcleo de estudos e pesquisa em alimentação: NEPA-Unicamp, Campinas, 2011.161 p.
- TAHER, B. J.; FARID, M. M. Cyclic microwave thawing of frozen meat: experimental and theoretical investigation. *Chem. Eng. Process.*, v. 40, p. 379–389, 2001.
- TAI, C. Y.; CHEN, Y. C.; CHEN, B. H. Analysis, Formation and Inhibition of Cholesterol Oxidation Products in Foods: An Overview (Part II). *J. Food Drug Anal.*, v. 8, p. 1-15, 2000.
- TAI, C. Y.; CHEN, Y. C.; CHEN, B. H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: an overview (Part I). *J. Food Drug Anal.*, v. 7, p. 243-257, 1999.
- TANNENBAUM, S. R., YOUNG, V. R., ARCHER, M. C. *Vitaminas y minerales*. In: Fennema OR. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia; 1993. p. 537-613.
- TEICHMANN, I. *Tecnología Culinária*. Caxias do Sul: EDUCS, 2000. 364 p.
- TENUTA-FILHO, A.; MORALES-AIZPURÚA, I. C.; MOURA, A. F. P.; KITAHARA, S. E. Óxidos de colesterol em alimentos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 39, p. 2003.
- TERKELTAUB, R.; BANKA, C. L.; SOLAN, J.; SANTORO, D.; BRAND, K.; CURTISS, L. K. Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 14, p. 47-53, 1994.
- THEUNISSEN, J. J. H.; JACKSON, R. L.; KEMPEN, H. J. M.; DEMEL, R. A. Membrane properties of oxysterols. Interfacial orientation, influence on membrane permeability and redistribution between membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 860, p. 66-74, 1986.
- THIES, F.; GARRY, J. M. C.; YAQOUB, P.; RERKASEM, K.; WILLIAMS, J.; SHEARMAN, C. P.; GALLAGHER, P. J.; CALDER, P. C.; GRIMBLE, R.F.

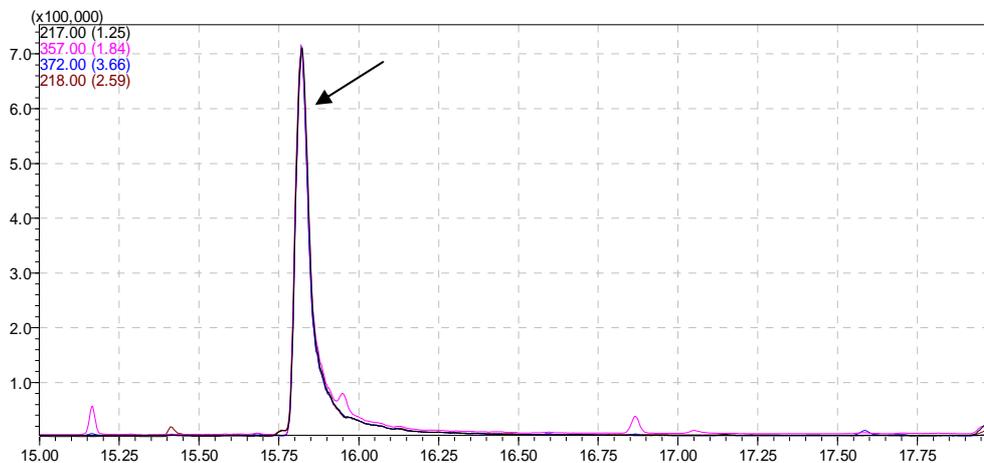
- Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet.*, v. 361, p. 477-485, 2003.
- TSAI, L. S.; HUDSON, C. A. High performance liquid chromatography of oxygenated cholesterols and related compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 58, p. 931-934, 1981.
- TÜRKKAN, A. U. T.; CAKLI, S.; KILINC, B. Effects of cooking methods on the proximate composition and fatty acid composition of seabass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). *Food Bioprod. Process.*, v. 86, p. 163–166, 2008.
- UBHAYASEKERA, S. J. K. A.; JAYASINGHE, P.; EKANAYAKE, S.; DUTTA, P. C. High cholesterol oxidation in pickled mackerel (*Rastrelliger kanagartha*) from Sri Lanka. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v. 114, p. 695–700, 2012.
- UBHAYASEKERA, S. J. K. A.; VERLEYENB, T.; DUTTA, P.C., Evaluation of GC and GC–MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chem.*, v. 84, p. 149–157, 2004.
- ULBERTH, F., REICH, H. Gas chromatographic determination of cholesterol in processed foods. *Food Chem.*, v. 43, p. 387-391, 1992.
- VADIVAMBAL, R. JAYAS, D. S. Non-uniform Temperature Distribution During Microwave Heating of Food Materials—A Review. *Food Bioproc. Tech.*, v. 3, p. 161–171, 2010.
- VERARDO V.; PASINI, F.; IAFELICE, G.; MESSIA, M. C.; MARCONI, E.; CABONI, M.F. Influence of Storage Conditions on Cholesterol Oxidation in Dried Egg Pasta. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, p. 3586–3590, 2010.
- VITTADINI, E.; RINALDI, M.; CHIAVARO, E.; BARBANTI, D.; MASSINI, R. The effect of different convection cooking methods on the instrumental quality and yield of pork *Longissimus dorsi*. *Meat Sci.*, v. 69, p. 749–756, 2005.
- WATERS, M. E. Chemical Composition and Frozen Storage Stability of Weakfish, *Cynoscion regalis*. *Mar. Fish. Rev.*, v. 45, p. 27–33, 1983.
- WEBER, J.; BOCHI, V. C.; RIBEIRO, C. P.; VICTÓRIO, A. D. M.; EMANUELLI, T. Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid

- composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) filets. *Food Chem.*, v. 106, p. 140–146, 2008.
- WHELTON, P. K.; HE, J.; CUTLER, J. A.; BRANCATI, F. L.; APPEL, L. J.; FOLLMANN, D.; KLAG, M. J. Effects of oral potassium on blood pressure. Meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 277, p.1624–1632, 1997.
- WHO (World Health Organization). *Guideline: Sodium intake for adults and children*. Geneva, World Health Organization, 2012. 47 p.
- WHO (World Health Organization). *Forum on reducing salt intake in populations*. 2006. Disponível em http://www.who.int/dietphysicalactivity/Salt_Report_VC_april07.pdf. Acesso em 09 jan. 2013.
- WONG, J., QUINN, C., BROWN, A. Synthesis of the oxysterol, 24 (S), 25-epoxycholesterol, parallels cholesterol production and may protect against cellular accumulation of newly-synthesized cholesterol. *Lipids Health Dis.*, v. 6, 2007.
- WU, J.; HU, R.; YUE, J.; YANG, Z.; ZHANG, L. Determination of fecal sterols by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction and injection port derivatization. *J. Chromatogr. A.*, v. 1216, p.1053-1058, 2009.
- WU, J. & LEE, H. K. Ion-pair dynamic liquid-phase microextraction combined with injection-port derivatization for the determination of long-chain fatty acids in water samples. *J. Chromatogr. A*, v.1133, p. 13–20, 2006.
- WU, W.; LILLARD, D. A. Cholesterol and proximate composition of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) filets – changes following cooking by microwave heating, deep fat frying and oven baking. *J. Food Quality*, v. 21, p. 41-51, 1998.
- XU, G.; SUN, J.; LIANG, Y.; YANG, C.; CHEN, Z-Y. Interaction of fatty acids with oxidation of cholesterol and b-sitosterol. *Food Chem.*, v. 124, p. 162–170, 2011.
- XU, G. Oxidation of Cholesterol and β -Sitosterol and Prevention by Natural Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, p. 9284–9292, 2009.

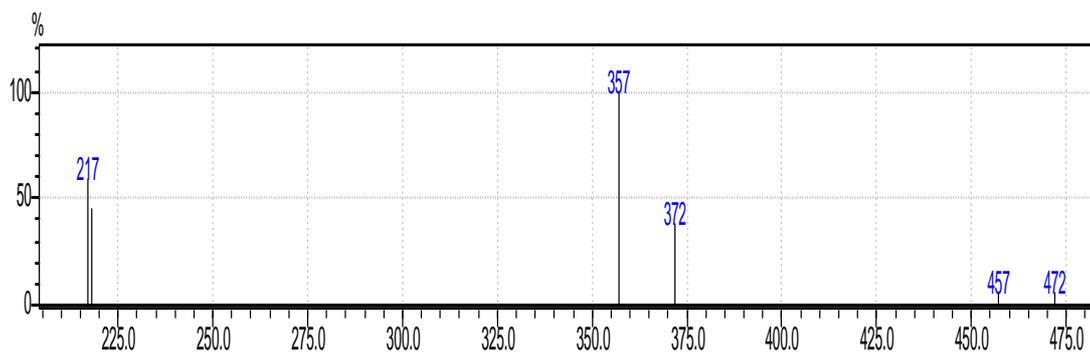
- XU, L.; JIANG, M.; LI, G. Injection port derivatization following sonication-assisted ion-pair liquid-liquid extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Anal. Chim. Acta*, v. 666, p. 45-50, 7 maio 2010.
- XU, Z.; ZHANG, T.; PRINYAWIWATKUL, W.; GODBER, J. S. Capabilities of Different Cooking Oils in Prevention of Cholesterol Oxidation During Heating. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 82, p. 243-248, 2005.
- YAN, P. S.; WHITE, P. J. Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 67, p. 927-931, 1990.
- YEN, T. Y.; INBARAJ, B. S.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Gas chromatography–mass spectrometry determination of conjugated linoleic acids and cholesterol oxides and their stability in a model system. *Anal. Biochem.*, v. 400, p. 130–138, 2010.
- YONAMINE, G. H.; VON ATZINGEN, M. C.; EMIGDIO, M. S.; PINTO E SILVA, M. E. M. Desenvolvimento e análise química de preparações com reduzido teor de sódio, lipídios e colesterol. *Alim. Nutr.*, v.16, p. 137-143, 2005.
- YU, L.; HAMMER, ROBERT, E.; LI-HAWKINS, J.; VON BERGMANN K.; LUTJOHANN, D.; COHEN J. C. HOBBS, H. H. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 99, p.16237-16242, 2002.
- ZOTOS, A.; KOTARAS, A.; MIKRAS, E. Effect of baking of sardine (*Sardina pilchardus*) and frying of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in olive and sunflower oil on their quality. *Food Sci. Technol. Int.*, v. 19, p. 11–23, 2013.
- ZOTOS, A.; VOUZANIDOU, M. Seasonal changes in composition, fatty acid, cholesterol and mineral content of six highly commercial fish species of Greece. *Food Sci. Technol. Int.*, v. 18, p. 139–149, 2012.
- ZUNIN, P., BOGGIA, R., EVANGELISTI, F. Identification and Quantification of cholesterol oxidation products in canned tuna. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 78, p.1037-1040, 2001.

ANEXO A

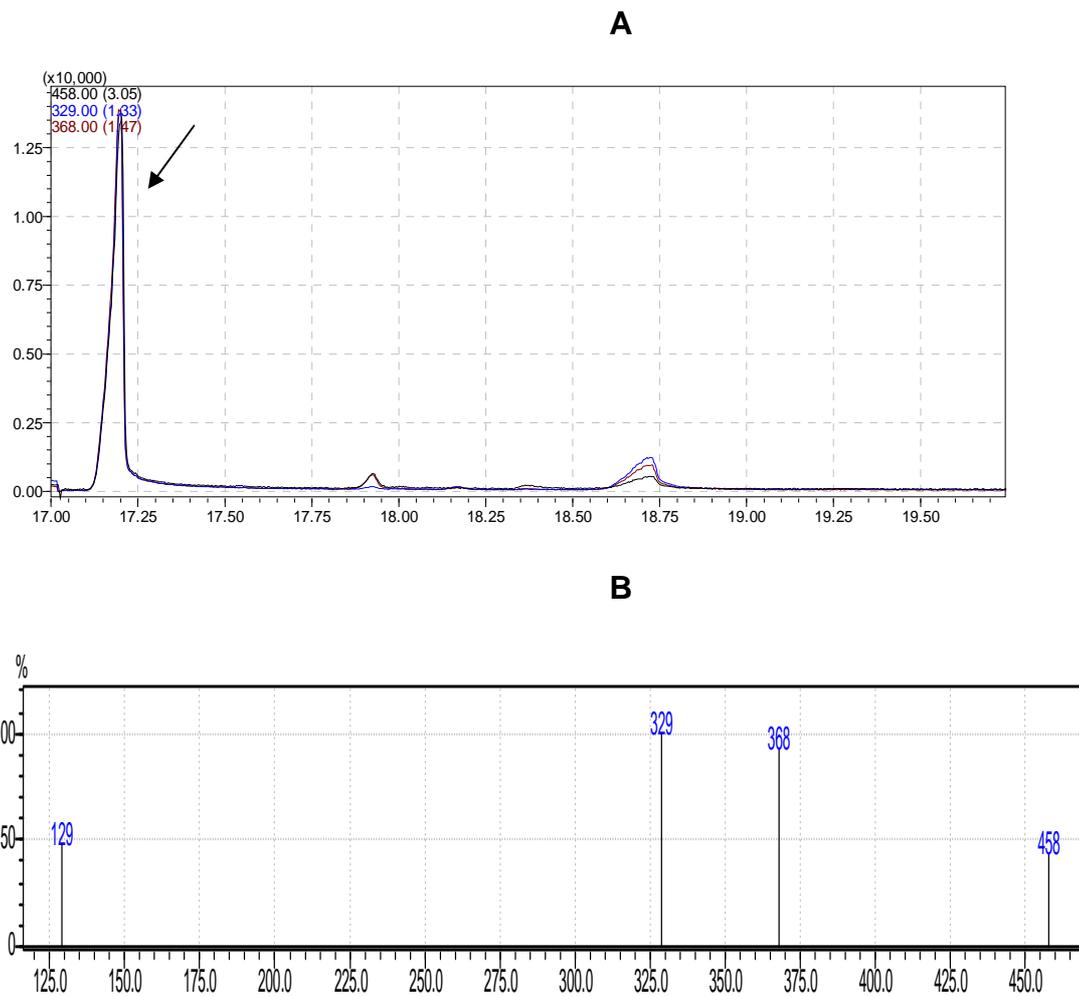
A



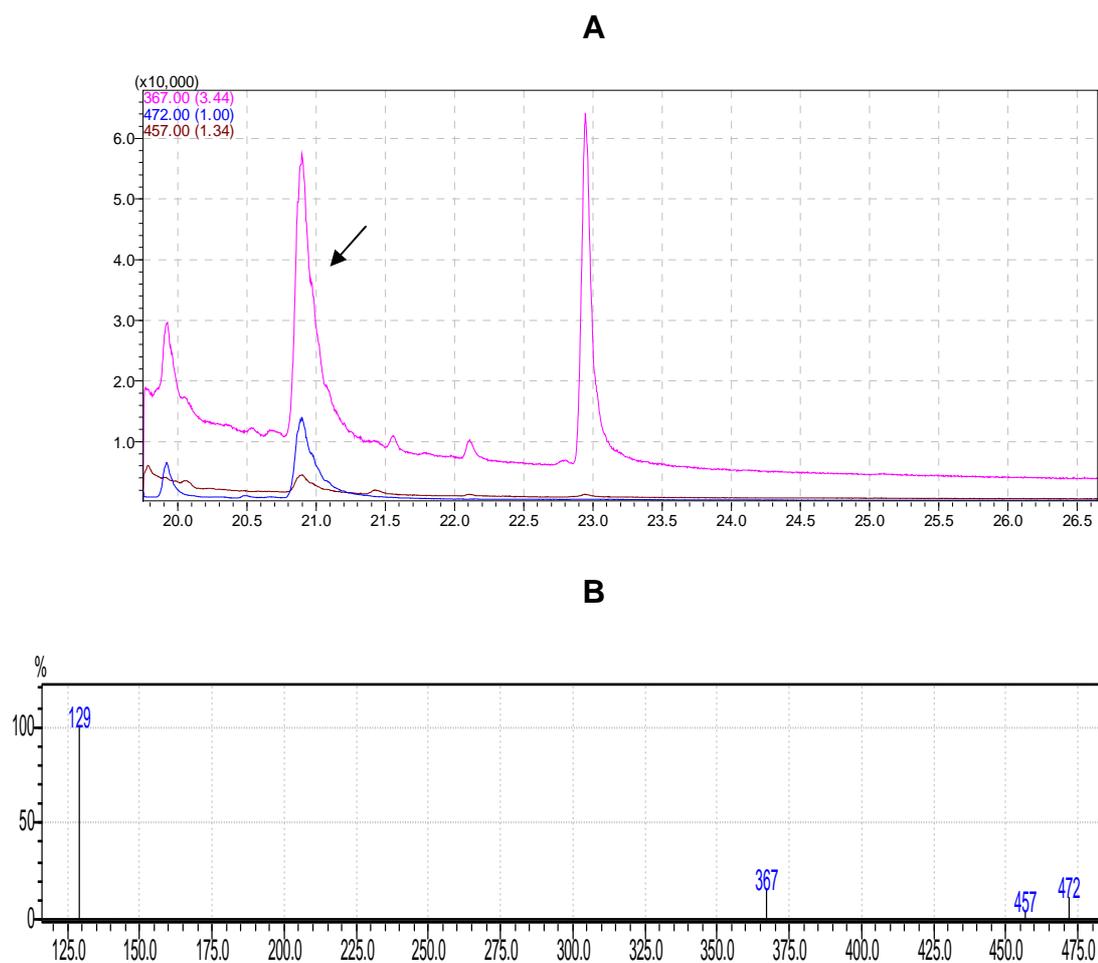
B



Cromatograma (A) e respectivo espectro de massas (B) obtido por CG-EM com detecção em modo de íons seletivamente monitorados, para o 5- α colestano (tr 15,915 min, m/z 357) utilizado como padrão interno.



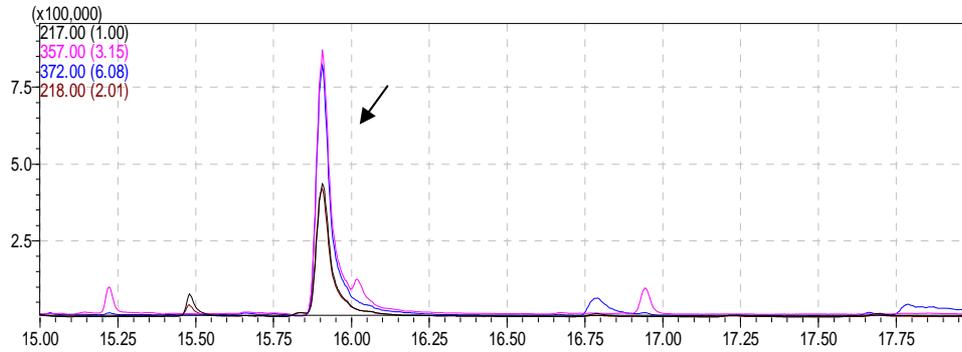
Cromatograma (**A**) e respectivo espectro de massas (**B**) obtido por CG-EM com detecção em modo de íons seletivamente monitorados, para o padrão de colesterol (tr 17,177 min, m/z 329).



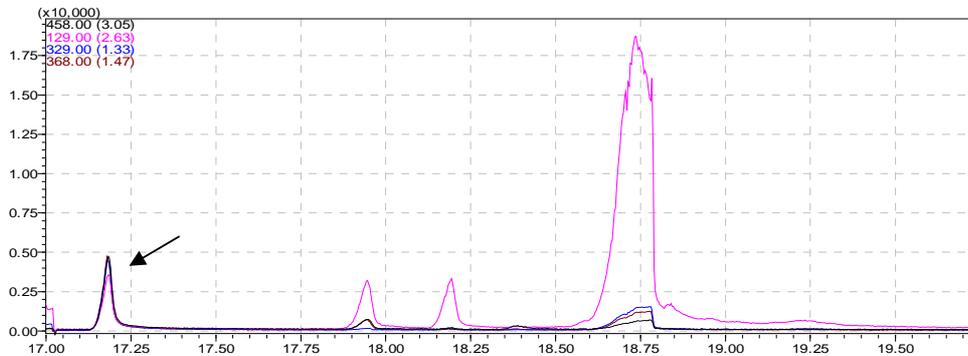
Cromatograma (A) e respectivo espectro de massas (B) obtido por CG-EM com detecção em modo de íons seletivamente monitorados, para o padrão de 7-cetocolesterol (20,900 min, m/z 367).

Anexo B

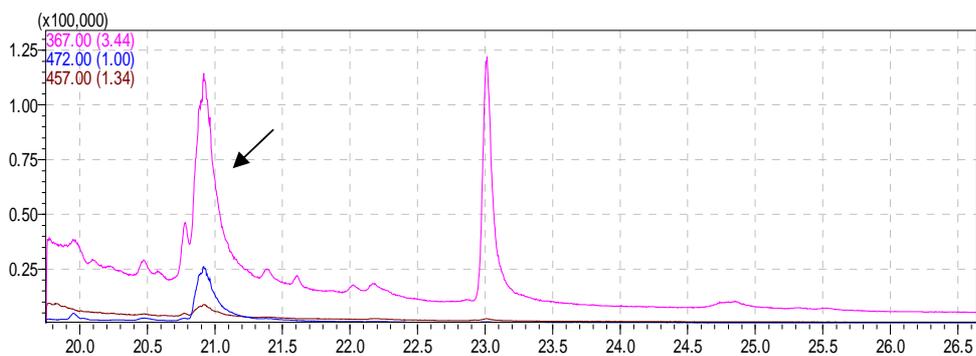
A



B

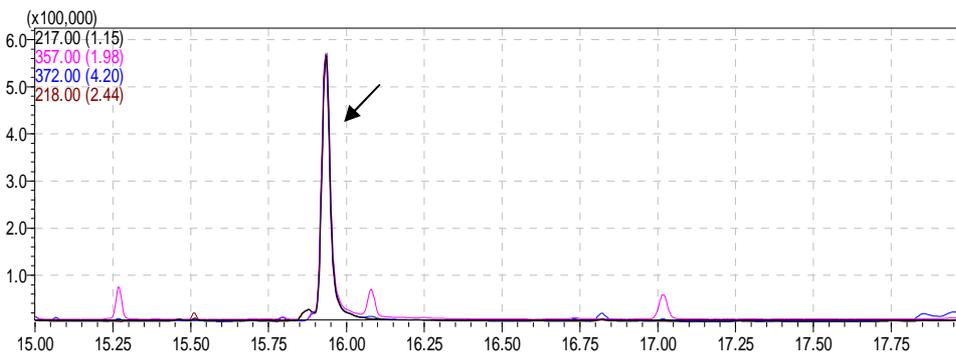


C

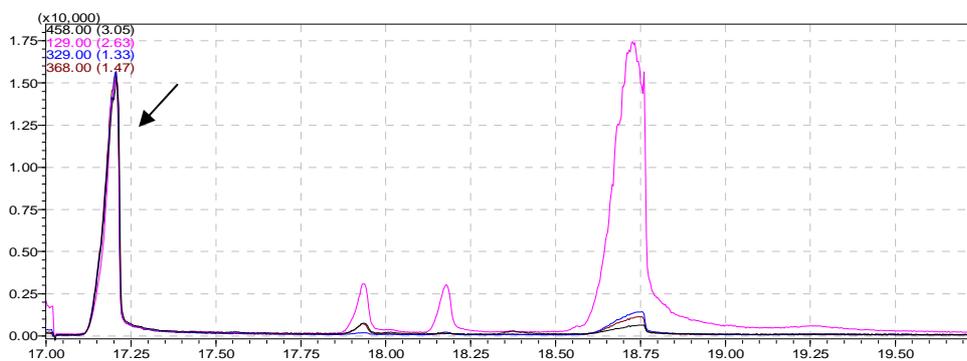


Perfis típicos de cromatogramas obtidos por CG, de amostras de filé de pescada-branca assado em forno combinado. (A) 5 α -colestano (tr 15,915 min, m/z 357); (B) colesterol (tr 17,177 min, m/z 329) e (C) 7-cetocolesterol (tr 20,900 min, m/z 367).

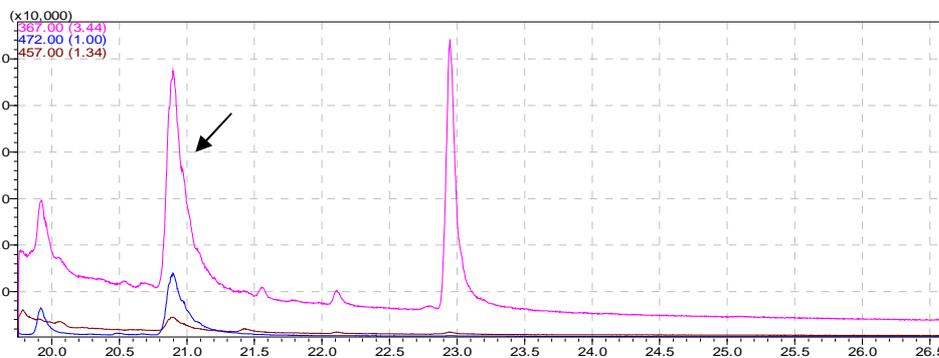
A



B



C



Perfis típicos de cromatogramas obtido por CG, de amostras de filé de merluza grelhado em forno combinado. (A) 5 α -colestano (tr 15,915 min, m/z 357); (B) colesterol (tr 17,177 min, m/z 329) e (C) 7-cetocolesterol (tr 20,900 min, m/z 367).