

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**Efeito da esterilização sobre os teores de licopeno em
molhos de tomates adicionados à conservas de
sardinhas (*Sardinellas brasiliensis*)**

Amanda Mattos Dias Martins

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO SOBRE OS TEORES DE LICOPENO
EM MOLHOS DE TOMATES ADICIONADOS À CONSERVAS DE
SARDINHAS (*Sardinellas brasiliensis*)**

AMANDA MATTOS DIAS MARTINS

Sob a orientação da Professora

D.Sc. Tatiana Saldanha

e

Co-orientação do Professor

D.Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do Grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração Ciências de Alimentos.

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2015

664.94

M386e

T

Martins, Amanda Mattos Dias, 1987-

Efeito da esterilização sobre os teores de licopeno em molhos de tomates adicionados à conservas de sardinhas (*Sardinellas brasiliensis*) / Amanda Mattos Dias Martins. - 2015.

120 f.: il.

Orientador: Tatiana Saldanha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2015.

Bibliografia: f. 74-87.

1. Sardinha (Peixe) - Conservação - Teses. 2. Tomate - Produtos - Teses. 3. Licopeno - Teses. 4. Esterilização - Teses. 5. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Saldanha, Tatiana, 1971- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

AMANDA MATTOS DIAS MARTINS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/02/2015

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (D.Sc.) Embrapa-CTAA
(Orientador)

Sidney Pacheco (D.Sc.) Embrapa-CTAA

Glória Maria Direito (D.Sc.) UFRRJ

DEDICATÓRIAS

À Deus por toda luz, apoio, ajuda, força e amor.

À minha mãe e amiga Sandra, pela fonte inesgotável de estímulo, incentivo e amor.

Aos meus irmãos Beatriz e Diogo, pelas risadas, torcida e eterna união.

Ao meu pai João, pela garra e conselhos de vida.

Ao meus pais de consideração Luiz Fernando e Ney por todo apoio, amizade e torcida.

Ao meu padrinho Ricardo pelos sorrisos, zelo e eterna torcida.

À minha avó Arlinda, por todos anos de cuidado, preocupação e zelo.

Aos meus sogros Enéas e Cidnéia, pelo apoio, carinho e zelo.

Ao meu amado companheiro e futuro professor Leandro Cappato, pela paciência, pelas conquistas, ajuda, solidariedade, carinho e amor todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de estudo e oportunidade de aprendizado.

À empresa e equipe de funcionários da Camil, em especial à Elaine Mapeli, pela oportunidade de estudo, atenção e apoio dado durante a realização do experimento.

Ao professor Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, pelo apoio, atenção, amizade, aprendizado, orientação e carinho. Obrigada por me proporcionar amadurecimento profissional, conhecimento técnico e ajudar-me a crescer profissionalmente.

Ao Dr. Sidney Pacheco pelos ensinamentos, paciência, amizade e auxílio nos cromatogramas. Sua ajuda e solidariedade foram essenciais para realização deste trabalho.

Ao meu querido amigo Fabiano, pela oportunidade da realização deste experimento junto a indústria de conservas. Obrigada pela atenção e oportunidades que me proporcionou.

À professora Dr. Tatiana Saldanha, pela experiência e aprendizado ganho nesses 2 anos de convívio.

À equipe da Cromatografia Líquida da Embrapa, pelo auxílio, aprendizagem e parceria. Meu sincero obrigado principalmente a Luzimar, Carol, Manuela, Fernanda, Jéssica e aos estagiários Vítor, Elaine e Karen pelo cuidado e ajuda nas análises.

Ao meu querido amigo Felipe Trombete, pela ajuda no HPLC da UFRRJ, amizade, paciência, conselhos, correções e solidariedade.

Aos amigos Júnior, Juarez, Tatiana Labre, Carol, Fernando e Fernanda pela força e ajuda nesta caminhada.

Ao professor de estatística Celso pela solidariedade e ajuda. Aos funcionários do DTA, Ivanilda e Wanderson pelo auxílio nas análises e a Lucimar pelo apoio e torcida.

RESUMO

MARTINS, Amanda Mattos Dias. **Efeito da esterilização industrial sobre os teores de licopeno em molhos de tomates adicionados à sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) enlatadas, RJ.** 2015. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O Brasil apesar de possuir extensa região costeira, o consumo *per capita* de pescados no país ainda é inferior ao indicado pela OMS. Uma alternativa para aumento deste consumo seja a ingestão de conservas de sardinhas pois são alimentos de fácil transporte, ricos em ácidos graxos ômega 3 e de baixo custo de aquisição. Durante a produção das conservas de sardinhas são empregados líquidos de cobertura, como molho de tomate, com o intuito de melhorar a troca térmica e favorecer a aceitabilidade sensorial do produto. Entretanto, é comum observar o descarte desses líquidos pelo consumidor, possivelmente por desconhecerem a qualidade nutricional destes. O licopeno, carotenoide naturalmente presente no tomate, é reportado como composto de grande potencial antioxidante mas, muito suscetível a degradação e a isomerização quando exposto a elevadas temperaturas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) o efeito da esterilização industrial sobre o teor de licopeno presente nos molhos de tomates de conservas de sardinhas produzidas em indústria pesqueira situada no Rio de Janeiro. O molho utilizado nas conservas foi produzido à partir de polpa de tomate *hot break*, água e sal. Foram preparadas latas contendo apenas molho de tomate (ME) e latas contendo molho de tomate e sardinhas (MECS). Todas as latas foram submetidas a esterilização a 126°C por 40 minutos. A quantificação e identificação do licopeno foi realizada através da comparação com tempo de retenção e o espectro de absorção UV/VIS, com padrão previamente isolado pelo laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Foram analisados os teores de carotenoides da polpa de tomate, das latas ME e MECS além das sardinhas cruas e esterilizadas. Não foi identificado teores de carotenoides nas amostras de sardinhas cruas, no entanto, após a esterilização das amostras MECS observou-se migração de 8% em média, do teor de licopeno total do molho para a sardinha. Foi observado que o aquecimento promoveu a isomerização de parte *trans-cis* do licopeno em todas as amostras, sendo as amostras de MECS as que apresentaram maiores teores de isômeros *cis*. Verificou-se que a retenção do licopeno nas latas de ME e MECS foi de 79% e 34% respectivamente, mostrando que a presença da sardinha impactou significativamente na degradação do licopeno. Com os resultados obtidos no presente trabalho, observou-se que o licopeno é resistente a esterilização industrial e sua estabilidade é mais dependente da matriz em que é homogeneizado do que ao tempo/temperatura que é exposto. Apesar das amostras MECS terem obtido redução significativa do licopeno, o teor médio deste composto foi de 5 mg/lata, mostrando que o consumo de sardinhas enlatadas com molho de tomate, além de proporcionar o aumento do consumo de pescados, apresenta-se como excelente fonte de ingestão deste antioxidante.

Palavras- Chave: *Sardinella brasiliensis*; pescados; esterilização; carotenoides.

ABSTRACT

MARTINS, Amanda Mattos Dias. **Effect of industrial sterilization on lycopene content in tomato sauces added to sardines (*Sardinella brasiliensis*) canned, RJ.** 2015. 108p. Dissertation, (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The Brazil despite having extensive coastal region, the per capita consumption of fish in the country is still lower than indicated by the WHO. An alternative to this increased consumption is eating canned sardines because they are easy to transport food, rich in omega 3 fatty acids and low cost. During the production of preserves, commonly are used liquid coverages, such as tomato sauce, in order to improve the thermal exchange and to facilitate sensory acceptability of the product. However, it is common to observe the disposal of these liquids by the consumer, possibly unaware of the nutritional quality of these. Lycopene is naturally present in tomato carotenoid is reported as major compound of antioxidant potential, but very susceptible to degradation and isomerization when exposed to elevated temperatures. Thus, the aim of this study was to evaluate by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) the effect of industrial sterilization on this lycopene content in canned tomato sauces sardines produced in fisheries located in Rio de Janeiro. The sauce was used for the samples produced from hot break tomato pulp, water and salt. Only cans were prepared containing tomato sauce (ME) and cans containing tomato sauce and sardines (MECS). All the cans were subjected to sterilization at 126°C for 40 minutes. The identification and quantification of lycopene was performed by comparison to retention time and UV absorption spectrum / VIS with the previously isolated by standard the laboratory of Liquid Chromatography at Embrapa Food Technology. We analyzed the carotenoid content of tomato pulp, the ME and MECS cans beyond the raw and sterilized sardines. It was identified carotenoid content in samples of raw sardine, however, after sterilization of the MECS sample migration was observed on average 8% of the total lycopene content sauce for sardines. It was observed that heating promoted the *cis-trans* isomerization of lycopene in all samples, and samples showing higher MECS the *cis* content. It was found that the retention of lycopene in cans and MECS ME was 79% and 34%, respectively, showing that the presence of sardines significant impact on the degradation of lycopene. With the results obtained in this study, there was lycopene is resistant to industrial sterilization and its stability is more dependent on the matrix in which is homogenized than the time/temperature is exposed. Despite the MECS samples have obtained a significant reduction of lycopene, the average content of this compound was 5 mg/can, showing that the consumption of canned sardines in tomato sauce, in addition to providing increased fish consumption, presents itself as an excellent source of intake of this antioxidant.

Key-Words: *Sardinella brasiliensis*; fish; sterilization; carotenoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção mundial de pescados marinhos dos dez maiores produtores em 2011 e 2012.....	4
Figura 2: Mapa da área de distribuição da sardinha-verdadeira (<i>Sardinella brasiliensis</i>).....	6
Figura 3: Participação relativa de embarcações permissionadas para a pesca da sardinha-verdadeira no litoral sudeste e sul, por estado, em 2010.....	7
Figura 4: Produção de sardinha-verdadeira nos estados no Rio de Janeiro e Santa Catarina. ...	7
Figura 5: Principais pescados adquiridos pela população brasileira em 2009-2010.	9
Figura 6: Volume de sardinhas (toneladas) congeladas importadas de 2002 a 2012.	9
Figura 7: Equação do cálculo do F_0 à partir do 12D.....	15
Figura 8: Forma estrutural do isopropreno.....	18
Figura 9: Estruturas químicas de carotenos e xantofilas.	18
Figura 10: Forma estrutural do β -caroteno.....	20
Figura 11: Forma estrutural do licopeno ($C_{40}H_{56}$).....	21
Figura 12: Estrutura dos <i>cis</i> -isômeros do licopeno mais encontrados em produtos processados termicamente	23
Figura 13: Polpa de tomate acondicionada à vácuo em <i>bags</i> de alumínio.....	28
Figura 14: Fluxograma do processamento de sardinhas enlatadas com molho de tomate.....	29
Figura 15: Sardinhas evisceradas armazenadas em caixa térmica com gelo.	30
Figura 16: Medição do peso das latas contendo apenas sardinhas evisceradas.	30
Figura 17: Armazenamento das latas com sardinhas em bandejas com gelo.....	31
Figura 18: Pesagem dos ingredientes para produção molho de tomate.	32
Figura 19: Latas adicionadas apenas de molho de tomate.	32
Figura 20: Latas adicionadas de molho de tomate e sardinha.	33
Figura 21: Vista frontal do acondicionamento das latas no autoclave industrial.	34
Figura 22: Diagrama de posicionamento das latas (vista lateral) no autoclave industrial.	34
Figura 23: Esquema das etapas do processamento térmico aplicado às latas.	35
Figura 24: Fluxograma da amostragem de latas de sardinhas com molho de tomate e notação adotada.	38
Figura 25: Fluxograma da amostragem das latas de molho de tomate e notação adotada.....	39
Figura 26: Análise de umidade da sardinha eviscerada e da polpa de tomate	40
Figura 27: Material utilizado para a análise de ácido ascórbico.....	40

Figura 28: Extração de carotenoides. A- Material utilizado na extração. B- Separação do extrato etéreo da fase aquosa, C- Filtração do extrato etéreo para balão volumétrico.	41
Figura 29: Equação para cálculo dos carotenoides totais.	42
Figura 30: Equações para cálculo de mg/100g de polpa em base seca.	42
Figura 32: Equação para cálculo do teor licopeno por lata de MECS.	43
Figura 31: Equação de cálculo do teor de licopeno por lata de ME.	43
Figura 33: Estádios de maturação do Melão de São Caetano. 1- Início da maturação. 2- Fruto em processo de maturação, 3- Fruto maduro.	44
Figura 34: Arilos vermelhos do Melão de São Caetano maduro.	44
Figura 35: Coleta manual do padrão cromatográfico na saída do detector CLAE.	45
Figura 36: Equação para cálculo de pureza cromatográfica do licopeno isolado.	45
Figura 37: Equação para cálculo da concentração corrigida do padrão de licopeno isolado ...	46
Figura 38: Equação para cálculo da porcentagem do composto por sistema de normalização.	47
Figura 39: Equação para cálculo do teor de <i>trans</i> -licopeno obtido por método de normalização.	47
Figura 40: Isolamento padrão analítico de <i>trans</i> -licopeno.	48
Figura 41: Cromatograma e espectros de absorção UV/VIS dos carotenoides presentes no extrato de arilos de Melão de São Caetano.	49
Figura 42: Primeira tentativa de isolamento de padrão de <i>trans</i> -licopeno.	50
Figura 43: Padrão isolado de <i>trans</i> -licopeno.	50
Figura 44: Curva de calibração do padrão <i>trans</i> -licopeno.	51
Figura 45: Teores de umidade \pm erro padrão das amostras de P, ME e MECS.	53
Figura 46: Variação do teor de carotenoides dos tratamentos.	55
Figura 47: Perfil cromatográfico e espectro de absorção UV/VIS do β -caroteno presente nas amostras P, ME, MECS e SE.	60
Figura 48: Espectro de absorbância de sobreposição do <i>trans</i> licopeno e principal <i>cis</i> -isômero encontrado nas amostras (----).	62
Figura 49: Perfil cromatográfico e espectros de absorção UV/VIS dos isômeros <i>cis</i> -licopeno encontrados na amostra de P.	63
Figura 50: Perfil cromatográfico e espectros de absorção UV/VIS dos isômeros <i>cis</i> encontrados na amostra de ME 1.	64

Figura 51: Perfil cromatográfico e espectros de absorção UV/VIS dos isômeros <i>cis</i> -licopeno encontrados na amostra de MECS 1.	65
Figura 52: Perfil cromatográfico e espectros de absorção UV/VIS dos isômeros <i>cis</i> encontrados na amostra de SE 1.	66
Figura 53: Teor de carotenoides, <i>trans</i> -licopeno e licopeno total das médias das amostras de P, ME e MECS	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Maiores produtores de pescado toneladas em 2009 e 2010.	5
Tabela 2: Dados de exportação de sardinhas em relação ao valor e volume (toneladas).	8
Tabela 3: Maiores exportadores de sardinha congelada para o Brasil durante 2002 a 2012. ...	10
Tabela 4: Comparação dos teores de ácidos graxos poliinsaturados e EPA e DHA de pescados marinhos.	11
Tabela 5: Reduções de 12 ciclos logarítmicos para eliminação de bactérias.	14
Tabela 6: Ômega-3 (g/100g) contido em pescados enlatados fabricados nos Estados Unidos.	16
Tabela 7: Verificação das massas das latas contendo apenas molho de tomate.	35
Tabela 8: Verificação das massas das latas com sardinha e molho de tomate.	36
Tabela 9: Volumes das alíquotas retiradas da solução de padrão cromatográfico de licopeno e concentrações finais dos pontos da curva analítica.	46
Tabela 10: Teor de umidade (g/100g) das réplicas das amostras de S e SE \pm desvio padrão. .	51
Tabela 11: Teor médio de umidade (g/100g) das amostras de S e SE \pm desvio padrão.	52
Tabela 12: Teores de umidade (g/100g) das réplicas das amostras de ME e MECS.	52
Tabela 13: Teor médio de umidade (g/100g) das amostras de P, ME e MECS \pm desvio padrão.	53
Tabela 14: Teor médio de carotenoides totais (mg/100g de polpa em base seca) das amostras P, ME e MECS \pm desvio padrão.	54
Tabela 15: Teor de carotenoides totais (mg/100g de polpa em base seca) das réplicas das amostras de S, ME, MECS, SE.	55
Tabela 16: Comparação dos valores de desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação encontrados nas réplicas das amostras por diferentes métodos de quantificação.	56
Tabela 17: Comparação dos teores de <i>trans</i> -licopeno quantificados por método de normalização e padronização externa.	57
Tabela 18: Teor de β -caroteno (mg/100g de polpa em base seca) nas réplicas das amostras de S, ME, MECS, SE.	58
Tabela 19: Teores médios de β -caroteno (mg/100g de polpa em base seca) das amostras de P, ME e MECS.	59
Tabela 20: Porcentagem média de isômeros das amostras de P, ME e MECS.	61

Tabela 21: Teores médios de <i>cis</i> -licopeno, <i>trans</i> -licopeno e licopeno total em mg/100g de polpa em base seca nas amostras de P, ME, MECS.	67
Tabela 22: Teores <i>cis</i> -licopeno, <i>trans</i> -licopeno e licopeno total em mg/100g de polpa em base seca encontrados nas réplicas das amostras de ME, MECS, SE.	68
Tabela 23: Teor de mg/licopeno por lata analisada de ME, MECS, SE.	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	Produção e consumo de pescados	4
2.1.1	Produção de sardinhas	6
2.2	Composição nutricional das sardinhas.....	10
2.2.1	Teores de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3	10
2.2.2	Teores de selênio e mercúrio.....	12
2.3	Esterilização comercial de sardinhas	13
2.4	Composição do molho de tomate	17
2.4.1	Polpa de tomate	17
2.4.2	Ácido ascórbico	17
2.4.3	Carotenoides.....	18
2.4.3.1	Capacidade antioxidante dos carotenoides	19
2.4.3.2	β -caroteno	20
2.4.3.3	Licopeno	20
2.4.3.4	Efeitos do processamento térmico.....	22
2.4.4	Identificação de carotenoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	Material	26
3.1.1	Material de consumo e equipamentos	26
3.2	Execução da parte experimental.....	27
3.2.1	Procedência das sardinhas.....	27
3.2.2	Procedência da polpa de tomate	27
3.3	Métodos	28
3.3.1	Processamento das sardinhas em conserva	28
3.3.1.1	Esterilização das latas	33
3.3.1.2	Amostragens.....	37
3.3.2	Análise de umidade	40
3.3.3	Análise de ácido ascórbico por CLAE.....	40

3.3.4	Análise de carotenoides	41
3.3.4.1	Extração de carotenoides	41
3.3.4.2	Quantificação de carotenoides totais por espectrofotometria	41
3.3.4.3	Identificação dos carotenoides por CLAE	42
3.3.4.4	Quantificação de licopeno nas amostras ME	43
3.3.4.5	Quantificação de licopeno nas amostras MECS	43
3.3.5	Isolamento e obtenção de padrão cromatográfico de licopeno	43
3.3.5.1	Verificação da pureza cromatográfica do padrão isolado	45
3.3.5.2	Quantificação espectrofotométrica do padrão isolado e construção da curva analítica	45
3.4	Comparação da quantificação do <i>trans</i> -licopeno por método de normalização e padronização externa.....	46
3.5	Análise estatística	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Isolamento do padrão cromatográfico de <i>trans</i> -licopeno	48
4.2	Análise de umidade	51
4.3	Análise de ácido ascórbico por CLAE.....	53
4.4	Quantificação dos carotenoides totais por espectrofotometria	54
4.5	Identificação dos carotenoides por CLAE	56
4.5.1	Comparação da quantificação por método de normalização e padronização externa ..	56
4.6	Efeito da esterilização sobre os teores de β -caroteno.....	58
4.7	Efeito da esterilização sobre a formação de isômeros <i>cis</i> -licopeno	61
4.8	Efeito da esterilização sobre a oxidação do licopeno	66
5	CONCLUSÕES	72
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
	ANEXOS	88
	A -Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de conservas de peixes.....	89
	B- Regulamento Técnico fixa a identidade qualidade de conservas sardinhas.....	93
	C- Perfil cromatográfico e espectros do β-caroteno das amostras.....	97
	D- Perfil cromatográfico e espectros dos isômeros <i>cis</i>-licopeno das amostras.....	100

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a utilização de pescados na alimentação humana tem sido objeto de inúmeras pesquisas, pois estes caracterizam-se por conter proteínas de elevado valor biológico (presença de todos os aminoácidos essenciais), além da composição de lipídios, destacando-se os altos teores de ácidos graxos poliinsaturados da série ômega 3 ($\omega 3$). Estes ácidos graxos estão relacionados com efeitos benéficos à saúde, como a prevenção do desenvolvimento da arterosclerose, hipertensão, doenças auto-imunes, problemas alérgicos, além de reduzirem a incidência de doenças cardíacas, desenvolvimento de anginas, arritmias e câncer.

Atualmente, o conceito que a boa alimentação proporciona saúde e qualidade de vida, tem estimulado inúmeras pesquisas na área de alimentos. A busca da população pela inserção de produtos com compostos bioativos e alimentos funcionais na dieta, tem sido visto como importante alternativa para o aumento de expectativa de vida e na prevenção de doenças.

O Brasil possui uma extensa região costeira com extensão de 8.547 Km, além de 4.000 Km de rios e um grande número de açudes. Apesar de possuir grande potencial produtor, o país está muito aquém de sua capacidade. A produção anual brasileira de pescados gira em torno de 1,5 milhões de toneladas, contudo, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), estima-se que, em 2030, o Brasil será um dos maiores produtores mundiais, com a estimativa de produção de 20 milhões de toneladas/ano. A meta até o final de 2014 será atingir a marca de 2 milhões de toneladas.

Entretanto, apesar do aumento significativo do consumo de peixes no Brasil, sua aquisição pelos consumidores é relativamente baixa. Dentre os principais fatores responsáveis pelo baixo consumo estão, dificuldade na distribuição de pescado fresco em grande parte do país, falta de hábito e baixa qualidade do produto encontrado em feiras livres e mercados, sendo mais comum o consumo de pescado enlatado em detrimento aos similares frescos.

Entre as espécies oriundas da pesca, os peixes representam mais de 87 % do total produzido (10 % de moluscos e 3 % de crustáceos) sendo o principal gênero capturado, a sardinha verdadeira (*Sardinella brasilliensis*). Essa espécie é a mais consumida no Brasil, apresentando um volume de captura de 83.286 ton em 2009, 62.134 ton em 2010 e 72 mil ton em 2011.

Para a comercialização de sardinhas em larga escala, é necessário a aplicação de técnicas de processamento capazes de aumentar sua estabilidade microbiológica. Entre as técnicas mais utilizadas e importante, está a elaboração de sardinhas enlatadas esterilizadas. O objetivo principal do enlatamento de pescados consiste na preparação de um produto de boa qualidade, capaz de ser armazenado durante um tempo razoável, além de ser uma excelente forma de transporte, sem a necessidade de refrigeração.

Durante o processamento de sardinhas enlatadas, são comumente empregados diferentes líquidos de coberturas: natural (água e sal), óleo comestível, azeite de oliva, óleo comestível com ervas finas e molho de tomate. Em geral, são utilizados com o intuito de melhorar as características sensoriais do produto e facilitar a troca térmica durante a esterilização. Entre os líquidos de cobertura mais utilizados, destaca-se o molho de tomate.

O consumo de produtos derivados de tomates é recomendado do ponto de vista nutricional, uma vez que o licopeno, carotenoide naturalmente presente no fruto, possui grande potencial antioxidante. Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de antioxidantes naturais de origem vegetal reduz o risco de ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis, tais como doenças cardiovasculares e câncer.

O consumo de alimentos enlatados deve ser estimulado por se tratar de um alimento seguro e capaz de auxiliar as necessidades impostas pela vida moderna, onde o tempo de preparo dos alimentos são um fator limitante. Entretanto, a temperatura e o tempo necessários no processamento de alimentos enlatados são importantes fatores que podem contribuir para a degradação de compostos benéficos a saúde, como os ácidos graxos ω 3 e os carotenoides.

Todavia, apesar das dimensões da costa brasileira e importância da indústria pesqueira de sardinha em inúmeros estados, principalmente no Rio de Janeiro, estudos que avaliam a qualidade do molho de tomate utilizado pela indústria; os efeitos da esterilização industrial sobre os teores de licopeno e a interação do mesmo quando adicionado a sardinhas enlatadas são praticamente inexistentes.

OBJETIVO GERAL

Preparar e processar sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) enlatadas com molho de tomate junto à indústria pesqueira no estado do Rio de Janeiro, bem como, avaliar o efeito da esterilização industrial sobre o conteúdo de licopeno presente nas latas de sardinhas com molho de tomate.

Objetivos específicos

- Extrair e isolar padrão cromatográfico de licopeno com teor de pureza superior a 90% utilizando como matriz frutos de melão de São Caetano (*Mormodica charantia L.*);
- Esterilizar amostras contendo sardinhas e molho de tomate;
- Avaliar os teores de umidade e carotenoides totais das amostras de polpa de tomate, das sardinhas evisceradas cruas, sardinhas esterilizadas, do molho de tomate esterilizados com e sem sardinha;
- Quantificar teor de carotenoides totais por Espectrofotometria;
- Quantificar o teor de β -caroteno e licopeno das amostras preparadas utilizando técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD);
- Avaliar a ocorrência de migração dos principais carotenos característicos do tomate (β -caroteno e licopeno) para as sardinhas;
- Avaliar o efeito da presença da sardinha na degradação do licopeno;
- Avaliar o efeito do processamento térmico na isomerização do licopeno;
- Avaliar o teor de ácido ascórbico (vitamina C) na matéria-prima e após os tratamentos;
- Quantificar o teor de licopeno disponível por lata de amostra de sardinha com molho de tomate.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção e consumo de pescados

A produção mundial de pescados em 2012 (proveniente tanto da pesca marinha quanto da aquicultura) atingiu aproximadamente 158 milhões de toneladas representando um incremento de aproximadamente 9% em relação à 2009 (FAO, 2014). A Figura 1 apresenta os 10 maiores produtores de pescados marinhos no mundo entre os anos de 2011 e 2012. Dentre esses anos a produção mundial de pescados marinhos alcançou aproximadamente 82,6 milhões de toneladas em 2011 e 79,7 milhões de toneladas em 2012. De acordo com os dados, entre os 10 maiores produtores 7 são países asiáticos, incluindo a Rússia, pois pescados são mais capturados no Oceano Pacífico do que no Atlântico.

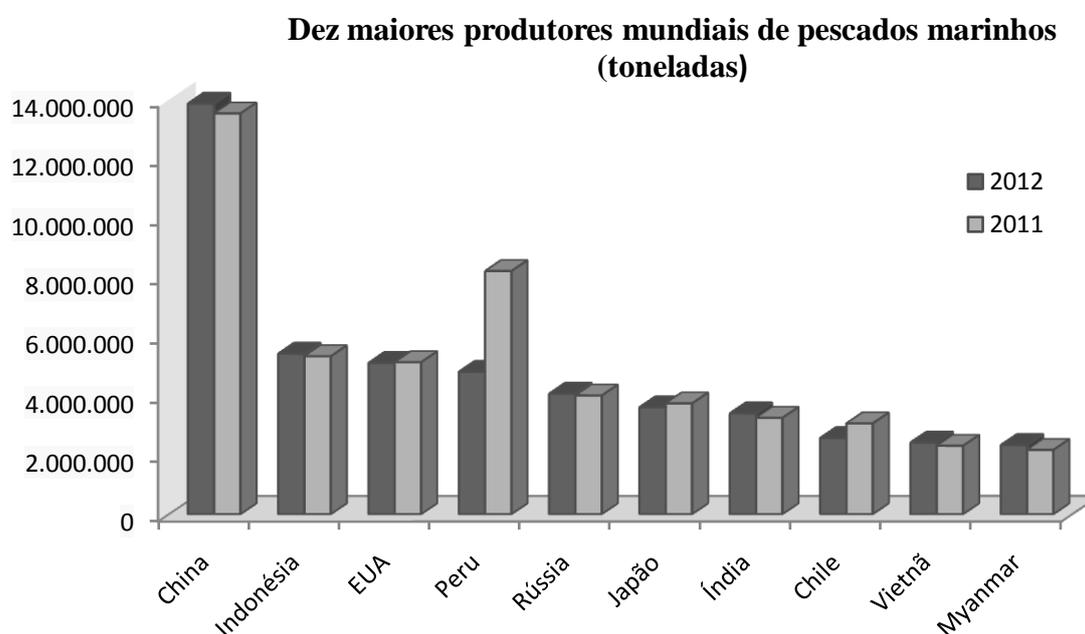


Figura 1: Produção mundial de pescados marinhos dos dez maiores produtores em 2011 e 2012. Fonte: Adaptado FAO, 2014.

No cenário mundial, os países asiáticos são importantes produtores e consumidores de pescados marinhos. A China foi responsável por 38% da produção mundial de pescados em 2010 (pescados marinhos e aquicultura), seguido pela Indonésia com 7% e pela Índia com 5,5% (Tabela 1). Em 2010, das 128 milhões de toneladas disponíveis para consumo humano, a Ásia contribuiu com aproximadamente dois terços desse montante, representando 85,4 milhões de toneladas, dos quais, 42,8 milhões foram consumidos somente na China.

Tabela 1: Maiores produtores de pescado toneladas em 2009 e 2010.

Posição	País	2009		2010	
		Produção	%	Produção	%
1º	China	60.474.939	36,95	63.495.197	37,69
2º	Indonésia	9.820.818	6,00	11.662.343	6,92
3º	Índia	7.865.598	4,81	9.348.063	5,55
4º	Japão	5.465.155	3,34	5.292.392	3,14
5º	Filipinas	5.083.218	3,11	5.161.720	3,06
6º	Vietnã	4.870.180	2,98	5.127.600	3,04
7º	Estados Unidos	4.710.653	2,88	4.874.183	2,89
8º	Peru	6.964.446	4,26	4.354.480	2,59
9º	Rússia	3.949.267	2,41	4.196.539	2,49
10º	Mianmar	3.545.186	2,17	3.914.169	2,32
11º	Chile	4.702.902	2,87	3.761.557	2,23
12º	Noruega	3.486.277	2,13	3.683.302	2,19
13º	Coréia do Sul	3.201.134	1,96	3.123.204	1,85
14º	Tailândia	3.287.370	2,01	3.113.321	1,85
15º	Bangladesh	2.885.864	1,76	3.035.101	1,80
16º	Malásia	1.874.064	1,15	2.018.550	1,20
17º	México	1.773.713	1,08	1.651.905	0,98
18º	Egito	1.092.889	0,67	1.304.795	0,77
19º	Brasil	1.240.813	0,76	1.264.765	0,75

Fonte: BRASIL, 2011.

No ano de 2012, assim como em 2010, a China foi o maior produtor de pescado, sendo responsável por aproximadamente 17% da produção mundial, seguida de 6,56% da Indonésia, 6,18% dos Estados Unidos, 5,82% do Peru e 4,92% da Rússia.

Em relação ao consumo mundial, a demanda cresce a cada ano chegando a alcançar, em 2012, uma média de consumo *per capita* de aproximadamente 20 Kg/habitante/ano, sendo a China o maior consumidor de pescados do mundial (FAO, 2014). O consumo *per capita* do país vem aumentando, desde 1990, aproximadamente 27% a cada ano, chegando atingir em 2010, um consumo de 35 Kg/peixe/habitante (FAO, 2012).

O Brasil, apesar de dispor de extensa região costeira e condições naturais favoráveis, como o clima propício, não ocupa posição de destaque, sendo responsável por menos de 1% da produção total mundial de pescados (BRASIL, 2011; FAO, 2012). Apesar do crescimento no consumo brasileiro, o consumo per capita ainda é considerado baixo. De 2006 até 2012, o consumo aumentou cerca de 53%, alcançando, em 2012, a média de 11,17Kg/habitante, cerca de 8 Kg a menos comparados à média mundial. Apesar do significativo aumento, o consumo brasileiro ainda encontra-se abaixo da média mínima estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de 12 kg de peixe por ano por habitante (BRASIL, 2011). Uma das razões para este fato pode ser explicada pela dificuldade na distribuição de pescado fresco em grande parte do país, pela falta de hábito e baixa qualidade do produto encontrado em feiras livres e mercados.

A produção anual brasileira gira em torno de 1,5 milhões de toneladas, sendo a pesca marinha a principal fonte de produção de pescados. Quanto a contribuição de cada região brasileira para aumento do consumo de pescados, a região Nordeste se destacou no ano de 2010 sendo a que mais contribuiu com 32% seguida do Sul com 23% e a Sudeste com 16%. Em relação à região Nordeste os estados do Maranhão e Bahia foram os maiores produtores com aproximadamente 42,92% da produção total. A grande produtividade desta região se deve ao fato de possuir grande região costeira, tendo na pesca extrativa sua principal fonte de

captura. Em contrapartida, a região Centro-Oeste é a região que menos contribuiu para produção brasileira principalmente devido sua localidade (IBGE, 2010).

2.1.1 Produção de sardinhas

A espécie *Sardinella brasiliensis* ou sardinha-verdadeira é conhecida por formar cardumes tipicamente de regiões subtropicais encontrada no Brasil principalmente nas áreas de distribuição entre Cabos de São Tomé (Rio de Janeiro) e de Santa Marta (Santa Catarina) (IBAMA, 2004; IBAMA, 2011). No estado do Rio de Janeiro a sardinha é pescada principalmente na Ilha Grande (Angra dos Reis), arredores de Cabo Frio e na Baía de Sepetiba (IBAMA, 2011). Dentre os gêneros mais capturados no Brasil, a *Sardinella* possui o maior destaque (IBAMA, 2011; FAO, 2014). A Figura 2 ilustra a distribuição da *Sardinella brasiliensis* na costa brasileira.

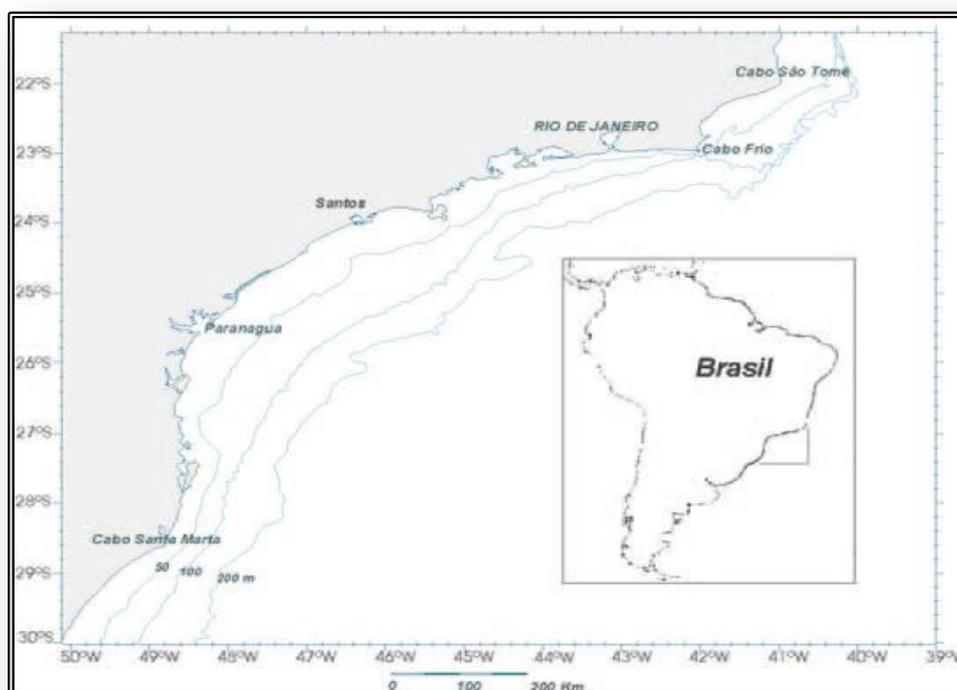


Figura 2: Mapa da área de distribuição da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*).

Fonte: IBAMA, 2011.

A espécie apresenta ciclo de vida curto e rápido crescimento. Geralmente o tamanho indicado para captura são de 90 e 250 mm, com idades até 3 anos, tamanho mínimo de pesca é 17 cm, de acordo com o Decreto-Lei 221/67 e do Fiset/Pesca (IBAMA, 2004; IBAMA, 2011).

O Rio de Janeiro se destaca como o segundo maior em número de embarcações permissionadas para pesca de sardinhas nas regiões Sul e Sudeste (Figura 3). Isto se deve possivelmente por esta área ser favorecida pela influência de águas subtropicais desta região, que são frias e ricas em nutrientes, que permitem a sustentação de grandes populações deste gênero (IBAMA, 2004; IBAMA, 2011).

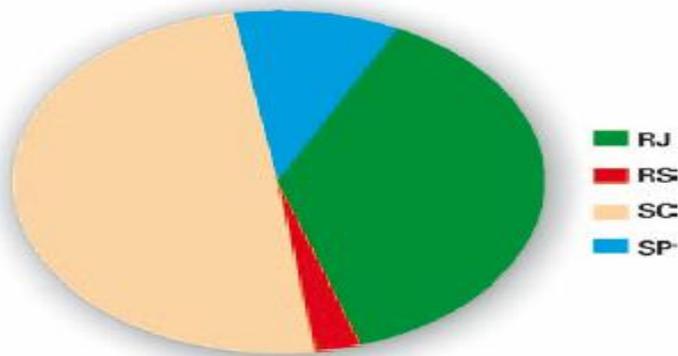


Figura 3: Participação relativa de embarcações permissionadas para a pesca da sardinha-verdadeira no litoral sudeste e sul, por estado, em 2010. Fonte: IBAMA, 2011.

Segundo dados do Conselho Nacional de Pesca e Aquicultura (CONEPE, 2013), no ano de 2012 a atividade pesqueira gerou R\$216 milhões de reais para economia do Estado do Rio de Janeiro, correspondentes a quantidade de 90 mil toneladas de pescados desembarcados no estado, tendo um aumento de aproximadamente 15% em relação a 2011. Deste aumento, 45% equivalem ao desembarque de sardinhas-verdadeiras (*Sardinella brasilliensis*) o que demonstra a importância econômica deste pescado para o estado.

A pesca industrial brasileira desenvolveu-se por meios de incentivos governamentais e tornou-se um segmento de grande relevância social e econômica para municípios litorâneos, por se tratar de uma atividade de base, fornecedora de matéria prima para as grandes indústrias e centros de distribuição de alimentos (BRASIL, 2011). No Rio de Janeiro a pesca industrial foi iniciada na década de 1940 devido ao início da mecanização das embarcações. Este processo proporcionou o desenvolvimento da atividade pesqueira e auxiliaram a criação de duas fábricas de enlatamento de pescado em São Gonçalo; a Rubi, em 1934, e a Coqueiro, em 1937 (SEBRAE, 2009).

Segundo o BRASIL,(2011), entre as regiões Sul e Sudeste, os estados de Santa Catarina e Rio de Janeiro apresentam-se como os maiores produtores, contribuindo em grande parte para exportação e para suprimento interno de matéria-prima para produção de conservas nacionais (IBAMA, 2004; SEBRAE, 2009; IBAMA, 2011). A Figura 4 apresenta a produção dos estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina durante os anos de 1999 até 2009.

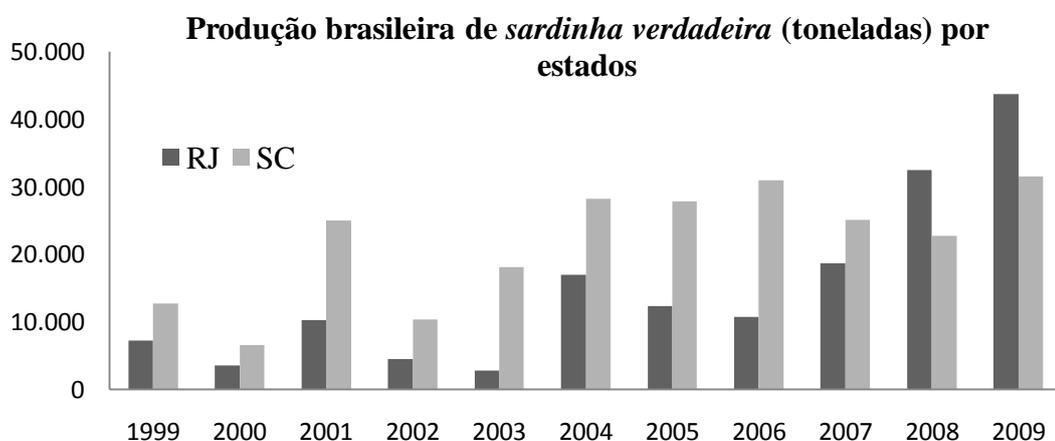


Figura 4: Produção de sardinha-verdadeira nos estados no Rio de Janeiro e Santa Catarina. Fonte: Adaptado IBAMA, 2011.

A Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) é um método de codificação de mercadorias que visa facilitar a coleta de dados em âmbito nacional (MDIC, 2001). Segundo o Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC, 2001) dentro do período de 2002 até 2012, as exportações brasileiras totalizaram US\$ 279.500.980, montante este referente às modalidades, NCM 16041310 – correspondentes as sardinhas preparadas em conservas e NCM 03037100 – referente as sardinhas congeladas. Os Estados de Santa Catarina e Rio de Janeiro, além de serem grandes produtores se encontram também como grandes exportadores, juntos representam aproximadamente 97% das sardinhas exportadas. A Tabela 2 apresenta os dados de exportação, em relação ao valor (dólar) e volume (toneladas) dos 2 estados brasileiros para ambas modalidades.

Tabela 2: Dados de exportação de sardinhas em relação ao valor e volume (toneladas).

Estados	NCM 03037100*		NCM 1604310*	
	US\$	t	US\$	t
Santa Catarina	116.411.115	221.913	38.379.856	13.909
Rio de Janeiro	106.016.901	164.730	6.661.189	2.117
Outros	6.904.819	10.943	5.127.100	1.887
Total	229.332.835	397.585	50.168.145	17.914

Fonte: MDIC, 2015.

No Brasil, até os anos 1970, a captura de sardinhas era de aproximadamente 200 mil toneladas/ano contudo, no ano de 2000, esse número decaiu para 17 mil toneladas/ano, levando este pescado quase à extinção no mar brasileiro. Após este fato, o governo passou a adotar o período de defeso, que impede a pesca durante quatro meses, respeitando o período de reprodução do pescado. Com esta medida, o volume de captura de sardinhas chegou a 83.286 toneladas em 2009. Porém em 2010, houve uma redução em 25% na captura de sardinhas, atingindo um montante de 62 mil toneladas, aproximadamente (BRASIL, 2011). Flutuações no volume de captura deste pescado estão relacionadas a diferentes fatores, como a mortalidade por predação, poluição aquática e principalmente, a mudanças climáticas, pois esta espécie é muito sensível a tais oscilações (ROSSI-WONGTSCHOWSKI *et al.*, 1996).

A Figura 5 apresenta os principais pescados consumidos no Brasil nos anos de 2009 e 2010. Segundo dados de aquisição domiciliar do IBGE (2010), sardinha é o segundo pescado mais consumido no Brasil, possivelmente por ser um produto de baixo custo, fácil transporte e estocagem, capaz de agradar sensorialmente uma ampla faixa da população brasileira, especialmente as classes mais carentes.

Principais pescados adquiridos pela população brasileira em 2009-2010

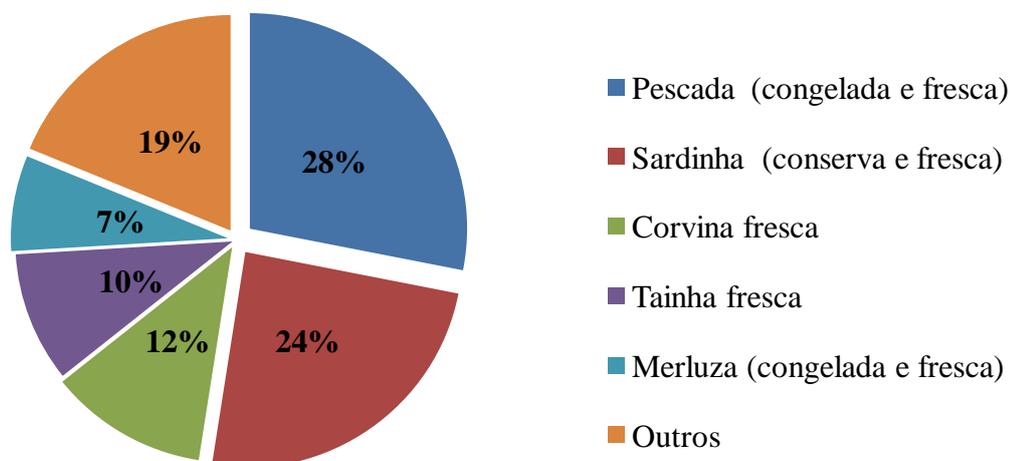


Figura 5: Principais pescados adquiridos pela população brasileira em 2009-2010.

Fonte: Adaptado de IBGE, 2010.

Em decorrência do elevado consumo e do período de defeso, as importações de sardinha congeladas (NCM 03037100) têm sido uma alternativa para atender à demanda nacional. A Figura 6 mostra o volume de sardinhas congeladas importadas durante o período de 2002 até 2012.

Importações brasileiras de sardinha congeladas (NCM 03037100)

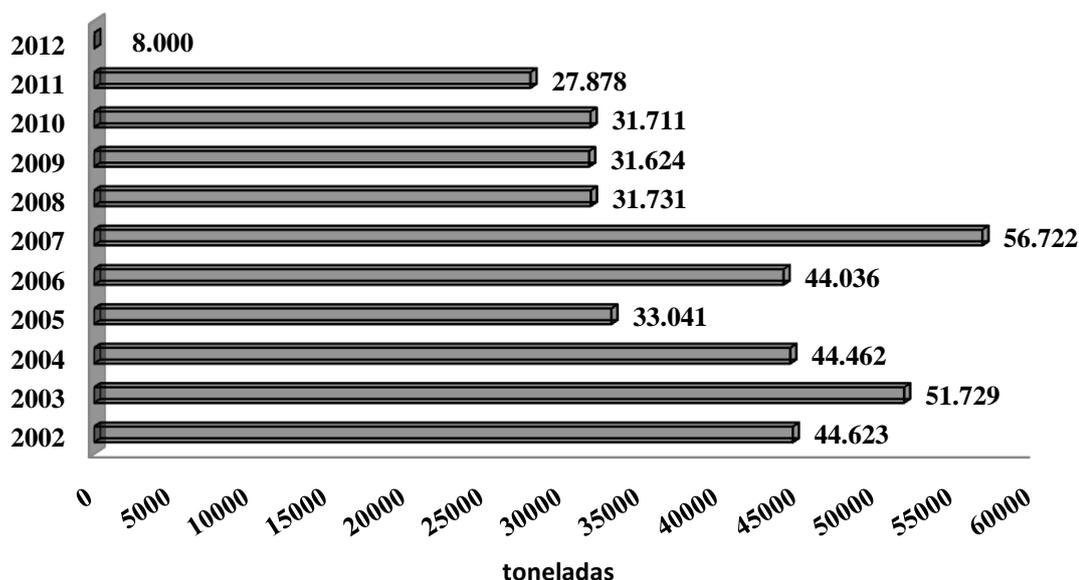


Figura 6: Volume de sardinhas (toneladas) congeladas importadas de 2002 a 2012.

Fonte: Adaptado MDIC, 2015.

Observa-se pelo gráfico que a partir do ano de 2007, onde obteve maior volume de importação, a aquisição de sardinhas congeladas vem diminuindo o decorrer dos anos, chegando a atingir 28.000 toneladas no ano de 2012. Em contrapartida, o volume de sardinha

em conserva (NCM 16041310), apresenta grande aumento no montante importado. Durante o período de 2002 até 2012 houve um crescimento de aproximadamente 94%, chegando a atingir 8.726 mil toneladas. O aumento no preço médio do quilograma da sardinha congelada é um importante fator para a redução no volume importado. Em 2002 o preço médio correspondeu a aproximadamente 0,38 centavos/Kg enquanto que em 2012 o valor foi de 1,16 centavos/Kg. No mesmo período, o preço da conserva importada reduziu de R\$ 2,73 para R\$ 2,68 reais o quilograma (IBAMA, 2011; MDIC, 2015).

A Tabela 3 apresenta os 4 maiores exportadores de sardinha congelada (NCM 03037100) para o Brasil, durante o período entre 2002 e 2012. Em relação às conservas de sardinha (NCM 16041310) importadas, o principal fornecedor é a Tailândia, responsável por aproximadamente 80% da aquisição nacional, durante 2002 à 2012 (MDIC, 2015).

Tabela 3: Maiores exportadores de sardinha congelada para o Brasil durante 2002 a 2012.

Países	US\$	Toneladas
Marrocos	136.666.801	175.422
Venezuela	50.028.689	136.397
Rússia	18.028.797	38.736
EUA	8.589.042	22.846
Outros	16.019.506	397.188
Total	229.332.835	770.589

Fonte: Adaptado MDIC, 2015.

2.2 Composição nutricional das sardinhas

Existem três gêneros de sardinhas: *Sardinella*, *Sardina*, *Sardinops* característicos dos mares tropicais, subtropicais e os oceanos Pacífico e Índico, respectivamente. Entretanto, apesar destes gêneros possuírem composição química diferentes, são consideradas genericamente como sardinhas (IBAMA, 2011).

2.2.1 Teores de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3

Sardinhas são um dos pescados mais consumidos no Mediterrâneo e Brasil (BRASIL, 2011). São pescados ricos em ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (ω 3), especialmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA, 20:5 ω 3) e docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω 3) (SALDANHA *et al.*, 2008). As altas concentrações de EPA e DHA nestes pescados se devem a sua alimentação ser rica em microalgas que possuem em sua composição concentração elevada destes compostos (BROWN *et al.*, 1997).

Estudos mostram a importância de se incluir sardinha na dieta alimentar deva-se a suas altas concentrações de ácidos ω 3 (BANDARRA *et al.*, 1997; VISENTAINER *et al.*, 2000; LUZIA *et al.*, 2003; TARLEY *et al.*, 2004). A inserção de pescados ricos em ω 3 na alimentação promove a prevenção de doenças cardiovasculares e reduzem o risco de desenvolvimento de doenças como Alzheimer, diabetes tipo 2 e câncer de mama (UAUY E VALENZUELA, 2000; HUANG, 2010; BARRINGER & HARRIS, 2012; MALEKSHAHI *et al.*, 2012; RAATZ *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013). Além disso, pode desempenhar papel

importante no desenvolvimento neurológico de recém nascidos, atuando na retina e no cérebro (WAINWRIGHT, 2002; CONNER *et al.*, 2004; INNIS, 2008).

Ácidos graxos ω_3 como o ácido α -linolênico (ALA, 18:3 ω_3), ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 ω_3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω_3) fazem parte da estrutura dos fosfolípídeos das membranas celulares e possuem papel importante no organismo na produção de hormônios, coagulação sanguínea, desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso e regulação de processos metabólicos de transporte e excreção (MARTIN *et al.*, 2006).

No entanto, apesar do organismo humano ser capaz de sintetizar ácidos EPA e DHA a partir do ácido ALA, sua produção é limitada e pode ser afetada por fatores genéticos e enzimáticos (MARTIN *et al.*, 2006). Assim, a ingestão desses ácidos graxos na alimentação é essencial para a manutenção de uma vida saudável. A razão de ω_6/ω_3 na alimentação têm grande influência na produção de ácidos graxos ω_3 (SIMOPOULOS, 2002). Razões elevadas resultam na diminuição da produção do EPA, propiciando assim o desenvolvimento de enfermidades (FERNANDES *et al.*, 2014).

Em geral, a dieta ocidental é definida pela presença de elevada ingestão de ácidos graxos ω_6 e baixa de ácidos ω_3 (SIMOPOULOS, 2002). Possivelmente em detrimento a hábitos culturais e pela grande preferência sensorial dos consumidores pelo consumo de alimentos processados por fritura de forma caseira ou industrial. Atualmente estimam que a razão ω_6/ω_3 na dieta ocidental esteja entre 15:1 e 20:1, entretanto, as recomendações pela *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2008) variam de 5:1 a 10:1.

A redução desta razão ω_6/ω_3 pode ser contribuída pelo aumento do consumo de pescados marinhos, pois estes, quando comparados a peixes de água doce, possuem maiores níveis ácidos graxos ω_3 e reduzidos níveis de ácidos graxos ω_6 , especialmente ácidos linoléico (LA, 18:2 ω_6) e ácido araquidônico (ARA, 20:4 ω_6) (FERNANDES *et al.*, 2014).

A Tabela 4 mostra a comparação entre os teores de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e de ácidos graxos ω_3 (EPA e DHA) em pescados marinhos. Oscilações nos resultados das composições lipídicas se devem em função da espécie, alimentação, fase da vida, época do ano, captura e estocagem (PACHECO-AGUILAR *et al.*, 2000; CARDENIA *et al.*, 2013).

Tabela 4: Comparação dos teores de ácidos graxos poliinsaturados e EPA e DHA de pescados marinhos.

Pescado	Autores	PUFA (mg/100g de óleo)	EPA mg/100g de óleo)	DHA mg/100g de óleo)
Atum	Caponio <i>et al.</i> , (2011)	23,27	-	-
Cavalinha	Candela <i>et al.</i> , (1997)	20,79	4,62	11,97
Salmão	Candela <i>et al.</i> , (1998)	16,79	5,15	7,58
Sardinha	Caponio <i>et al.</i> , (2011)	30,17	8,43	15,53
Sardinha	Saldanha <i>et al.</i> , (2008)	38,00	11,39	16,73

Dentre as espécies citadas, a sardinha possui o maior teor lipídico seguida pelo salmão e a cavalinha. Estes resultados também relatados por Gutierrez & Silva, (1993); Badolato *et al.*, (1994); Bandarra *et al.*, (1997); Tarley *et al.*, (2004) e Loiko, (2011).

De acordo com Bandarra *et al.*, (1997), a sardinha é um pescado cujo os teores lipídicos podem apresentar elevada oscilação devido a variações sazonais. Segundo os autores, as sardinhas param de se alimentar no período anterior a desova, e passam a utilizar

suas reservas lipídicas e protéicas. Os teores de lipídios variam de 1,2% nos períodos entre março à abril, atingindo o máximo de 18,4% entre setembro à outubro.

Estudo realizado por Luzia *et al.*, (2003), avaliaram a influência da sazonalidade na composição lipídica de cinco espécies populares de pescado (sardinhas, corvinas, curimatá, tilápia e camarão). Os autores observaram que os conteúdos lipídicos não apresentaram diferença significativa apesar de terem sido encontrados valores de 4,0g/100g (base seca) no verão e 10,62g/100g (base seca) no inverno. Os teores de colesterol encontrados não foram influenciados pela sazonalidade e apresentaram valores entre 72,6 mg/100g no verão e 86,4 mg/100g no inverno.

Saldanha *et al.*,(2008) estudaram a composição de ácidos graxos em amostras de sardinhas (*Sardinella brasilienses*) armazenadas sob refrigeração durante 120 dias. Observaram que o conteúdo lipídico na forma crua foi 8,9g/100g (base seca). Este resultado foi baixo quando comparado com o encontrado pelos autores Luzia *et al.*,(2003) e Tarley *et al.*, (2004), que obtiveram valores entre 11,65 e 16 g/100 g (base seca) em sardinhas da costa brasileira.

Visentainer *et al.*,(2000) após avaliarem as concentrações de EPA e DHA em cinco pescados marinhos (atum, bonito, olho de boi, cavalinha e sardinha), concluíram que a sardinha e o bonito apresentaram maiores somatórios dos ácidos EPA (18,68%) e DHA (13,77%) sendo considerados uma boa fonte de alimentar de ácidos $\omega 3$.

A quantidade necessária de todos os nutrientes a ser consumida para promover tais benefícios ainda não foi definida completamente, entretanto, segundo a FAO,(2012), o consumo de 150g de pescados ao dia fornece 50 a 60% das necessidades diárias proteicas de um adulto e, segundo recomendações feitas pela *American Heart Association* (AHA, 2002), a ingestão de 200g de pescados com altos teores de ômega $\omega 3$ duas vezes por semana, pode prevenir o aparecimento de doenças cardiovasculares.

2.2.2 Teores de selênio e mercúrio

O consumo de pescados ricos em EPA e DHA, possuem grande importância para o crescimento fetal e desenvolvimento das funções neurológica infantil, sendo um importante alimento para gestantes no período perinatal (FLEITH & CLANDININ, 2005). Todavia, Oken *et al.*,(2003) verificaram que muitas mulheres alegam que apesar dos benefícios que os pescados proporcionam a saúde, justificam que a sua não ingestão devido à preocupação pela contaminação por mercúrio. Além de possuir concentrações elevadas de selênio, EPA e DHA, a ingestão de sardinhas é indicada para mulheres grávidas, idosos e crianças pequenas, por possuir concentrações reduzidas de mercúrio, quando comparada a outros pescados consumidos frequentemente, como a merluza (CARDOSO *et al.*, 2013).

O mercúrio (Hg) ou o metil mercúrio (MeHg), composto orgânico tóxico tem sido identificado em muitos pescados e, como é facilmente absorvido pelo organismo, pode vir a provocar efeitos adversos aos sistemas cerebral e neurológico quando consumido em grandes quantidades (CARDOSO *et al.*, 2013). Estudos sugerem que consumo de alimentos com elevadas concentrações de selênio possam auxiliar o problema de ingestão de mercúrio pelos humanos, pois alegam que a interação destes componentes promove a redução da absorção do mercúrio pelo organismo (TENUA-FILHO *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2013).

Embora estudos epidemiológicos sugiram que os benefícios gerados a saúde humana sejam advindos principalmente da composição lipídica dos pescados, pesquisas também sugerem que presença de aminoácidos não essenciais como taurina, minerais como iodo e selênio e vitaminas como a D e B₁₂ também auxiliam na prevenção de doenças (LUND, 2013).

De acordo com Teneda-filho *et al.*, (2010) a sardinha, quando comparado a outros pescados marinhos, apresentou maior concentração de selênio, de aproximadamente (0,64mg/kg) seguida da corvina (0,62mg/Kg), cação (0,45mg/Kg) e pescada (0,30mg/Kg). Ferreira *et al.*, (2002) quantificaram o conteúdo de selênio em pescados processados e consumidos no Brasil., encontrando valores de 0,525 mg/Kg para atum “sólido” enlatado, 0,460 mg/Kg para sardinhas enlatadas em óleo e de 0,809 mg/Kg para sardinha enlatada em molho de tomate. O que evidencia que sardinha processada é uma boa fonte de selênio.

O selênio é um mineral essencial à nutrição humana, reconhecido como antioxidante celular responsável pela prevenção de doenças cardíacas e câncer (CARDOSO *et al.*, 2013). De acordo, com IOM, (2000) a ingestão diária necessária de selênio para adultos é de 55 µg. Em geral, quando comparados a outros tipos de carnes, os pescados possuem substancialmente maiores concentrações de selênio. Logo, o consumo de pescados ricos em selênio, como a sardinha, representam uma boa alternativa para fonte deste mineral.

2.3 Esterilização comercial de sardinhas

Por se tratar de um alimento altamente perecível, a utilização de métodos de conservação ajudam a promover o aumento da vida útil de pescados facilitando sua comercialização. Dentre as técnicas de conservação mais utilizadas pela indústria alimentícia estão a elaboração de conservas de peixes.

A esterilidade comercial tem por objetivo expor o produto a determinado tempo e temperatura necessários para promover a destruição microbiana e promover o aumento da vida útil do produto. O processamento térmico deve ser baseado em rigorosos requisitos de segurança alimentar, condições econômicas, dimensionamento de equipamentos e visar máxima retenção das qualidades nutricionais dos alimentos (RHODEHAMEL *et al.*, 1992; STOFOROS, 1995).

A esterilização consiste em aquecer o alimento em recipientes hermeticamente fechados em autoclaves pressurizadas a temperatura de 121°C por tempo suficiente para destruição de micro-organismos patogênicos. Em alimentos com pH superior à 4,5 unidades, como em produtos a base de pescados, o tratamento térmico deve alcançar no mínimo uma redução de 12 ciclos logarítmicos (Tabela 5), tendo como microrganismo alvo o *Clostridium botulinum* (STOFOROS, 1995).

A produção de conservas de peixes são uma grande alternativa para indústria alimentícia por serem produtos seguros, de extensa vida de prateleira fácil estocagem e transporte. Além de serem práticos para o consumo e serem processados em embalagens sustentáveis (FEATHERSTONE, 2012).

De acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de conservas de peixes (Instrução normativa SDA nº 45, de 13 de dezembro de 2011) o tratamento térmico necessário à conservas de peixes se define como (ANEXO A):

Esterilidade comercial: estado que se consegue aplicando calor suficiente, só ou em combinação com outros processos de conservação de alimentos, que assegure a destruição das formas viáveis de micro-organismos patogênicos e de outros organismos capazes de alterar o produto e que possa multiplicar-se em condições normais de armazenamento e distribuição.

Para a produção de sardinhas em conservas o Regulamento Técnico fixa a identidade e as características mínimas de qualidade que devem apresentar as conservas para sua comercialização (Instrução Normativa SDA Nº 22 DE 11/07/2011 (Federal) (ANEXO B) define:

Conservas de sardinhas são produtos elaborados a partir de matéria-prima de espécies abrangidas por este regulamento, fresca ou congelada, descabeçada, eviscerada, com exceção de gônadas e rins, acrescidos de meio de cobertura, acondicionados em um recipiente hermeticamente fechado e que tenham sido submetidos a um tratamento térmico que garanta sua esterilidade comercial.

A esterilização, além de promover a destruição de esporos bacterianos, tem como objetivo agregar aspectos desejados ao produto final, como amolecimento da espinha e melhoria da textura do produto.

Pescados enlatados são produtos de baixa acidez (pH >4,5) e elevada atividade de água ($A_w > 0,97$), fatores que oferecem riscos potenciais de proliferação bacteriana, como de *Clostridium botulinum*, razão pela qual medidas extremas de segurança devem ser adotadas no seu processamento (JAY, 2005). O *Clostridium botulinum* é uma bactéria esporogênica que sob condições como a ausência de oxigênio e pH acima de 4,5 permitem sua germinação e conseqüentemente produção da toxina botulínica (FDA, 2013). Logo, para que esses alimentos sejam considerados seguros microbiologicamente são necessários que sejam cumpridos determinados parâmetros de tratamento térmico (JAY, 2005).

O tempo de morte térmica (TDT- *thermal death time*) é o tempo necessário para eliminar determinado número de micro-organismos a uma determinada temperatura específica, baseado em alguns parâmetros intrínsecos como, o valor D do microrganismo. O valor D consiste no tempo em minutos necessários para eliminar 90% de microrganismo em uma determinada temperatura. O valor D do *Clostridium* a temperatura de 121,1°C é 0,21 min (FDA, 2013).

Contudo, devido à preocupação em garantir a segurança dos alimentos processados microbiologicamente, geralmente os processos térmicos são superestimados, através da exposição do produto a elevadas temperaturas por um tempo acima do necessário, promovendo assim uma grande margem de segurança. Assim, convencionou-se que indústrias de pescados enlatados devem aplicar tratamento equivalente a 12D ou 12 log como mínimo de processo (Tabela 5).

Tabela 5: Reduções de 12 ciclos logarítmicos para eliminação de bactérias.

Nº D (log)	Nº de bactérias vivas	Nº de bactérias mortas
1	1.000.000.000	-
2	100.000.000	900.000.000
3	10.000.000	90.000.000
4	1.000.000	9.000.000
5	100.000	900.000
6	10.000	90.000
7	1.000	9.000
8	100	900
9	10	90
10	1	9
11	0,1	0,9
12	0,01	0,09

O tratamento 12D refere-se ao processamento o térmico de letalidade necessário para reduzir a probabilidade de sobrevivência do esporo mais resistente do *Clostridium botulinum* para 10^{-12} (FDA, 2013).

Desta forma, faz-se necessário a utilização do conceito de F_0 , trata-se de calor letal integrado recebido em todos os pontos de um recipiente durante o processamento onde é padronizado o tempo necessário, em minutos, para destruir esporos ou células vegetativas de um alimento (FDA, 2013). No tratamento 12D, o F_0 será igual a 2,52 minutos, como mostrado abaixo.

$$\begin{aligned} F_0 &= D (\log a - \log b) \\ F_0 &= 0,21 (\log 1 - \log 10^{-12}) \\ F_0 &= 0,21 \times 12 \\ F_0 &= 2,52 \text{ minutos} \end{aligned}$$

Figura 7: Equação do cálculo do F_0 à partir do 12D.

Assim, convencionou-se utilizar como intensidade mínima suficiente para eliminação até níveis seguros do micro-organismo *Clostridium botulinum* F_0 de aproximadamente 3 minutos a 121,1°C (JAY, 2005).

No Brasil, o valor de F_0 (variável capaz de expressar as intensidades do binômio tempo x temperatura do tratamento térmico considerando parâmetros do processo e matriz alimentar avaliada, não é devidamente regulamentado. De acordo com o boletim do Conselho Regional de Medicina Veterinária do estado do Rio de Janeiro (CRMV/RJ, 2008), a próxima Revisão do Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) deverá trazer regulamentação genérica acerca de conservas cárneas esterilizadas, exigindo F_0 mínimo de 3,0 minutos. No entanto, para o processamento de sardinhas esterilizadas, essa regulamentação é insuficiente, uma vez que o processo térmico deve promover também o amaciamento da espinha, que ocorre em patamares de F_0 bem superiores a esse valor. A definição do tempo de exposição do produto é determinado unicamente pelo fabricante, que tem a liberdade de padronizar estes tempos considerando os custos, características sensoriais, segurança do alimento e capacidade de operação de seus equipamentos. O processamento pode acarretar consequências ao produto como perda de nutrientes, alteração na cor, textura, sabor e aceleração do processo de oxidação lipídica.

Durante o preparo térmico, ocorrem reações químicas e físicas que alteram o valor nutricional do alimento, como o aumento da digestibilidade devido à desnaturação das proteínas ou redução dos teores de compostos termolábeis como as vitaminas lipossolúveis e os ácidos graxos poliinsaturados (GARCÍA-ARIAS *et al.*, 2003). Também pode favorecer a separação de componentes como observado pelo autores GARCIA ARIAS *et al.*, (1991); LAGO & ANTONIASSI, (2000) e TARLEY *et al.*, (2004) que verificaram que após o processamento de sardinhas em conservas os ácidos graxos característicos das sardinhas $\omega 3$ (EPA e DHA) haviam migrado para os líquidos de cobertura das conservas.

A literatura reporta que a extensão de processos de degradação de nutrientes em alimentos é diretamente proporcional à intensidade do processamento térmico dado, logo, é observado que a qualidade nutricional, sensorial e microbiológica de um alimento esta implicitamente relacionado com a intensidade do processamento térmico de produtos enlatados (SALDANHA *et al.*, 2006; SALDANHA *et al.*, 2007; SALDANHA *et al.*, 2008). Assim sendo, a avaliação do mesmo é importante para conseguir garantir um produto seguro e saudável

Entretanto, quando o processamento inclui alimentos como sardinha, ricos em componentes termosensíveis, como ácidos graxos $\omega 3$ e colesterol, o uso de antioxidantes durante seu processamento pode ser uma alternativa para retardar a oxidação lipídica e a perda desses componentes (JACOBSEN *et al.*, 2008).

Nas indústrias brasileiras processadoras de conservas de sardinhas, comumente são empregados diferentes líquidos de cobertura, utilizados com o intuito de melhorar a troca térmica durante a esterilização e as características sensoriais do produto. Entre os líquidos de cobertura mais utilizados, destaca-se o molho de tomate.

Molho de tomate é considerado uma boa fonte de antioxidantes naturais devido a presença de compostos como ácido ascórbico e carotenoides (BORGUINI & TORRES, 2009). É possível, que o uso do molho de tomate em conservas de sardinhas possam desempenhar função antioxidante e proteção aos ácidos ω 3 das conservas de sardinhas. Pesquisas elucidam que sardinhas em conserva com molho de tomate possuem teor de ácidos ω 3 superior a sardinhas em conservas com óleo de soja (TARLEY *et al.*, 2004; MIGUEIS, 2010).

Tarley *et al.*, (2004) avaliaram sardinhas enlatadas comercializadas no Brasil adicionadas de óleo de soja e molho de tomates como líquidos de cobertura. Verificaram que as diferentes composições não influenciaram nos teores de ácidos graxos e colesterol presentes nos pescados. No entanto, em relação as concentrações de EPA e DHA, os autores observaram maiores concentrações nos pescados adicionados de molho de tomate.

Segundo Migueis, (2010), o consumo de 250 gramas de sardinhas adicionadas de molho de tomate por dia, conferem um nível desejável de proteção contra doenças cardiovasculares em seres vivos, devido à elevadas concentrações de DHA (22:6 ω -3) e EPA (20:5 ω -3) presentes na sardinha e das altas concentrações de licopeno do tomate.

Loiko, (2011) observou que sardinhas enlatadas adicionadas de molho de tomate apresentaram teores dos ácidos graxos EPA e DHA superiores aos encontrados em sardinhas enlatadas adicionadas de óleo como líquido de cobertura.

Colembergue *et al.*, (2011) testaram sensorialmente amostras de sardinhas enlatadas adicionadas de molho de tomates. Os autores verificaram que 54% dos julgadores tinham o hábito de consumir sardinha em conserva nas refeições. Também observaram uma aceitabilidade de 84% do produto estudado, concluindo que as sardinhas avaliadas têm potencial de impulsionar o consumo deste pescado no Brasil.

De acordo com USDA, (2012), as sardinhas enlatadas adicionadas de molho de tomate possuem teores superiores de EPA e DHA quando comparadas as sardinhas adicionadas de óleo e a outros pescados enlatados (Tabela 6).

Tabela 6: Ômega-3 (g/100g) contido em pescados enlatados fabricados nos Estados Unidos.

Tipo de peixe processado	Total de ômega-3	EPA	DHA
Sardinha do Pacífico enlatada e com líquido de cobertura molho de tomate	1,457	0,532	0,864
Sardinha do Atlântico enlatada e com líquido de cobertura óleo	0,982	0,473	0,509
Atum light enlatado e com líquido de cobertura água	0,228	0,028	0,196

EPA = Ácido eicosapentaenóico (g/100 g de lipídeos); DHA = Ácido docosahexaenóico (g/100 g de lipídeos)
 Fonte: Adaptada USDA,2012.

No entanto, é comum observar o descarte dos líquidos de cobertura das conservas de sardinhas pelos consumidores antes ou durante o consumo, possivelmente por desconhecerem a qualidade nutricional destes (COLEMBERGUE *et al.*, 2011). Assim, o estudo sobre a qualidade do molho de tomate utilizado nas conservas de sardinha deve ser incentivado, no intuito de esclarecer a população sobre os benefícios que o seu consumo pode favorecer.

2.4 Composição do molho de tomate

2.4.1 Polpa de tomate

O tomate (*Lycopersicon esculentum L.*) é um dos produtos hortícolas mais produzidos mundialmente, com produção de 162 milhões de toneladas em 2012 e o segundo mais consumido no mundo, após a batata (FAOSTAT, 2012). O tomate possui alto teor de umidade, baixa concentração lipídica, carboidratos, como frutose e glicose, além de traços de minerais como potássio, fósforo e ferro (PINELA *et al.*, 2012). A produção de derivados de tomate é uma importante alternativa tecnológica para seu consumo, visto que, o fruto contém elevada atividade de água apresentando curta vida útil. Portanto, o processamento industrial possibilita que um número maior de pessoas consumam o fruto, agregando melhorias sensoriais e nutricionais aos alimentos.

Na América do Sul, o Brasil destaca-se como o maior produtor de tomate utilizado para produção de derivados, sendo também o maior consumidor dos mesmos (DE MELO & VILELA, 2005). Segundo Motilva *et al.*, 2014 grande porção dos tomates produzidos, são consumidos na forma de produtos industrializados, como polpas e molhos de tomate.

O processamento industrial da polpa de tomate inclui etapas de processamento como trituração, inativação enzimática, concentração e esterilização. Esses tratamentos reduzem o conteúdo de umidade e proporcionam ao produto nova aparência, textura e viscosidade (CAPANOGLU *et al.*, 2008). Polpas industriais possuem duas classificações conhecidas como *hot break* e *cold break*. Estas se diferem pelo processamento sofrido e pelos parâmetros de qualidade como teor de sólidos solúveis (°Brix), viscosidade e coloração. Polpas *hot break*, diferentemente das *cold break*, são submetidas a uma etapa de pré- aquecimento a temperaturas mais elevadas, entre 97°C a 102°C. Este pré-tratamento promove a inativação das enzimas pectinametilsterase (PME) e poligalacturonase (PG), importantes no amadurecimento e textura dos tomates (CHANFORAN *et al.*, 2012; VALLVERDÚ-QUERALT *et al.*, 2012). Esta inativação proporciona à polpa *hot break* elevada viscosidade, alto teor de sólidos solúveis e cor intensa e, devido a isso, polpas *hot break* são comumente utilizadas para a fabricação de molhos de tomate, pois ao serem diluídas proporcionam a formação de produto espesso com melhores atributos sensoriais.

Pesquisas sugerem que tomates e seus derivados são uma excelente fonte de antioxidantes oriundos da presença de vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos (MOTILVA *et al.*, 2014). No entanto, o teor de antioxidantes em produtos derivados de tomate podem variar de acordo com a matéria-prima e condições de plantio, como clima, solo e à irrigação que foram submetidas (DE MELO & VILELA, 2005).

2.4.2 Ácido ascórbico

Tomates são considerados uma boa fonte de ácido ascórbico e sua ingestão está relacionada a prevenção de doenças, devido sua capacidade de neutralização de radicais livres nos sistemas biológicos (BORGUINI & TORRES, 2009).

Abushita *et al.*, (1997) e Davey *et al.*, (2000) avaliaram teores de vitamina C em tomates de diferentes cultivares e verificaram que as concentrações de vitamina C variavam

de 15 a 21mg/100g em base úmida. Os autores atribuíram que as oscilações dos teores de ácido ascórbico encontrados no estudo foram advindos a diferenças nas maturidades dos frutos e a diferentes estações do ano em que foram coletados (DAVEY *et al.*, 2000).

Por se tratar de um composto termosensível, o ácido ascórbico é facilmente degradado em presença de calor (DAVEY *et al.*, 2000). Dewanto *et al.*, (2002) observaram que após submeter tomates ao aquecimento a temperatura de 88°C por 2, 15 e 30 minutos o teor de ácido ascórbico dos tomates decaiu em 0,53%, 15,79% e 28,95% respectivamente. Capanoglu *et al.*, (2008) também verificaram perda de vitamina C decorrentes do processamento de polpa de tomate no processo *cold break*. Os autores ainda observaram que o processamento térmico de pasteurização da polpa resultou em perda significativa de 34% de vitamina C.

2.4.3 Carotenoides

Carotenoides são pigmentos biosintetizados por plantas, algas não oceânicas, fungos e bactérias. Possuem papel fundamental tanto em vegetais na captação de energia e na proteção de processos oxidativos. Possuem como estrutura básica moléculas de isopreno (Figura 8) unidas por sistema de ligações duplas conjugadas definido como cromóforo (O'NEIL & SCHWARTZ, 1992).

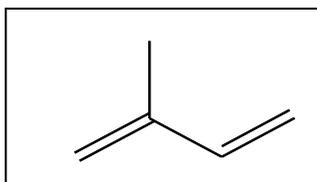


Figura 8: Forma estrutural do isopreno.

O comprimento do cromóforo determina o espectro de absorção e a cor da substância. Para que haja produção de cor, um carotenoide precisa ter ao menos sete duplas ligações conjugadas e, a medida que o número de ligações duplas aumentam, ocorre mudanças na coloração do carotenoide, devido ao deslocamento no espectro de absorção em virtude da mudança na estrutura da molécula. Na região do cromóforo, os elétrons são deslocados ao longo da cadeia isoprênica proporcionando aos compostos, além da capacidade de absorção de energia, elevada reatividade e suscetibilidade a oxidação (BRITTON, 1995).

Os carotenoides são classificados segundo sua estrutura química (Figura 9). Quando constituídos apenas por hidrocarbonetos são classificados como carotenos e, quando possuem um ou mais grupos funcionais oxigenados classificam-se como xantofilas (BRITTON, 1995)

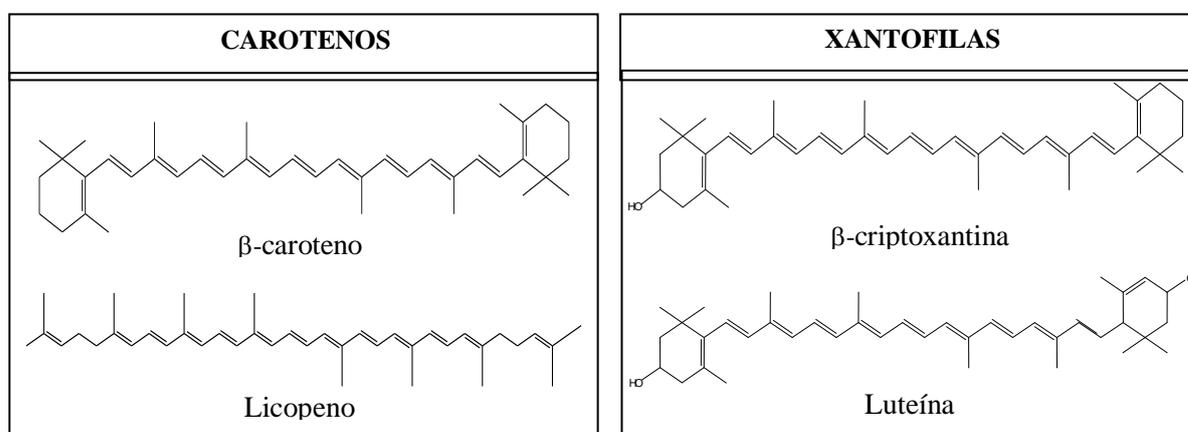


Figura 9: Estruturas químicas de carotenos e xantofilas.

2.4.3.1 Capacidade antioxidante dos carotenoides

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) são inevitavelmente geradas durante o metabolismo celular aeróbico e possuem grande importância no funcionamento do organismo, como na fagocitose, onde essas espécies são produzidas para eliminar agente agressor (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Entretanto, quando sua produção é exacerbada, ocasionada devido a pré-disposições genéticas, desequilíbrio imunológico e estresse, podem ocasionar mutações gênicas e distúrbios metabólicos, por isso o organismo deve dispor de um eficiente sistema antioxidante enzimático e não enzimático para restabelecer o equilíbrio.

Diversos tipos de ERO podem ser continuamente produzidas nas células. Podem ser gerados durante o metabolismo aeróbico nas mitocôndrias, enzimaticamente pelas NAD oxidases ou mesmo na formação de hidroperóxidos, podem ser catalizadas devido a clivagem dos fosfolipídios e a presença do Fe^{+2} livre, originado da degradação das proteínas heme das carnes (CARLSEN *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo gerado pela formação excessiva de espécies radiculares, proporciona desequilíbrio entre sistemas pró e antioxidantes do organismo, propiciando o aparecimento de doenças. Assim, para que seja reduzido este processo, estudos sugerem que a ingestão de alimentos ricos em substâncias antioxidantes, como carotenoides para auxiliar este equilíbrio biológico.

Segundo Rao e Agarwal, (1999) carotenos são grande auxiliares na prevenção de doenças como câncer e doenças cardíacas, pois possuem elevado potencial antioxidante devido sua capacidade de seqüestrar ERO, oxigênio singlete e radicais livres (CONN *et al.*, 1991; EDGE *et al.*, 1997 e KRINSKY & YEUM, 2003). Sua capacidade antioxidante está relacionada ao sistema de ligações duplas que permitem aos compostos, a habilidade de interferirem na etapa de propagação da oxidação lipídica, devido a estabilização da molécula ocasionada por ressonância dos radicais lipídico-peroxil formados durante o estresse oxidativo biológico e durante o processamento térmico de alimentos (CONN *et al.*, 1991).

Em relação à eficácia na desativação dos radicais livres e potencial antioxidante, destacam-se o β -caroteno e o licopeno (ABUSHITA *et al.*, 1997). Estudo realizado também por Conn *et al.*, (1991) e Tinkler *et al.*, (1994) identificaram o licopeno como o carotenoide mais eficiente no sequestro do oxigênio singlet e na proteção de células humanas. O autores Liu *et al.*, (2008) estudaram a capacidade antioxidante de soluções mistas que continham β -caroteno e licopeno e soluções isoladas de ambos. Os resultados sugeriram que as propriedades antioxidantes da solução contendo a mistura dos dois carotenos foi substancialmente superior a atividade antioxidante dos dois avaliados isoladamente. Assim, sugeriram que o consumo de alimentos e formulação de produtos com esses dois carotenos podem ser boas alternativas para consumo de antioxidantes.

No entanto, apesar dos benefícios proporcionados pela ingestão de carotenoides, o consumo de alimentos ricos nesses componentes no Brasil ainda é baixo. Pesquisa realizada pelos autores Amancio e Silva, (2012) avaliaram o consumo de carotenoides pela população brasileira, de acordo com sexo, regiões e condições financeiras. Utilizaram como base de dados informações da Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), envolvendo 34.003 indivíduos com idade acima de 10 anos. Concluíram que os maiores consumidores de alimentos fonte de carotenoides foram do sexo feminino, moradores do meio urbano e habitantes da Região Sul. Com os resultados, sugeriram que o consumo de alimentos com carotenoides devem ser incentivados, pois observaram que o consumo médio *per capita* de carotenoides totais no Brasil é de 4.12 μ g/dia, valor este, muito inferior ao sugerido pelo Instituto de Medicina e pelos pesquisadores Rao e Shen, (2002) que consideram como níveis prudentes para consumo

diário de carotenoides totais de 9 a 18 mg, sendo de 3 a 6mg de β -caroteno e 5 a 10mg de licopeno.

2.4.3.2 β -caroteno

O consumo de frutas, vegetais e suplementos enriquecidos com β -caroteno tem sido objeto de diversos estudos, possivelmente, devido suas propriedades antioxidantes estarem relacionadas à prevenção de doenças como câncer e por ser um dos carotenos mais encontrados no plasma e tecidos humanos (STEINMETZ & POTTER, 1996; IOM, 2000; CONDRON *et al.*, 2014; YI *et al.*, 2015).

Entre os carotenoides, o β -caroteno é o segundo em concentração em tomates, e o único a apresentar atividade pró-vitáminica A. O β -caroteno é um micronutriente lipossolúvel, em teoria cada molécula deste composto pode ser convertida em duas moléculas de retinol (vitamina A). Seu consumo é importante na alimentação humana, pois a carência de vitamina A pode acarretar distúrbios visuais, deficiência no desenvolvimento de órgãos e, na manutenção do sistema imunológico (WEBER & GRUNE, 2012). No entanto, para que o carotenoide seja precursor de vitamina A é necessário possuir pelo menos um anel β -ionona não substituído e cadeia lateral poliênica com um mínimo de 11 carbonos (Figura 10).

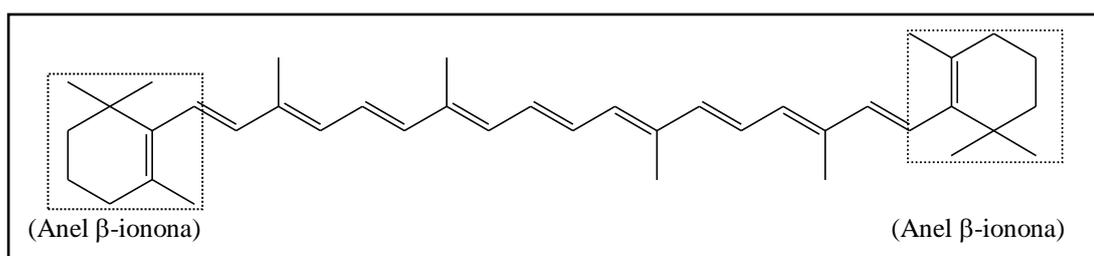


Figura 10: Forma estrutural do β -caroteno.

Estudos sugerem que o consumo de alimentos fonte de β -caroteno são indicados, pois este composto é capaz de interagir com radicais livres agindo como um protetor para células humanas, melhorando o sistema imunológico e prevenindo doenças imunodeficientes (BENDICH, 1989; YI *et al.*, 2015).

Estudo realizado por Bonnie, (1999) indicam que a estabilidade do β -caroteno possa ser influenciada pela temperatura de aquecimento, concentração de oxigênio e presença de luminosidade. Entretanto, segundo os autores, Mayer-Miebach *et al.*, (2005) o fator que mais impacta na degradação deste composto é a presença de oxigênio. Esta conclusão foi obtida, após observaram que cenouras aquecidas sob condições atmosféricas a temperaturas superiores a 90°C obtiveram perdas significativas de mais de 20% deste caroteno, no entanto, após avaliarem o aquecimento a mesma temperatura sob condições de vácuo não observaram degradação do mesmo.

2.4.3.3 Licopeno

A Figura 11 ilustra a estrutura química do licopeno. Este composto apresenta 11 ligações duplas conjugadas, 2 não conjugadas e ausência de atividade pró-vitáminica A, constituindo como o carotenoide mais abundante no tomate e em produtos derivados. Segundo Di Mascio *et al.*, (1989) a ausência do anel β -ionona neste pigmento, promove a ele

maior capacidade de sequestro de radicais livres quando comparado a outros carotenoides como, astaxantina, cantaxantina e β -caroteno.

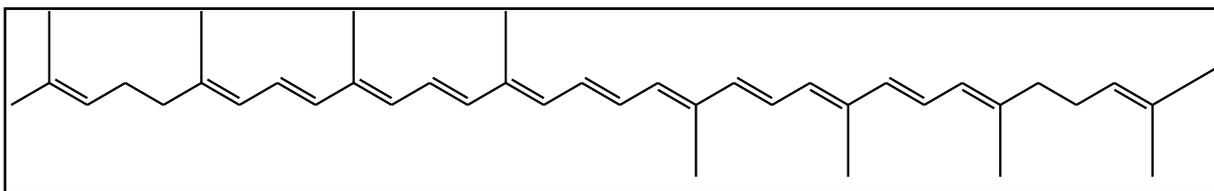


Figura 11: Forma estrutural do licopeno ($C_{40}H_{56}$).

O consumo de alimentos ricos em antioxidantes pode ser uma excelente alternativa a prevenção doenças. visto que, cerca de 50% dos casos de doenças originadas sejam advindos da alimentação pobre nestes componentes (WILLIAMS *et al.*, 1999). Segundo os autores Cook-Mozaffari *et al.*, (1979); Steinmetz e Potter, (1996); Clinton, (1998) e Giovannucci, (1999) a ingestão de tomate e seus derivados pode diminuir em 40% o risco de desenvolvimento de câncer de esôfago, além de reduzir o risco de desenvolvimento de diversas outras doenças, como, câncer de próstata, pulmão, mama, boca, colo de útero e doenças cardíacas.

Entretanto, apesar do licopeno ser um dos carotenoides mais encontrados no plasma sanguíneo, este composto não é sintetizado pelo organismo humano, sendo sua concentração sérica dependente exclusivamente da dieta alimentar (TINKLER *et al.*, 1994; BLUM *et al.*, 2005). Pesquisa realizada por Rao e Shen, (2002) verificou que o consumo de 5 a 10 mg de catchup por doze indivíduos durante o período de duas semanas aumentou significativamente o nível sérico de licopeno e reduziu a peroxidação lipídica. Os pesquisadores sugeriram que a ação antioxidante do licopeno no organismo esteja relacionada à capacidade de proteção das lipoproteínas (HDL e LDL) da oxidação. Abete *et al.*, (2013) estudaram os efeitos do consumo do molho de tomate contendo diferentes concentrações de licopeno (12 e 27mg/100g) na redução dos níveis de colesterol LDL e de estresse oxidativo. Para realização da pesquisa os pacientes foram divididos em dois grupos, porém ambos mantiveram alimentação saudável e praticaram atividades físicas regularmente. O grupo 1 deveria ingerir diariamente 160g de molho contendo 12mg de licopeno, o grupo 2, ingeriram a mesma quantidade de molho, porém com 27mg de licopeno. Os autores observaram que apesar da ingestão de licopeno por cada grupo ter sido diferente, 85% dos testes concluíram que o consumo regular de molho de tomate rico em licopeno reduziu significativamente os níveis de colesterol LDL sanguíneo em ambos os grupos.

Apesar dos avanços nas pesquisas, as quantidades mínimas de consumo de licopeno para obtenção de benefícios deste nutriente ainda são conflitantes. Estudos realizados por Rao e Shen, (2002) sugeriram o consumo médio para se obter atividade antioxidante *in vivo* é de 5 a 10mg de licopeno/dia. Já, Porrini e Riso, (2005), após realizarem uma extensa revisão bibliográfica sobre a ingestão diária de licopeno recomendada em países da Europa, Estados Unidos, Canadá e Austrália, verificaram que os teores recomendados variaram entre 3,8 mg a 8,54 mg de licopeno/dia. Observaram que em ordem decrescente, os países que indicam o maior consumo de licopeno são os Estados Unidos seguido do Canadá, Holanda, França e Irlanda. Em resumo, concluíram que o consumo de 6mg/dia de licopeno aumenta a concentração deste composto no plasma sanguíneo fornecendo proteção antioxidante ao organismo.

A quantificação da ingestão de licopeno/dia é de difícil mensuração, pois a biodisponibilidade do composto depende de vários fatores como: hábitos alimentares, metabolismo celular, pré-disposições genéticas, método de preparação dos alimentos,

concentração do componente, meio em que esta dissolvido o licopeno (PORRINI & RISO, 2005; MORITZ & TRAMONTE, 2006).

Nos países mediterrâneos e nos continentes Norte e Sul da América, produtos derivados de tomate são os que mais contribuem significativamente para ingestão do licopeno na alimentação (RAO & SHEN, 2002; DE MELO & VILELA, 2005). Entretanto, a concentração de licopeno em produtos derivados do fruto pode apresentar oscilações, pois dependem das condições de plantio, clima, maturação dos tomates usados como matéria prima, além de serem dependentes das condições de processamento térmico (binômio tempo-temperatura) aplicado. Os autores Kobori *et al.*, (2010) avaliaram o teor de licopeno presente em produtos derivados de tomate produzidos no Brasil e verificaram que os teores encontrados em extratos de tomates, catchup, polpa e molho de tomate variaram de 18,8 a 26mg/100g, 11,1 a 20,3mg/100g; 7,7 a 11,7mg/100g e 9,3 a 11,2 mg/100g de licopeno em base úmida respectivamente. Os pesquisadores concluíram que a melhoria da tecnologia de processamento no Brasil tem contribuído para obtenção de produtos com grandes concentrações de carotenoides.

Stahl e Sies, (1992) estudaram a biodisponibilidade em suco de tomate não aquecido e aquecido com 1% de óleo de soja. Os autores tinham por objetivo verificar se a característica lipossolúvel do licopeno auxiliaria na melhor biodisponibilidade do composto ingerido. Observaram que, a concentração de licopeno no plasma sanguíneo aumentou em indivíduos que haviam ingerido o suco processado com óleo de soja. Assim, concluíram que tanto o processamento quanto a presença lipídica no suco analisado favoreceu a melhor absorção deste nutriente pelo corpo. Estudo realizado por Unlu *et al.*, (2005) mostrou resultado similar, onde verificaram que a absorção do licopeno e β -caroteno foram maiores quando adicionado como fonte lipídica o abacate ao alimento.

2.4.3.4 Efeitos do processamento térmico

O tratamento térmico pode promover redução dos teores de carotenoide via isomerização e/ou oxidação dos compostos (COLE E KAPUR, 1957; SHI *et al.*, 2000).

Isômeros são substâncias que apresentam mesma fórmula molecular, no entanto, possuem diferentes arranjos entre os átomos proporcionando a estes, diferentes formas estruturais (O'NEIL & SCHWARTZ, 1992). O licopeno é capaz de formar isômeros geométricos designados como E e Z usualmente equivalentes a *trans* e *cis*. (SHI *et al.*, 2000).

A conformação *trans* é predominante encontrada na natureza em virtude de sua baixa energia de conformação, devido as ligações duplas serem coplanares possuindo maior estabilidade, além de possuir menor impedimento estérico (BRITTON, 1995). No entanto, no plasma e tecidos vivos, o isômero *cis* é encontrado em maior extensão (SHI *et al.*, 2000; BOILEAU *et al.*, 2002; UNLU *et al.*, 2005). A possível explicação para isto é que a forma isomérica *cis* seja mais biodisponível, devido sua estrutura ser mais curta e não linear, facilitando sua melhor solubilidade e transporte nas micelas (BOILEAU *et al.*, 2002 ; BOON *et al.*, 2010).

A isomerização do licopeno pode ser ocasionada por diferentes fatores, como processamento térmico, mudanças no pH e exposição do composto a iluminação (DEWANTO *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2008). Pesquisa realizada por Shi *et al.*, (2008) verificaram que processamento térmico de polpa de tomate a temperatura de 121°C por 1 hora e a 80°C por 2 horas, permitiu a formação de isômeros *cis* em 18,2% e 35,4% respectivamente. Os autores concluíram também, que a presença de luminosidade favoreceu a formação de isômeros *cis*.

Pesquisas feitas por Shi & Le Maguer, (2000) verificaram que o tomate fresco não continha isômeros *cis*, entretanto, ao processá-los a elevadas temperaturas, foi observado isomerização do composto. Resultado este, similar ao encontrado pelos autores Mayer-Miebach *et al.*, (2005) que observaram isomerização mais acentuada em cenouras quando aquecidas junto a óleo vegetal.

Os principais isômeros *cis* licopeno encontrados em alimentos processados são 15-*cis*, 13-*cis* e 9-*cis* (BRITTON, 1995; MAYER-MIEBACH *et al.*, 2005) (Figura 12). Isômeros *cis* são consideráveis mais instáveis termodinamicamente quando comparados a isômeros *trans* devido à proximidade dos grupos radicais que ocasionam uma maior repulsão de elétrons, tornando-os mais instáveis. No entanto, poucos trabalhos elucidam a estabilidade molecular entre os isômeros *cis* do licopeno. Chasse *et al.*, (2001) e Lambelet *et al.*, (2009) estabeleceram a ordem de estabilidade: 5 *cis* mais estável seguido de 9-*cis*, 13-*cis*, 15-*cis*, 7-*cis* e 11-*cis*.

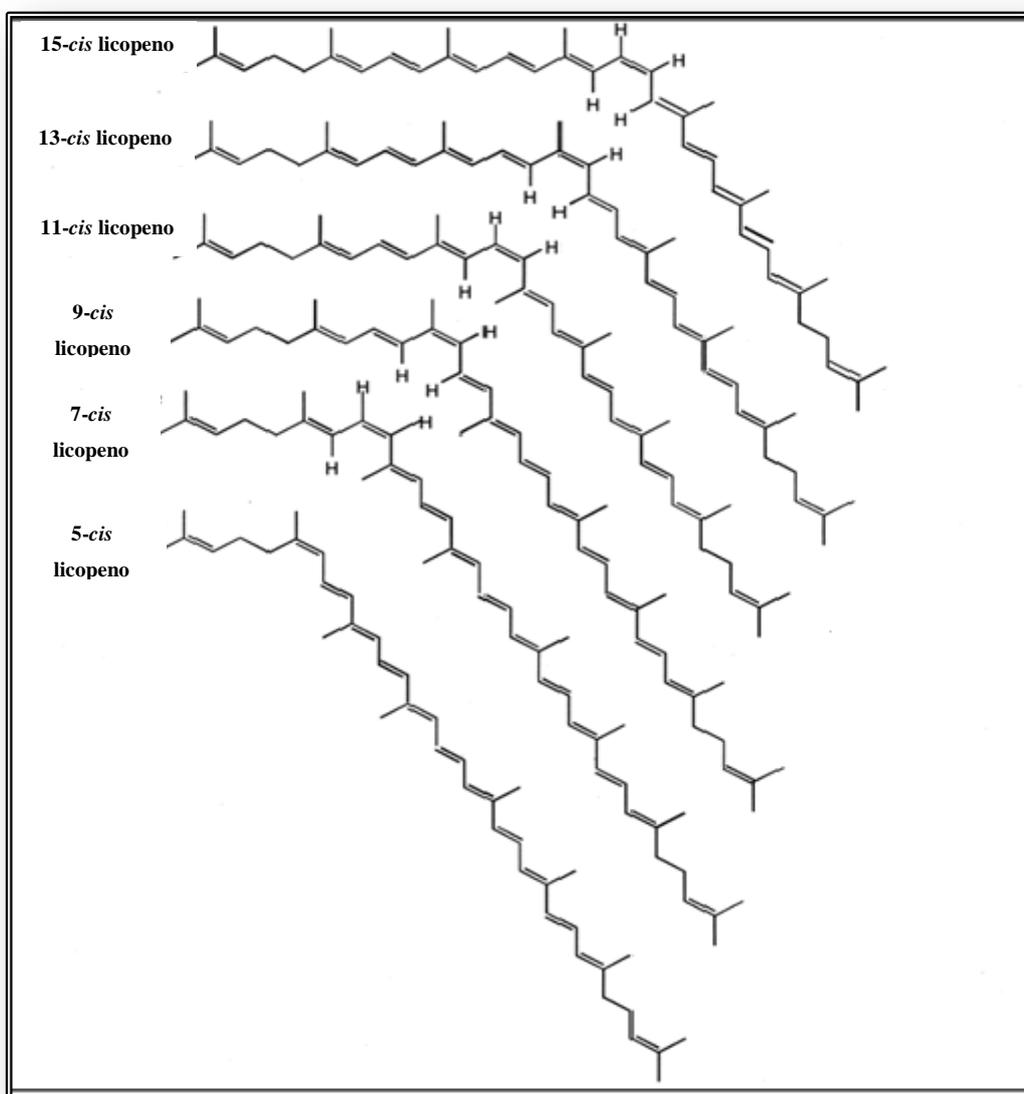


Figura 12: Estrutura dos *cis*-isômeros do licopeno mais encontrados em produtos processados termicamente. Fonte: Adaptado CHASSE *et al.*, 2001.

Quanto à capacidade antioxidante das formas isoméricas do licopeno, os resultados encontrados na literatura são conflitantes. Bohm *et al.*, (2002) sugerem que isômeros *cis* possuem melhor capacidade de seqüestro de radicais livres que isômeros *trans*, entretanto Zou *et al.*, (2014) afirma que ambas as formas geométricas *trans-cis* são potentes substâncias bioativas e possuem grande efeito inibitório no desenvolvimento de doenças e células tumorais de câncer de próstata.

A oxidação do licopeno em produtos derivados de tomate pode ser influenciada pela presença de oxigênio, luz e temperatura de exposição (SHI *et al.*, 2000). Segundo os autores Sharma & Le Maguer, (1996), a degradação desta substância pode ocorrer em menor velocidade quando exposto à condições de vácuo e ausência de luz. Entretanto, os resultados encontrados na literatura ainda são contraditórios. Segundo Dewanto *et al.*, (2002) e Shi *et al.*, (2008) o aquecimento não promove a degradação do licopeno e sim, melhora sua extração e aumento em sua concentração.

Cole e Kapur, (1957) avaliaram a estabilidade térmica do licopeno após este ser submetido à aquecimento de 100°C por 2 horas em condições de ausência e presença de oxigênio. Observaram que a presença do oxigênio impactou significativamente na perda do componente, pois em condições atmosféricas obtiveram perda de 25% de licopeno, enquanto que em condições de ausência de oxigênio somente 8% foi degradado.

Sharma & Le Maguer, (1996) avaliaram a estabilidade cinética do licopeno presente em polpa de tomate aquecida a 100°C sob a exposição de luz, oxigênio e vácuo. Perceberam que independente da presença ou ausência de luminosidade e/ou oxigênio o fator que mais impacta na degradação do composto foi a temperatura, resultando em 24% de perda. Entretanto, verificaram que tanto a liofilização quanto a exposição das polpas a estufas com temperaturas de 25° a 75°C não promoveram degradação significativa do composto.

Shi *et al.*, (2000) avaliaram o efeito de diferentes métodos de secagem sobre a retenção de licopeno e formação de isômeros *trans-cis*. Os tomates foram submetidos aos seguintes métodos: secagem em estufas com circulação de ar (EA 95° C por 6 a 10 h); secagem em estufas à vácuo (EV 55°C por 4 a 8 h); secagem a vácuo com pré-tratamento osmótico (EVO 25° C por 4 h, com pré-tratamento osmótico em solução de sacarose a 65° Brix); e tratamento osmótico (TO). Verificaram que em geral ocorreu decréscimo do teor de licopeno após os processos de desidratação. Observaram os seguintes resultados: No TO, o teor de licopeno permaneceu constante; no tratamento EVO o teor de licopeno foi maior que no tratamento EV enquanto que o tratamento EA obteve redução no teor de licopeno quando comparado ao tomate fresco. Com os resultados, alegaram que o aquecimento em EA aumenta a exposição do tomate ao ataque do oxigênio e a luz ocasionando perdas no licopeno. Já em EVO a explicação provável deva ser que a presença do açúcar mantém o oxigênio ligado, impedindo-o que este fique livre para iniciar a oxidação licopeno.

Mayer-Miebach *et al.*, (2005) avaliaram a estabilidade do licopeno em cenouras branqueadas e fatiadas da variedade *Daucus carotavar. Nutri Red*, variedade escolhida por apresentar alto teor de licopeno. Os autores verificaram a exposição das amostras a temperatura de 100°C por 2 horas favoreceu a oxidação de 30% do teor de licopeno.

Dewanto *et al.*, (2002) estudaram o impacto do processamento de tomates nas modificações nutricionais e nos teores de antioxidantes (ácido ascórbico e carotenoides). Durante a pesquisa, submeteram os tomates à trituração e ao cozimento até obtenção de uma massa homogênea. Subsequentemente, esta massa foi reaquecida em tacho à vácuo sob três diferentes tratamentos: T₁ (88°C por 2 minutos), T₂ (88°C por 15 minutos) e T₃ (88°C por 30 minutos), sendo vertidas em latas onde foram seladas imediatamente. Os autores relataram que tomates crus que continham (2,01 mg *trans*-licopeno/g de tomate) após serem expostos aos tratamento T₁, T₂ e T₃, apresentaram conteúdo de 3,11, 5,45, 5,32 mg *trans*-licopeno/g de

tomate respectivamente. Concluíram que o processamento térmico aumentou o teor de licopeno, pois o tornou mais acessível à extração devido a maior liberação dos fitoquímicos da matriz.

Shi *et al.*, (2008) investigaram efeitos da luminosidade e do aquecimento de polpas de tomates expostas a temperaturas de 60°, 80°, 100° e 120°C durante 1 a 6 horas. Sugeriram que o aquecimento a 120°C melhorou a extração do licopeno da matriz, alegando que o tratamento térmico em temperatura mais elevada proporcionou a quebra da parede celular acarretando na melhor liberação do licopeno. Observaram, que o maior tempo de exposição da polpa a uma mesma temperatura ocasionou no maior aumento do teor de licopeno (60°C por 3 horas teor de 18%; 60°C por 6 horas teor de 23%).

Jacob *et al.*, (2010) avaliaram a estabilidade dos carotenoides de tomate durante o processamento térmico. Concluíram que o aquecimento proporcionou um aumento do valor nutricional do tomate devido ao aumento do teor de licopeno e de sua atividade antioxidante.

Desta forma, torna-se necessário novos estudos para melhorar elucidar o efeito do aquecimento no teor de licopeno.

2.4.4 Identificação de carotenoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica analítica de alta eficiência e precisa para separação de compostos muito utilizada para identificação e quantificação de carotenoides (MOTILVA *et al.*, 2014). No entanto, a eficiência do método é dependente da escolha do detector, da fase móvel, coluna cromatográfica e método de quantificação.

Dentre os detectores mais utilizados destaca-se o Detector de Arranjo de Diodos (DAD ou PDA). Este detector possui como vantagem em relação ao UV/VIS a possibilidade de selecionar o melhor comprimento de onda para cada um dos componentes, fazendo assim que o método otimize a sensibilidade e auxilie a identificação de impurezas.

Carotenoides por terem diferentes estruturas e diferentes polaridades um dos grandes desafios é a escolha do solvente. Em CLAE, quando se utiliza um único solvente com composição constante é denominada eluição isocrática, entretanto a eficiência da separação é muito melhorada ou por eluição com gradiente.

Os solventes comumente utilizados e promovem separações eficientes são o metanol e éter metil-*terc*-butílico (MTBE) (BOHM *et al.*, 2002; NUNES & MERCADANTE, 2006; PACHECO *et al.*, 2013). A adição de um solvente menos polar como (MTBE) ou acetona são utilizados como modificadores do solvente primário para facilitarem a eluição do licopeno (SANDER *et al.*, 2000).

Para análise de carotenoides é comumente utilizado a cromatografia de fase reversa, qual é definida como utilização de fase estacionária é apolar, geralmente, um hidrocarboneto e a fase móvel é relativamente polar (metanol) (SKOOG *et al.*, 2002). Colunas de fase reversa C₁₈ e C₃₀ vêm sendo amplamente utilizadas para separação de carotenóides.

Em relação a eluição tanto a colunas C₁₈ poliméricas e na C₃₀ o licopeno é fortemente retido e elui somente após o β-caroteno. Entretanto colunas poliméricas C₃₀ (marca YMC) especificamente são mais eficientes para separação de isômeros *cis* e *trans* de carotenóides apolares como Licopeno e β-caroteno principalmente, visto que carotenoides são moléculas de cadeia longa e portanto interações mais extensivas deveriam ocorrer com fases estacionárias com cadeias mais longas (SANDER *et al.*, 1994; NUNES & MERCADANTE, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material de consumo e equipamentos

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes vidrarias, material de consumo e reagentes:

- Graal e pistilo de porcelana com 10 cm de diâmetro
- Dosador de celite (3gramas)
- Filtro de vidro sinterizado de porosidade 4 e capacidade de 150mL
- Funis de separação com capacidade de 250mL e 500mL
- Kitassatos com capacidade de 500mL
- Funis raiados de vidro com 5 cm de diâmetro
- Espátulas de inox 40cm
- Beckers com capacidade de 20, 50, 100, 1000 mL
- Balões volumétricos âmbar com capacidade para 25 mL
- Vials âmbar para injetor automático com capacidade para 1,8 e 4mL
- Redutor de volume para *vial* com volume de 200 μ L
- Acetona grau HPLC – Tedia®
- Éter de petróleo grau HPLC - Tedia®
- Éter etílico grau HPLC - Tedia®
- Metanol grau HPLC - Tedia®
- Éter metil-*terc*-butílico grau HPLC - Tedia®
- Celite 545 – Tedia®
- Sulfato de sódio anidro - Quimex®
- Cloreto de sódio PA - Quimex®
- Bandejas plásticas brancas
- Caixas plásticas brancas
- Termômetro digital
- Sacos plásticos de polietileno

E os seguintes equipamentos

- Geladeira modelo DF45 -Eletrolux
- Pipetador automático com capacidade para 10 a 100 μ L
- Pipetador automático com capacidade para 100 a 1000 μ L
- Pipetador automático com capacidade para 0,5 a 5mL
- Balança analítica (0,1mg)
- Homoginizador ultra Turrax
- Agitador tipo vórtex
- Ultrassom
- Balança analítica
- Cromatógrafo líquido modular modelo W600 -Waters®
- Injetor automático modelo 717 plus- Waters®
- Detetor de arranjo de fotodiodos modelo W26996 -Waters®
- Coluna cromatográfica YMC C30 Carotenoid(250x4,6xmm; 3 μ m) - Waters®
- Cromatógrafo líquido modelo Alliance 2695 – Waters®
- Coluna cromatográfica HPX 87H da BIORAD (7,8 x 300 mm)

- Espectrofotômetro Modelo UV-1800 – Shimadzu®
- Microcomputador modelo Optiplex GX 240 – Dell®
- Software de controle e aquisição de dados Empower- Waters®

3.2 Execução da parte experimental

A parte experimental deste trabalho foi executada na indústria de conservas Coqueiro situada no município de São Gonçalo estado do Rio de Janeiro. As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, acreditado pelo INMETRO pela ISO 17.025 para análises de carotenoides, situado no município do Rio de Janeiro e no Laboratório de Análises de Pós Graduação do Departamento de Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro situado no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

3.2.1 Procedência das sardinhas

As sardinhas (*Sardinella brasilienses*) foram capturadas em Angra dos Reis, costa litorânea do Rio de Janeiro durante o mês de maio de 2014, por fornecedor registrado pela indústria de conservas. O pescado foi transportado em gelo em caminhão refrigerado para a indústria de conservas. O intervalo de tempo entre a captura e a entrega na unidade fabril foi inferior a 24 horas.

3.2.2 Procedência da polpa de tomate

Para a preparação do molho de tomate utilizado nas conservas foi utilizado polpa de tomate *hot break* 31°Brix processada industrialmente por fornecedor cadastrado na indústria de conservas. A polpa foi embalada à vácuo em *bags* de alumínio devidamente lacrados (Figura 13).

A polpa *hot break* foi produzida na unidade fabril, localizada no Norte de Minas Gerais. Esta, foi processada pela indústria fornecedora à partir de tomates (*Lycopersicon esculentum* L.) maduros coletados durante setembro de 2013 na localidade do Jaíba, Norte de Minas Gerais. O processo de fabricação da polpa se iniciou com a descarga do tomate, sendo posteriormente lavados em água clorada. Em seguida é feita trituração dos tomates onde, sementes e cascas foram retiradas e enviadas separadamente para o tratamento de resíduos. Após a trituração, a pasta foi pré-aquecida a temperatura de 95°C por 10 minutos e peneirada. Em seguida, a pasta pré-aquecida seguiu para o evaporador à vácuo onde foi acondicionada sob temperatura de refrigeração até obter teor de sólidos solúveis de 30-32°Brix, sendo esterilizadas a 115°C por 2 minutos e envasadas asépticamente em embalagens de alumínio previamente esterilizadas.



Figura 13: Polpa de tomate acondicionada à vácuo em *bags* de alumínio.

3.3 Métodos

3.3.1 Processamento das sardinhas em conserva

Na Figura 14 está apresentado o fluxograma de processamento da sardinha. O transporte do pescado foi realizado através de caminhões, onde os pescados foram mantidos em caixas plásticas contendo gelo até o seu descarregamento, na unidade processadora. O processamento se iniciou na recepção, onde foi verificado se o pescado possui temperatura inferior a 5°C e se apresentou características comuns de peixe fresco, como olhos brilhantes, carne firme ao toque e guelras vermelhas. Após a aprovação da matéria-prima, as sardinhas foram enviadas para a câmara fria 5°C, até a liberação para seu processamento. Após a liberação, as sardinhas foram enviados para a linha de processamento em caixas contendo gelo com aproximadamente 50Kg de sardinhas, onde essas foram lavadas em água corrente, evisceradas (removido cabeças, escamas e vísceras) e lavadas novamente. As sardinhas evisceradas cruas foram acondicionadas em caixas plásticas brancas com gelo e enviadas ao laboratório de qualidade da indústria (Figura 15). A proporção de sardinha e gelo utilizada nas caixas foi de 1:2 (p/p), indicada pela indústria como quantidade suficiente para manter os pescados em temperatura abaixo de 5°C.

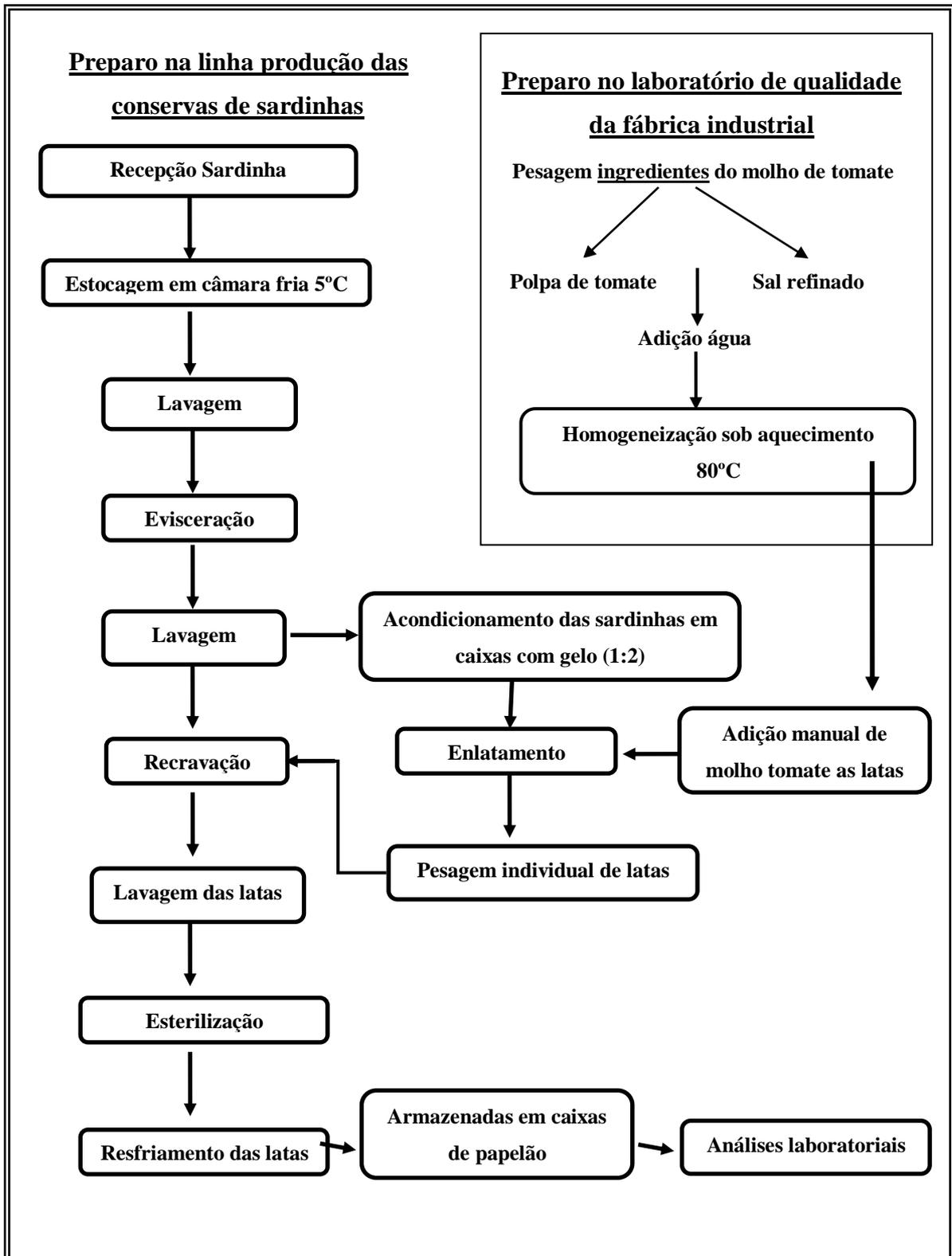


Figura 14: Fluxograma do processamento de sardinhas enlatadas com molho de tomate.



Figura 15: Sardinhas evisceradas armazenadas em caixa térmica com gelo.

No laboratório da indústria, o peso médio de cada unidade de sardinha foi aferido e a partir desse resultado, determinou-se que o peso de sardinhas por lata seria entre 100 a 104g. Simultaneamente foram separadas latas e tampas retangulares de folha de flandres, sendo cada lata pesada individualmente, para certificar que não havia variação de peso nas mesmas. As sardinhas evisceradas foram separadas manualmente e acondicionadas duas unidades em cada lata (Figura 16). As latas foram individualmente identificadas e imediatamente aferidos seus pesos. Foram preparadas 25 latas de sardinha com peso médio de 102 ± 3.0 g sardinhas/lata.

Em algumas indústrias, após o enlatamento das sardinhas, as latas são submetidas a um pré-aquecimento com propósito de retirar parte da água constituinte do pescado e melhorar atributos sensoriais ao produto. No entanto, quando este pré-aquecimento não ocorre, as sardinhas passam a ser classificadas pela legislação brasileira como sardinhas ao próprio suco, como é o caso das latas de sardinhas produzidas neste trabalho (ANEXO A).



Figura 16: Medição do peso das latas contendo apenas sardinhas evisceradas.

Após a pesagem das amostras, as latas foram acondicionadas em bandejas com gelo para posterior adição do molho de tomate (Figura 17). Amostras de sardinhas evisceradas cruas foram selecionadas aleatoriamente e adicionadas a sacos de polietileno, sendo então congeladas para realização das análises posteriormente.



Figura 17: Armazenamento das latas com sardinhas em bandejas com gelo.

É comum, nas indústrias de conservas de sardinhas, preparar o molho de tomate, usado como líquido de cobertura, com óleo de soja e polpa de tomate. A utilização do óleo de soja na formulação serve para acelerar a troca térmica durante a esterilização, no entanto, a presença deste lipídio pode favorecer o aumento da degradação dos ácidos graxos da sardinha. Desta forma, para reduzir o número de interferentes, foi utilizado apenas polpa de tomate e água potável na formulação do molho de tomate.

Primeiramente, para preparação do molho de tomate, foi realizado as pesagens dos ingredientes que são a polpa e sal (Figura 18). Os *bags*, contendo polpa de tomate, foram abertos e pesados em Beckers, resultando em 2,750Kg de produto. O sal foi pesado separadamente em Becker, na proporção de 3% em relação ao peso de polpa (82,5g de sal). A formulação do molho foi definida utilizando a proporção de 1 parte de polpa para 2 partes de água potável, proporção comumente utilizada na indústria.



Figura 18: Pesagem dos ingredientes para produção molho de tomate.

Após a adição de água potável a mistura foi aquecida e homogeneizada vigorosamente até atingir a temperatura de 80°C. O alcance desta temperatura foi-se necessário para favorecer recravação das latas. Para comparar o efeito da esterilização sobre o teor de licopeno presente em conservas de sardinhas com molho de tomate (Figura 20), foram preparadas, sob as mesmas condições de tratamento, amostras contendo apenas molho de tomate enlatado (Figura 19). Após o aquecimento, o molho foi adicionado, com auxílio de utensílio, em cada lata até seu completo enchimento.



Figura 19: Latas adicionadas apenas de molho de tomate.



Figura 20: Latas adicionadas de molho de tomate e sardinha.

Após a adição do molho, tanto as latas contendo apenas molho de tomate quanto às latas contendo sardinhas adicionadas com molho de tomate, foram levadas em bandejas para serem recravadas na linha de produção. A recravação consiste na etapa onde ocorre o fechamento hermético das latas, obtido pela realização de dobras nas abas da tampa e no corpo da lata. Após a recravação e lavagens externas das latas, as mesmas foram levadas novamente para o laboratório para aferição dos pesos. Em seguida, foram levadas novamente para linha de produção para serem esterilizadas em autoclave industrial.

3.3.1.1 Esterilização das latas

As amostras foram acondicionadas na parte superior do cesto da autoclave, separadas das embalagens comerciais por espaçador (Figuras 21 e 22). Todas as latas foram organizadas lado a lado, sem “ensanduichamento” (encaixe perfeito tampa de uma com fundo de outra) de maneira a apresentar mesma área de superfície de contato para troca térmica, tornando o processo mais homogêneo possível.

O binômio tempo-temperatura do processo foi 126 °C por 40 minutos (Figura 23). Esse binômio é o usualmente aplicado pela empresa para processamento de sardinhas enlatadas em molho de tomate. A determinação desse binômio foi realizado pela empresa a partir de dados de penetração que demonstram que esses parâmetros são suficientes para garantir intensidade de tratamento (F_0) mínimo capaz de garantir a segurança microbiológica (redução até níveis seguros de esporos de *Clostridium botulinum*) e amolecimento da espinha da sardinha.



Figura 21: Vista frontal do acondicionamento das latas no autoclave industrial.

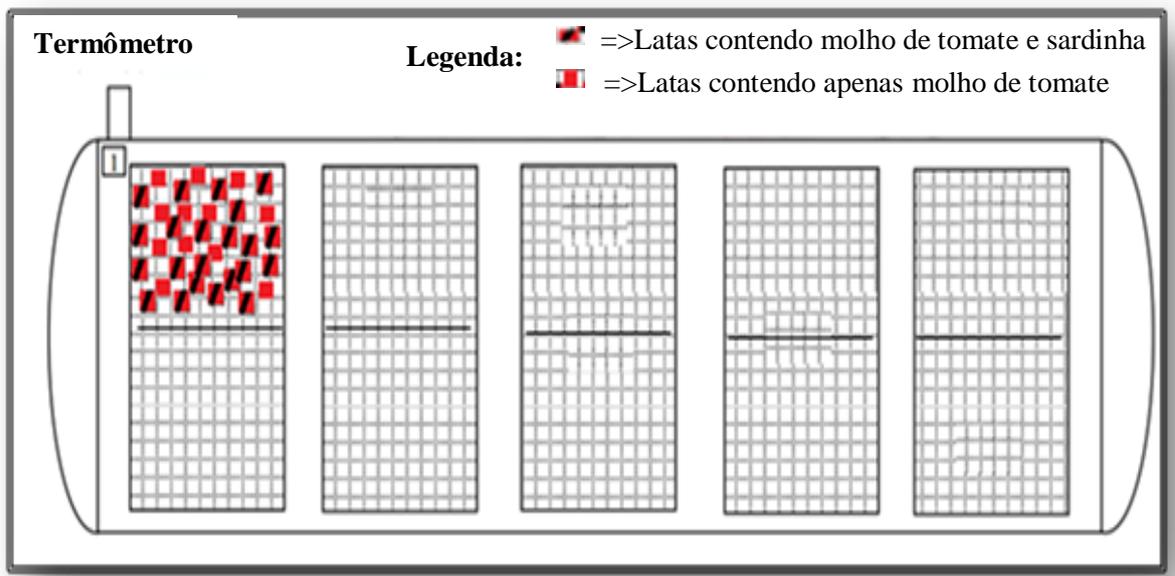


Figura 22: Diagrama de posicionamento das latas (vista lateral) no autoclave industrial.

Após a esterilização as latas foram resfriadas sob aspersão de água a 30°C até obtenção temperatura ambiente (Figura 23). Em seguida, foram levadas para laboratório, onde o peso foi aferido novamente. Os pesos das 35 latas processadas (25 latas contendo sardinha com molho de tomate e 10 latas contendo somente molho de tomate) foram adicionados na planilha de controle (Tabela 7 e 8).

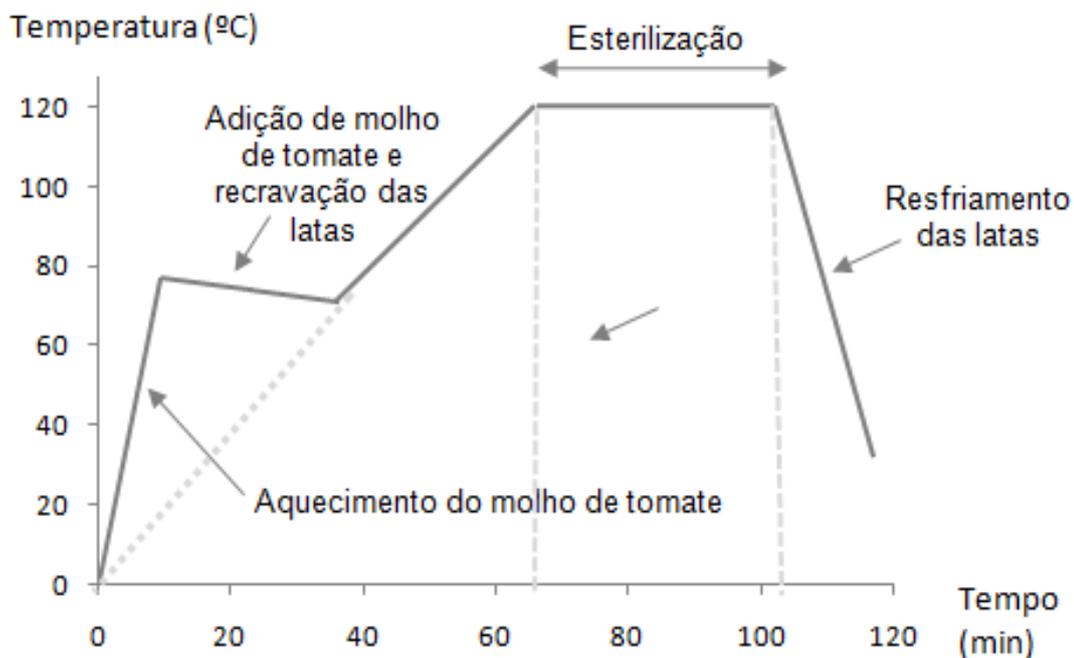


Figura 23: Esquema das etapas do processamento térmico aplicado às latas.

Tabela 7: Verificação das massas das latas contendo apenas molho de tomate.

nº das latas	Antes da esterilização		Depois da esterilização		
	após a recravação (g)	peso drenado do molho (g)	peso da lata recravada (g)	peso final do molho(g)	%perda
1	161	130	161	130	0,000
2	161	130	160	129	0,001
3	158	127	157	126	0,001
4	156	125	156	125	0,000
5	163	132	162	131	0,001
6	164	133	164	133	0,000
7*	164	133	164	133	0,000
8*	163	132	163	132	0,000
9*	163	132	163	132	0,000
10*	164	133	164	133	0,000
Média	162	131	161	130	0,000

*latas selecionadas para serem analisadas

Tabela 8: Verificação das massas das latas com sardinha e molho de tomate.

n° das latas	Antes da esterilização			Após a esterilização		
	peso lata+sardinha(g)	peso drenado sardinha (g)	após recravação (g)	peso líquido do molho (g)	peso da lata recravada (g)	peso líquido do molho (g)
1	118	101	164	32	164	32
2	119	102	165	32	165	32
3	122	105	164	28	164	28
4	119	102	165	32	164	31
5	119	102	163	30	163	30
6	117	100	162	31	162	31
7*	120	103	164	30	163	29
8*	121	104	165	30	164	29
9	117	100	163	32	163	32
10	120	103	165	31	165	31
11*	118	101	165	33	165	33
12	121	104	164	29	165	30
13	121	104	165	30	165	30
14*	117	100	164	33	164	33
15	118	101	164	32	164	32
16	117	100	165	34	165	34
17	118	101	166	34	165	33
18	122	105	165	29	164	28
19	119	102	168	35	168	35
20	117	100	166	35	164	33
21	117	100	165	34	165	34
22	117	100	162	31	163	32
23	120	103	164	30	165	31
24	121	104	164	29	164	29
25	119	102	162	29	162	29
Média	119	102	164	31	164	31

*latas selecionadas para serem analisadas

Após o resfriamento, as latas foram secas sob fluxo de ar e em seguida acondicionadas em caixas de papelão e levadas para o laboratório de Análises Instrumentais/DTA/IT/UFRRJ. As caixas de papelão foram estocadas durante 10 dias. Este tempo é utilizado comumente pela indústria como período de quarentena para análises e para melhorar a absorção de ingredientes, como sal e o próprio molho de tomate pelo pescado.

3.3.1.2 Amostragens

Amostras de sardinhas evisceradas frescas foram separadas na unidade fabril e mantidas sob gelo até a chegada ao laboratório de análises da UFRRJ. O tempo entre o transporte do pescado até à universidade foi inferior à 18 horas. Após esse período essas amostras foram acondicionadas em freezer à -18°C até o início das análises.

Para melhor entendimento do experimento, foi definido que as amostras seriam representadas por letras como: polpa de tomate (P); S (sardinhas evisceradas cruas); ME (molho esterilizado), MECS (molho esterilizado com sardinha) e SE (sardinhas esterilizadas) (Figura 25 e 26).

Após o período de 10 dias, a caixa de papelão contendo as amostras foi aberta e selecionada aleatoriamente 4 latas contendo sardinha com molho de tomate (n° 7, 8, 11, 14) e 4 latas contendo apenas molho de tomate (n° 7, 8, 9, 10) (Tabela 7 e 8) para dar início as análises. Todas as análises foram realizadas em triplicata e as amostras de molho antes de serem analisadas foram homogeneizadas manualmente em Becker e, amostras contendo sardinha foram homogeneizadas em graal com auxílio de pistilo.

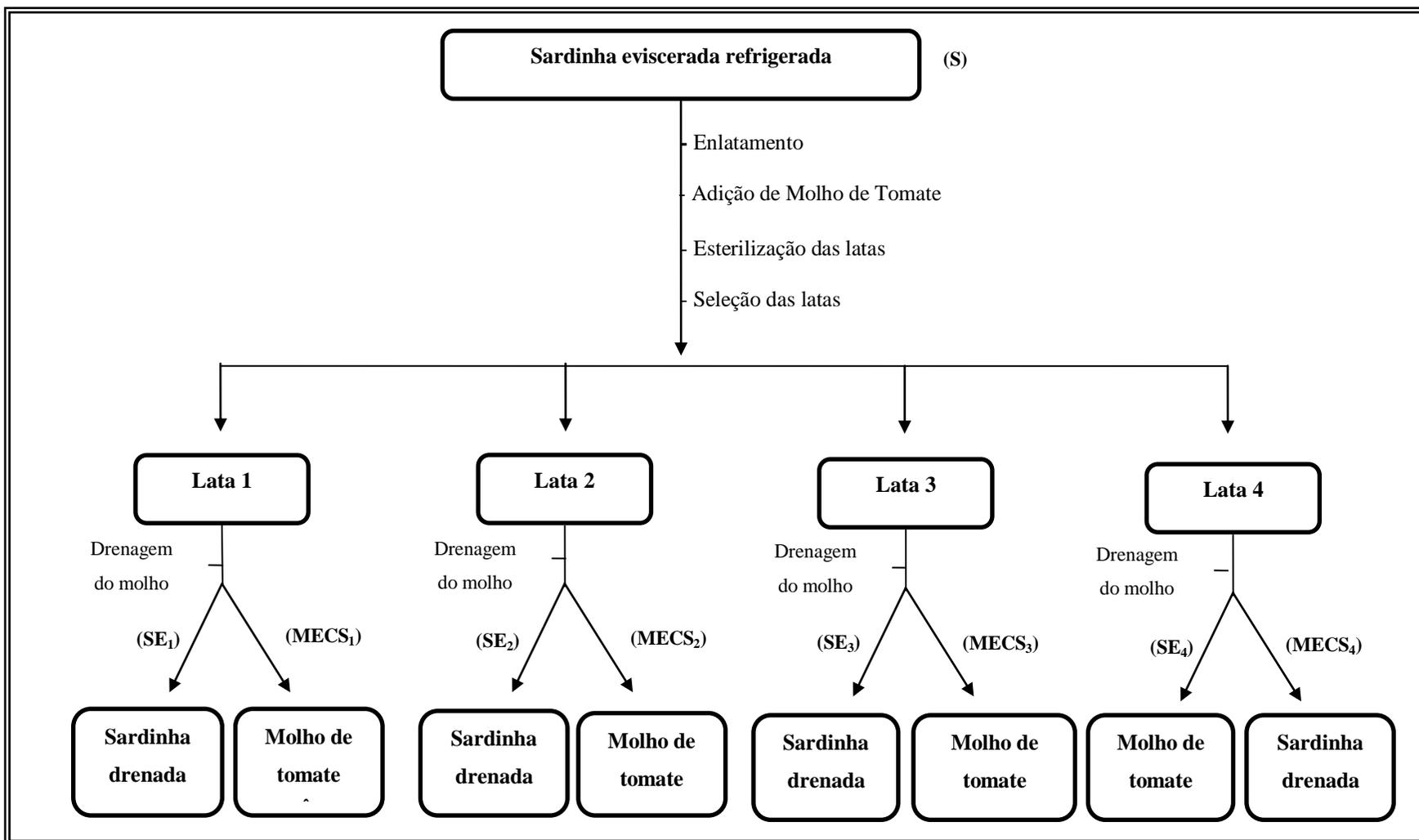


Figura 24: Fluxograma da amostragem de latas de sardinhas com molho de tomate e notação adotada.

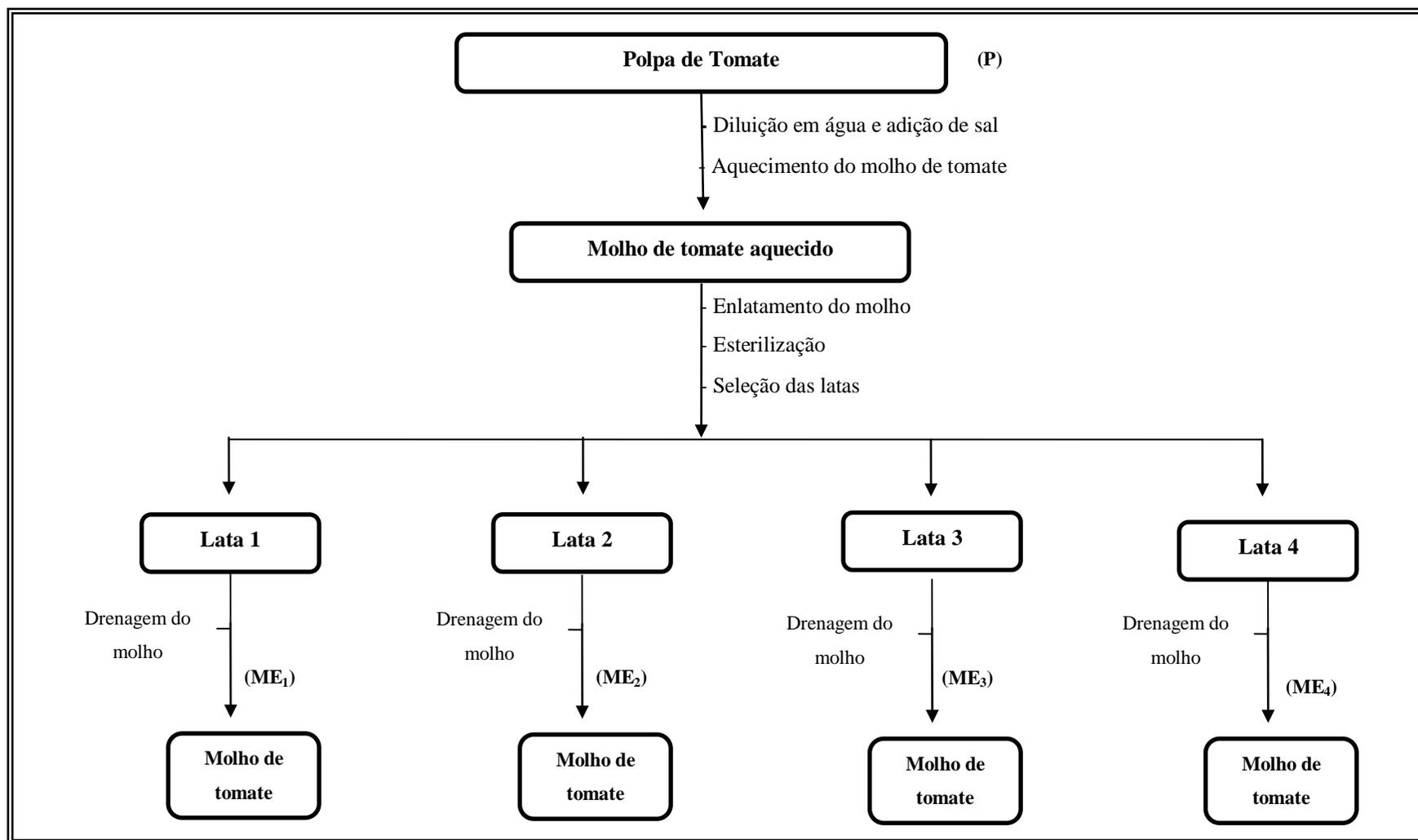


Figura 25: Fluxograma da amostragem das latas de molho de tomate e notação adotada.

3.3.2 Análise de umidade

A determinação da umidade foi realizada de acordo com método descrito na A.O.A.C (2002). Foram pesados 2,5g de cada amostra do respectivo tratamento em cápsulas de porcelana, sendo posteriormente, colocadas em estufa a 105°C, até a obtenção de peso constante. Os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão (DP).

Para a determinação da umidade das amostras de sardinhas evisceradas cruas e das sardinhas drenadas, foi necessário, macerá-las individualmente em graal de porcelana até obtenção de uma massa homogênea (Figura 26). Nas latas contendo sardinhas com molho de tomate, após a abertura, foi feita a drenagem do molho de tomate com auxílio de uma peneira de nylon durante 5 minutos. As análises de umidade foram realizadas nas mesmas amostras após às análises de ácido ascórbico e carotenoides.



Figura 26: Análise de umidade da sardinha eviscerada e da polpa de tomate

3.3.3 Análise de ácido ascórbico por CLAE

Para realização da etapa de extração foi adicionado 2,5 mL de amostra em balão volumétrico de 25mL avolumado com ácido sulfúrico 0,2M. e subsequente colocado no ultrassom por 10 minutos (Figura 27).

Em seguida, as amostras foram filtradas com filtro descartável e o filtrado transferido diretamente para frasco de vidro âmbar (1,8 mL) com tampa. Em seguida, as amostras foram identificadas e a vitamina C quantificada em cromatógrafo líquido Waters® Alliance 2695 com detector de arranjo de diodos (DAD) Waters 2996. O método consistiu em separação em coluna HPX 87H da BIORAD (7,8 x 300 mm). A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 0,2M sob vazão de 0,7mL/min.



Figura 27: Material utilizado para a análise de ácido ascórbico.

3.3.4 Análise de carotenoides

3.3.4.1 Extração de carotenoides

A análise de carotenoides foi realizada por CLAE, baseada na metodologia de Rodriguez-Amaya, (2001) e Pacheco, (2009). Para extração dos carotenos foram pesados 0,5g a 2g de amostra em balança analítica e em seguida maceradas em graal de porcelana com 3 g de celite e 30mL de acetona 4°C. A mistura obtida, foi filtrada sob vácuo em funil de vidro com placa porosa sinterizada conectado a Kitassato de 500mL (Figura 28A).

O sólido retido no funil de vidro era retornado ao graal e procedido nova extração até que o sólido apresentasse ausência de coloração. O extrato cetônico obtido no Kitassato foi transferido com auxílio de funil raiado para funil de separação contendo 40 mL de éter de petróleo. Em seguida, a mistura foi lavada sucessivamente com água ultrapura até eliminação fase cetônica (Figura 28B). Foram necessárias aproximadamente 4 a 5 lavagens seguidas de descarte da fase aquosa, no caso de formação de emulsão, foi adicionado aproximadamente 20mL de solução concentrada de cloreto de sódio para desfazê-la.

Após a separação, o extrato etéreo foi filtrado através de camada de sulfato de sódio anidro, posteriormente recolhido em balão volumétrico de 25 mL e avolumado com éter de petróleo para posterior leitura espectrofotométrica (Figura 28C).



Figura 28: Extração de carotenoides. **A-** Material utilizado na extração. **B-** Separação do extrato etéreo da fase aquosa, **C-** Filtração do extrato etéreo para balão volumétrico.

3.3.4.2 Quantificação de carotenoides totais por espectrofotometria

Para a determinação dos carotenoides totais foi utilizado o extrato etéreo recolhido no balão volumétrico no item 3.3.4.1 e mensurado no espectrofotômetro marca Shimadzu® modelo UV-1800 utilizando éter de petróleo como “branco”. O comprimento de onda utilizado foi 470nm. O valor da leitura de absorvância deve sempre estar dentro da faixa de linearidade do espectrofotômetro que é de 0,2 a 0,8. Caso este valor se encontrasse superior a esse intervalo, era realizada a diluição do extrato com éter de petróleo até que o valor estivesse dentro dessa faixa, sendo pesado na próxima extração uma massa menor de amostra. No entanto, caso a absorvância da amostra obtivesse valor inferior a este intervalo, o extrato

era descartado e nova extração era realizada utilizando massa superior de amostra, ou um balão volumétrico de menor capacidade.

A concentração de carotenoides totais (mg/100 g de amostra) foi determinada conforme a equação da Figura 29.

$$C \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \left(\frac{\text{Absorvância} \times \text{Diluição} \times \text{Volume (mL)} \times 10.000}{3450 \times \text{massa amostra (g)}} \right) / 100$$

Onde : **Absorvância**= valor de leitura do espectrofotômetro em 470 nm
Diluição= diluição do extrato quando necessária para faixa linearidade
Volume= volume (mL) do balão volumétrico utilizado para coleta extrato
Massa amostra = massa pesada de amostra para extração (g)
3450= valor absorvidade do licopeno

Figura 29: Equação para cálculo dos carotenoides totais.

3.3.4.3 Identificação dos carotenoides por CLAE

Para a determinação cromatográfica dos carotenoides foi utilizada uma alíquota de 2mL do extrato etéreo do item 3.3.4.2. Esta foi transferida para frasco âmbar para realizar a remoção do solvente sob fluxo de ar comprimido. Em seguida, foi adicionado ao resíduo seco 200µL de acetona, a solução foi homogeneizada em vórtex durante 5 segundos. Com auxílio de pipetador automático, a solução obtida foi transferida para *vial* com redutor de volume e alocada no injetor automático do cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters®, equipado com bomba W600, injetor automático 717 Plus e detector de arranjo de fotodiodos W996.

A coluna utilizada para a separação foi a YCM® *Carotenoid* (250 x 4,6mm; 3µm) com gradiente de eluição com das fases móveis A: metanol e B: éter metil-*terc*-butílico. Com início 80% A e 20% B; 0,5 minuto 75% A e 25% B; 15 minutos 15% A e 85% B; 15,50 minutos 10% A e 90% B; 16,55 minutos até o final 80% A e 20%. O tempo de análise total de 28 minutos. A temperatura do forno da coluna foi de 33°C, fluxo da fase móvel a 0,8 mL/minuto e volume de injeção de 15 µL (Pacheco *et al.*, 2014).

Para as amostras S, SE e MECS foram realizados injeções cromatográficas prévias para avaliar o perfil dos carotenoides presentes, a fim de verificar a necessidade de etapa de saponificação das amostras. A etapa de saponificação faz-se necessário quando a amostra contém os carotenoides esterificados a lipídeos, e deve ser realizada após a extração e recolhimento do extrato em balão volumétrico (PACHECO, 2009). O conteúdo dos carotenoides foi expresso em mg/100g de polpa em base seca. Calculado esta à partir das equações descritas na figura 30.

$$1^{\circ} \text{ (Peso da polpa(g) utilizada para preparo do molho) } \times \left(\frac{100 - (\text{umidade da polpa})}{100} \right) = \mathbf{A}$$

$$2^{\circ} \mathbf{A} + \text{Peso do sal (g) utilizado para preparo do molho} = \mathbf{B}$$

$$3^{\circ} \text{Peso do sal (g) utilizado para preparo do molho} = \mathbf{C}$$

$$4^{\circ} \left[\frac{\text{Teor do composto(licopeno ou } \beta\text{-caroteno)} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) \times 100}{\text{Teor de umidade do composto} \left(\frac{\text{g}}{100\text{g}} \right)} \right] / (100 - \mathbf{C})$$

Figura 30: Equações para cálculo de mg/100g de polpa em base seca.

3.3.4.4 Quantificação de licopeno nas amostras ME

Para quantificar o teor de licopeno por lata foi necessário realizar os cálculos de acordo com as equações ilustradas na Figura 31.

$$a = \left(\frac{\text{Umidade da amostra}}{100} \right) \times (\text{Peso do molho por lata (g)})$$
$$\frac{(\text{Peso da amostra}-a) \times \left(\text{Teor de licopeno da amostra} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \text{ de polpa em base seca} \right) \right)}{100}$$

Figura 31: Equação de cálculo do teor de licopeno por lata de ME.

3.3.4.5 Quantificação de licopeno nas amostras MECS

Para quantificar o teor de licopeno por lata nas amostra MECS foi necessário realizar média ponderada, de acordo com a equação ilustrada na Figura 32.

$$\frac{(\text{Teor de licopeno da amostra MECS} \times \mathbf{P}_1) + (\text{Teor de licopeno da amostra da SE} \times \mathbf{P}_2)}{\text{peso do conteúdo da lata (molho+sardinha)}}$$

Onde: **Teor de licopeno da amostra** = $\left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \text{ de polpa em base seca} \right)$
P1= peso do molho esterilizado com sardinha
P2= peso da sardinha esterilizada

Figura 32: Equação para cálculo do teor licopeno por lata de MECS.

3.3.5 Isolamento e obtenção de padrão cromatográfico de licopeno

A extração e isolamento do padrão cromatográfico foi realizado de acordo com Pacheco, (2009) e Pacheco *et al.*, (2012). O extrato para isolamento do padrão foi preparado a partir de matriz conhecida como Melão de São Caetano (*Mormodica charantia L.*). Esta matriz é uma planta trepadeira que contém fruto que, quando maduro (Figura 33) expõe suas sementes de arilo vermelho. Esses arilos são ricos em carotenoides sendo o *trans*-licopeno responsável por 96% do total da concentração (RODRIGUEZ *et al.*, 1975).



Figura 33: Estádios de maturação do Melão de São Caetano. **1-** Início da maturação. **2-** Fruto em processo de maturação, **3-** Fruto maduro.

Foram coletados 4 frutos de Melão de São Caetano no campus da UFRRJ, retirado manualmente 26 sementes (Figura 34) e pesadas 0,5g dos arilos das sementes em balança analítica. A massa pesada foi transferidas para graal de porcelana e a partir desta etapa o procedimento utilizado foi idêntico ao descrito no item **3.3.4.1**.



Figura 34: Arilos vermelhos do Melão de São Caetano maduro.

O padrão cromatográfico de licopeno foi isolado manualmente através da coleta da substância após a separação e identificação cromatográfica (Figura 35). O *trans*-licopeno nas condições cromatográficas descritas no item **3.3.4.3** eluem na coluna e são detectados pelo sistema cromatográfico após 23 minutos de corrida. Após ser identificado o efluente é coletado na saída do detector utilizando frasco de vidro sob proteção de luz. A coleta foi realizada com o acompanhamento visual do cromatograma, de modo que o efluente seja coletado ao iniciar a saída do pico de interesse e seja interrompido ao término do mesmo. Como o isolado possui coloração alaranjada, a coleta também foi orientada pela coloração do efluente do detector, interrompendo-se a coleta ao não ser mais perceptível a sua coloração (PACHECO, 2009).

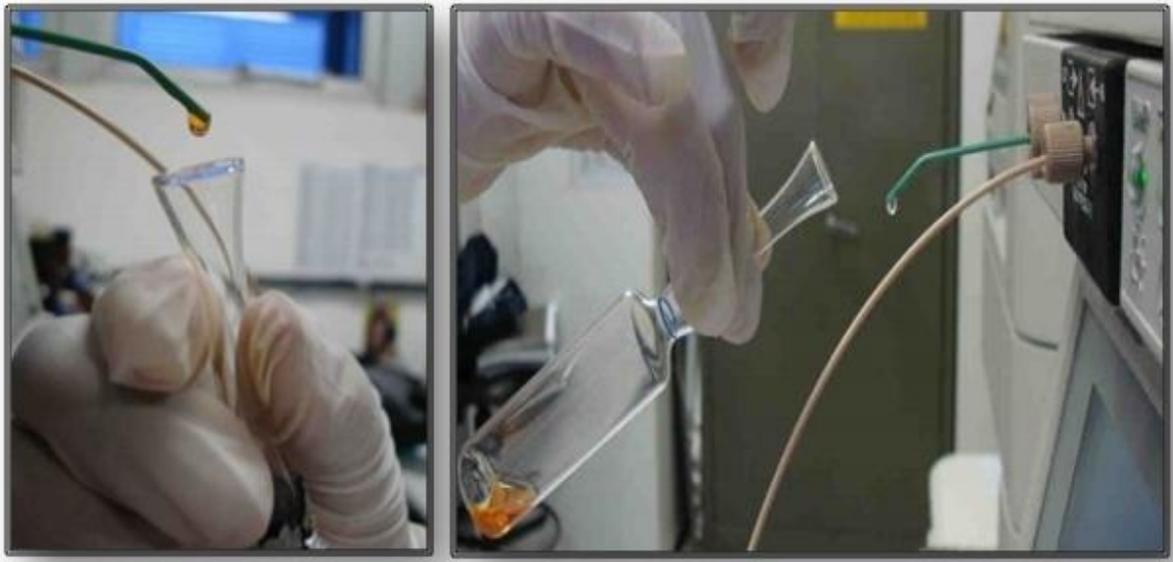


Figura 35: Coleta manual do padrão cromatográfico na saída do detector CLAE. Fonte: PACHECO, 2014.

3.3.5.1 Verificação da pureza cromatográfica do padrão isolado

Para ser considerado satisfatório, o padrão isolado deve apresentar pureza mínima de 90%. No caso de obtenção de padrão com pureza inferior, o carotenoide isolado foi descartado e procedido novamente seu isolamento. Para a obtenção do padrão cromatográfico de licopeno foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas descritas no item 3.3.4.3.

Para o cálculo da pureza cromatográfica, foi feita integração do cromatograma no comprimento de onda de 470nm. Entretanto, foi verificado através de avaliação visual a presença de interferentes com absorção em comprimentos de onda diferentes, para que não se superestimasse a pureza do padrão. Todos os picos foram integrados e a porcentagem de pureza cromatográfica foi calculada a partir da equação da figura 36 .

$$\% \text{Pureza} = \frac{\text{Área do pico do licopeno isolado}}{\text{Soma das Áreas de todos os picos presentes}} \times 100$$

Figura 36: Equação para cálculo de pureza cromatográfica do licopeno isolado.

3.3.5.2 Quantificação espectrofotométrica do padrão isolado e construção da curva analítica

A solução contendo padrão obtido com pureza satisfatória foi quantificada por espectrofotometria conforme descrito no item 3.3.4.1. No entanto, para determinação da concentração final do padrão cromatográfico e correção desta concentração pela sua pureza cromatográfica foi usada a equação da Figura 37. Dados como valor de absorvidade do licopeno em éter de petróleo sendo 3450 e comprimento de onda de leitura do espectrofômetro do licopeno de 470nm (Rodriguez-Amaya, 2001).

$$C \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{\text{Absorbância} \times \text{Diluição} \times 10.000}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} \right) \times \left(\frac{\text{Pureza}}{100} \right)$$

Onde : **Absorbância**= valor de leitura dado no espectrofotômetro

Diluição= diluição do extrato quando necessária

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = absorvidade molar do licopeno (3450)

Pureza = valor % da pureza cromatográfica do padrão

Figura 37: Equação para cálculo da concentração corrigida do padrão de licopeno isolado.

Após a determinação da pureza e concentração do padrão cromatográfico de licopeno, foi retirado alíquotas desta solução para obtenção dos pontos da curva analítica (Tabela 9). As alíquotas foram transferidas para *vials* de 1,8mL expostas ao fluxo de ar comprimido para evaporação do solvente. Após, o retido foi solubilizado com 200 μ L de acetona e homogeneizado em vórtex por 5 segundos. Posteriormente foram transferidos para redutor de volume e levados para análise cromatográfica.

Padrões de *cis* licopeno e β -caroteno não foram isolados. No entanto, estes foram identificados pelos tempos de retenção e espectros de absorção descritos na literatura Rodriguez-amaya, (2001) e Pacheco, (2013).

Tabela 9: Volumes das alíquotas retiradas da solução de padrão cromatográfico de licopeno e concentrações finais dos pontos da curva analítica.

Ponto da curva de calibração	Volume da alíquota (μ L)	Concentração final (μ g/ mL)
1	11,5	0,5
2	34,5	1,5
3	57,5	2,5
4	80,5	3,5
5	115	5,0
6	149,4	6,5
7	184	8,0
8	299	13
9	529	23

3.4 Comparação da quantificação do *trans*-licopeno por método de normalização e padronização externa

A cromatografia líquida é um eficiente método de separação de compostos de identificação dos compostos. Para quantificação dos compostos de interesse, podem ser utilizados diferentes métodos, como de normalização interna e padronização externa.

Para quantificação pelo método de normalização, é necessário certificar que todos os componentes da amostra eluam na coluna e sejam detectáveis pela metodologia validada no laboratório. O método consiste em quantificar o teor do composto em porcentagem. O cálculo é obtido através da medição da área do componente de interesse dividido pela soma das áreas de todos os picos identificados multiplicado por 100 (Figura 38). Este método possui

vantagens como, simplicidade e praticidade analítica, não necessita da utilização de padrões cromatográficos e sua quantificação ser independente do volume injetado.

$$\% \text{ do composto de interesse} = \left(\frac{\text{Área do composto de interesse}}{\sum \text{áreas de todos os compostos identificados}} \right) \times 100$$

Figura 38: Equação para cálculo da porcentagem do composto por sistema de normalização.

Após o cálculo da % do composto (Figura 38) utiliza-se a equação (Figura 39) para calcular do teor de *trans* licopeno na amostra. Entretanto, primeiramente é necessário calcular o teor de carotenoides totais de acordo com o item 3.3.4.1 em seguida proceder os cálculos pela equação da Figura 29.

$$\left(\frac{\% \text{ do composto de interesse}}{100} \right) \times (\text{Teor total de carotenoides totais})$$

Figura 39: Equação para cálculo do teor de *trans*-licopeno obtido por método de normalização.

Já no método de padronização externa, para proceder a quantificação do composto, necessita-se que padrão analítico seja cromatografado separadamente, em quantidades conhecidas, para possibilitar a construção de uma curva padrão. A curva-padrão corresponde à relação gráfica entre os valores de áreas encontradas nos cromatogramas e as concentrações injetadas do padrão cromatográfico. Com base nesta análise gráfica, é possível verificar a linearidade através do coeficiente de linearidade (r^2) da reação e calcular através da equação da reta, um fator de conversão de valores de área em concentração (SOARES, 2001).

Para se obter uma melhor precisão utilizando este método, deve-se manter as mesmas condições cromatográficas durante a análise, como: o mesmo volume de injeção para o padrão e para a amostra (para evitar distorções dos picos), manter a concentração ou massa do padrão próxima à do componente de interesse e utilizar padrões analíticos com alto teor de pureza (COLLINS, 1990). Entretanto, apesar de ser considerada uma técnica confiável, apresenta uma grande limitação, pois sua quantificação é exclusivamente dependente do volume injetado e da estabilidade do detector. Caso o volume injetado das amostras não seja precisamente o mesmo durante as replicatas, ou se houver alteração de algum parâmetro que afete a resposta do detector, como por exemplo, variação da intensidade de luz do UV-VIS, as áreas dos picos poderão ser maiores ou menores daquelas obtidas na calibração e conseqüentemente os resultados serão incorretos.

Desta forma, para quantificação do teor de *trans*-licopeno neste estudo, foi elaborado um teste comparativo utilizando os métodos de normalização (% áreas) e padronização externa (curva analítica).

3.5 Análise estatística

O experimento foi feito com modelo inteiramente ao acaso onde as análises foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram tratados com análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher a nível de 95% de significância ($p < 0,05$), para comparação das médias. Os resultados foram expressos por meio de média seguida do desvio padrão (DP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento do padrão cromatográfico de *trans*-licopeno

Na figura 41, observa-se que o cromatograma obtido do extrato de melão de São Caetano apresentou grande porcentagem de impurezas, advindas principalmente de isômeros *cis*-licopeno, possivelmente provocado pelo estágio de maturação do fruto e o fato dos arilos terem ficados expostos ao oxigênio durante dois dias antes da extração.

À partir deste extrato, foi iniciado o método de isolamento do padrão (Figura 40). Após duas tentativas, obteve-se um padrão cromatográfico com teor de pureza satisfatória. A primeira coleta do padrão obteve pureza de apenas 88,6% (Figura 42). Esse baixo teor de pureza deve ter sido ocasionado, devido a falta de experiência do analista durante a coleta. É possível que a coleta não tenha sido iniciada imediatamente após a saída do pico de *trans*-licopeno e/ou interrompida imediatamente ao término do mesmo. A coleta manual mostrou-se eficiente para o isolamento do padrão de *trans*-licopeno, visto que foi obtido padrão com 96% de pureza (Figura 43). De acordo com Kimura & Rodriguez-Amaya, (2002) a obtenção de padrão cromatográfico deve obter no mínimo, pureza de 90%. Concluiu-se que a realização deste procedimento é uma alternativa viável para redução de custos analíticos visto que, a aquisição comercial de padrões cromatográficos possuiu elevado custo (PACHECO *et al.*, 2012).



Figura 40: Isolamento padrão analítico de *trans*-licopeno.

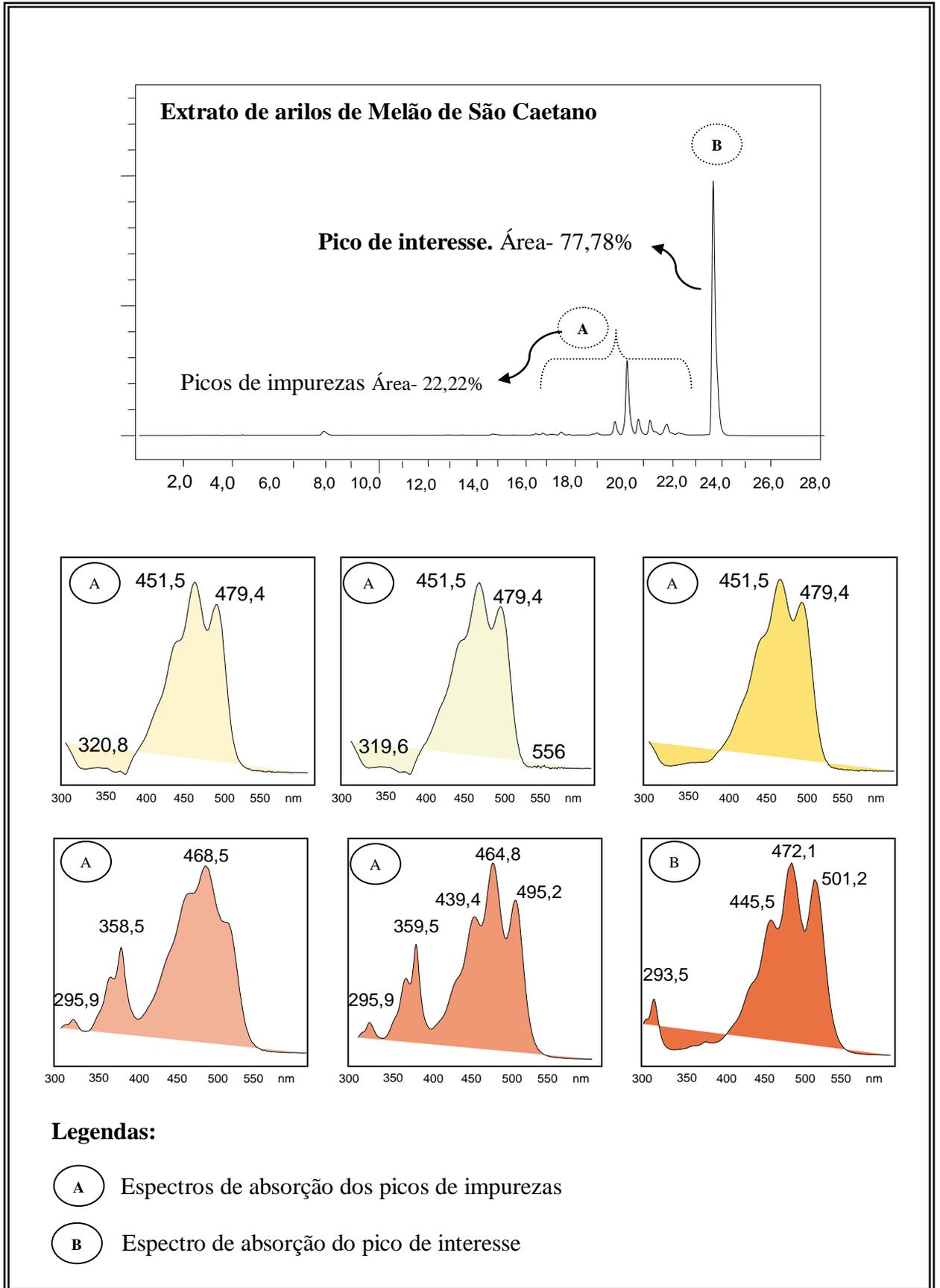


Figura 41: Cromatograma e espectros de absorção UV/VIS dos carotenoides presentes no extrato de arilos de Melão de São Caetano.

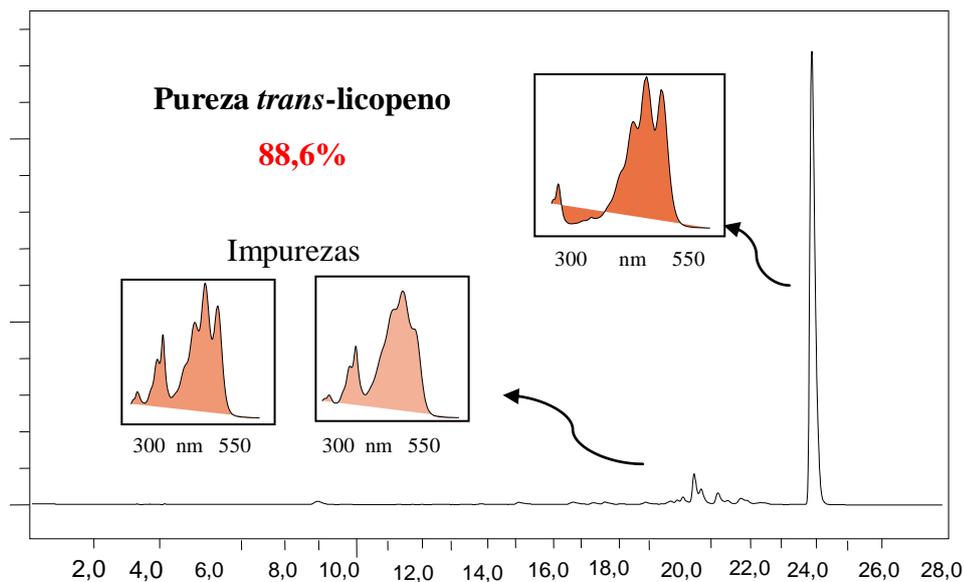


Figura 42: Primeira tentativa de isolamento de padrão de *trans*-licopeno.

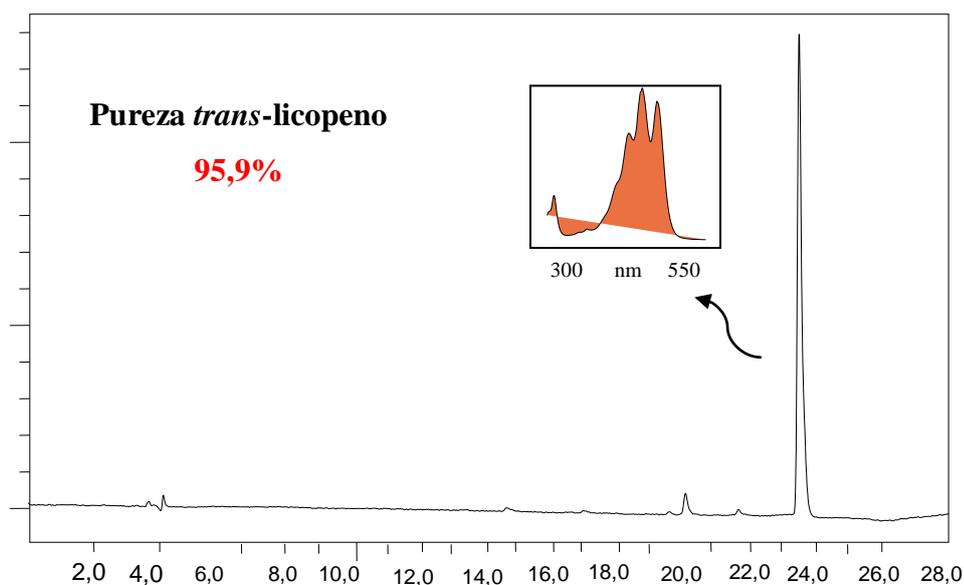


Figura 43: Padrão isolado de *trans*-licopeno.

A concentração ($\mu\text{g/mL}$) obtida do padrão de licopeno foi calculado segundo a equação da Figura 37 e procedido em seguida a construção da curva analítica apresentada na Tabela 9. A curva de calibração, o coeficiente de correlação ($r^2 = 0,997$) e a equação da reta estão apresentadas na Figura 44.

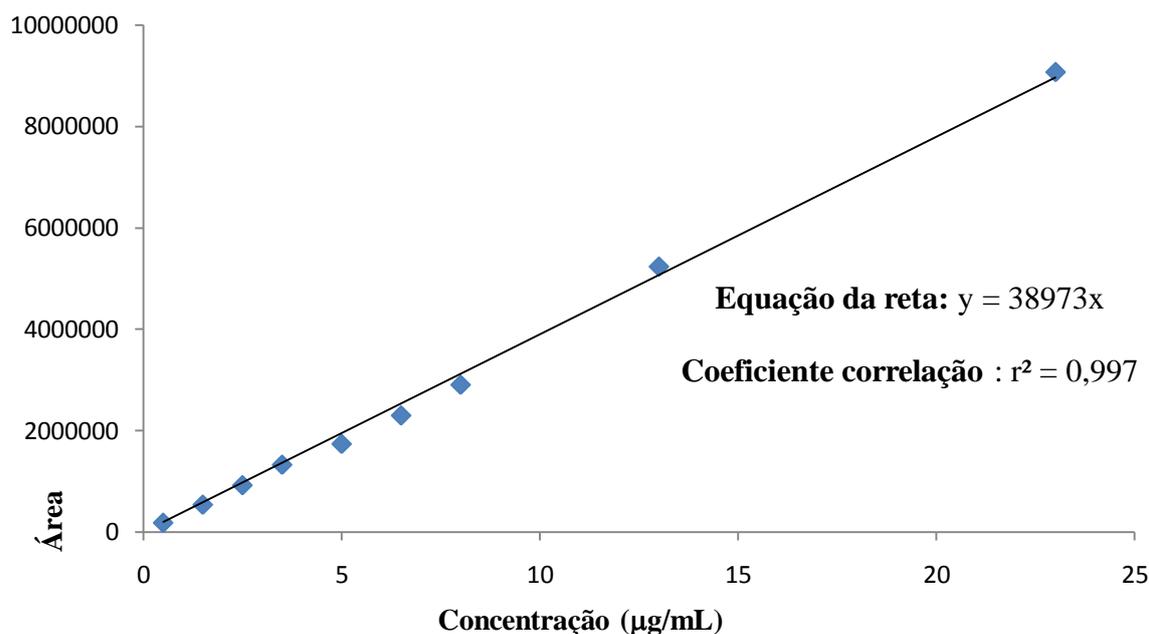


Figura 44: Curva de calibração do padrão *trans*-licopeno.

4.2 Análise de umidade

Nas Tabelas 10 e 11 são apresentados os resultados dos teores de umidade das sardinhas evisceradas cruas (S) e sardinhas esterilizadas com molho de tomate (SE). Foi observado que as médias das amostras de S e SE obtiveram valores médios de $72,08 \pm 2,23$ à $68,09 \pm 1,02$ g/100g respectivamente. Observa-se que a esterilização da sardinha promoveu perda significativa de 5,5% de umidade ($p < 0,05$) quando comparada a sardinha não aquecida. Tal conclusão também foi obtida pelos autores Hale e Brown, (1983); Tarley *et al.*, (2004); Pereira e Tenuta-Filho, (2005) e Saldanha *et al.*, (2008) que em seus estudos, obtiveram valores de umidade para sardinhas cruas coletadas na costa brasileira entre 68,22 g/100 à 74,29g/100g e 64,53g/100g à 66,19 g/100g para sardinhas esterilizadas com óleo e molho de tomate.

Tabela 10: Teor de umidade (g/100g) das réplicas das amostras de S e SE \pm desvio padrão.

Amostras	Umidade (g/100g)
S ₁	$73,64 \pm 0,0050$
S ₁	$73,09 \pm 0,0020$
S ₃	$69,53 \pm 0,0070$
SE ₁	$67,35 \pm 0,0085$
SE ₂	$69,44 \pm 0,0005$
SE ₃	$67,25 \pm 0,0009$
SE ₄	$68,33 \pm 0,0020$

Tabela 11: Teor médio de umidade (g/100g) das amostras de S e SE \pm desvio padrão.

Amostras	Média umidade (g/100g)
S	72,08 \pm 2,23 ^a
SE	68,09 \pm 1,02 ^b

Letras diferentes significam que as amostras obtiveram diferença significativa com confiabilidade de 95% de confiança ($p < 0,05$).

Nas Tabelas 12 e 13 estão apresentados os valores de umidade das amostras de P, ME e MECS. A polpa de tomate obteve teor médio de umidade de 71,47 \pm 0,14 g/100g. Resultados similares de umidade de polpa de tomate foram encontrados em estudos realizados por Periago *et al.*, (2007); Capanoglu *et al.*, (2008); Toma *et al.*, (2008) os quais encontraram valores que oscilaram entre 71,7 à 76,21 g/100g. Devido à polpa de tomate ser um produto obtido por concentração, teores menores de umidade devem ser encontrados quando comparados a molhos processados (82,97%) e tomates *in natura* (94,5%) (Periago *et al.*, 2007).

O molho de tomate esterilizado (ME) apresentou percentual médio de umidade de 87,46 \pm 0,1564 g/100g. Este resultado está de acordo com os valores encontrados por Toma *et al.*, (2008) que ao analisarem molhos enlatados obtiveram teor médio de umidade de 88,4 \pm 0,20 g/100g.

Ao analisar o teor de umidade obtido nas amostras MECS, observou-se que a presença do pescado no molho de tomate reduziu significativamente o teor de umidade, quando comparado ao molho esterilizado sem sardinha. Esta variação de 3,47% foi atribuída à presença do óleo da sardinha no molho de tomate, pois a transferência de calor no óleo é maior do que na água, podendo ter promovido a redução do teor de umidade do MECS.

Tabela 12: Teores de umidade (g/100g) das réplicas das amostras de ME e MECS.

Amostras	Umidade (g/100g)
ME1	87,28 \pm 0,0021
ME 2	87,57 \pm 0,0005
ME 3	87,61 \pm 0,0023
ME 4	87,38 \pm 0,0020
MECS 1	82,64 \pm 0,0077
MECS 2	86,61 \pm 0,0029
MECS 3	83,78 \pm 0,0090
MECS 4	83,75 \pm 0,0236

Tabela 13: Teor médio de umidade (g/100g) das amostras de P, ME e MECS \pm desvio padrão.

Amostras	Umidade (g/100g)
Polpa <i>hot break</i> (P)	71,47 \pm 0,14 ^c
Molho Esterilizado (ME)	87,46 \pm 0,16 ^a
Molho Est. Sardinha (MECS)	84,19 \pm 1,69 ^b

Letras diferentes significam que as amostras obtiveram diferença significativa com confiabilidade de 95% de confiança ($p < 0,05$).

A Figura 45 apresenta os resultados dos teores de umidade com erro padrão da análise. O erro padrão consiste em uma medida estatística onde é mensurado a variabilidade da média (como a média varia de uma amostra para outra). Não se trata de uma medida de variabilidade individual (como o desvio padrão), mas sim de uma estimativa da variabilidade da média, em função do tamanho da amostra

O erro padrão desta análise foi inferior a 0,2%, exceto no molho de tomate com sardinha que obteve 0,67%. Este valor demonstra que a repetibilidade dos dados foi satisfatória.

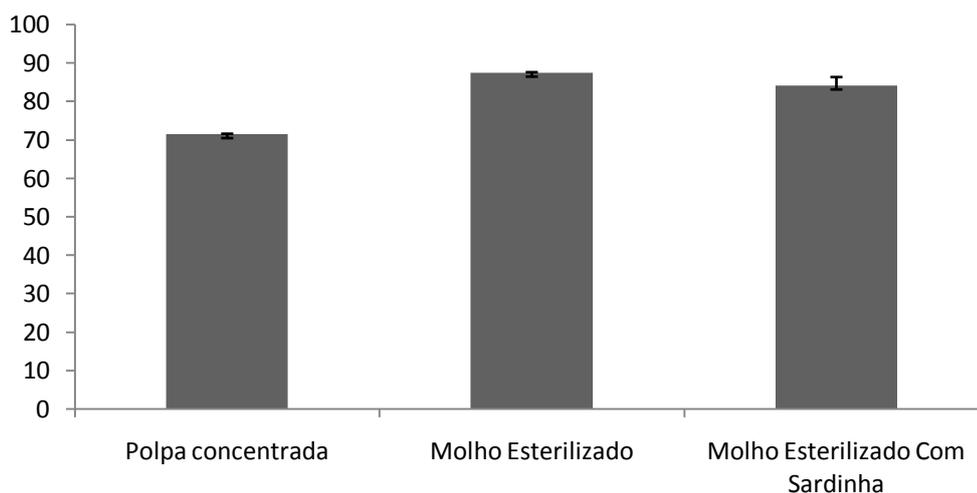


Figura 45: Teores de umidade \pm erro padrão das amostras de P, ME e MECS.

4.3 Análise de ácido ascórbico por CLAE

Após análise cromatográfica das amostras de P, ME e MECS, não foi detectado teor de ácido ascórbico em nenhuma das amostras analisadas. É possível que a não detecção da vitamina C possa ser sido advindo a possível baixa concentração deste componente na polpa *hot break* (promovida devido seu processamento) que após ser diluída e exposta sob aquecimento de 126°C por 40 minutos tenha promovido o final da degradação. Segundo Marfil *et al.*, (2008) o ácido ascórbico, por possuir baixo potencial redox, pode ser rapidamente oxidado quando submetido à exposição de luz, oxigênio e principalmente à elevadas temperaturas de aquecimento.

O ácido ascórbico, por ser um componente termosensível, é facilmente degradado durante o processamento térmico de produtos derivados de tomate. Apesar da sua sensibilidade ao calor, segundo Dewanto *et al.*, (2002); Marfil *et al.*, (2008); Pérez-Conesa *et*

al., (2009); Jacob *et al.*, (2010) e Chanforan *et al.*, (2012), a ausência deste componente em produtos derivados de tomate ainda foi pouco retratada.

Dewanto *et al.*, (2002) verificaram que o aquecimento de tomates, proporcionou perda significativa de 97% de ácido ascórbico, tendo seu conteúdo decrescido de 0,76µg/g para 0,02 µg/g. Chanforan *et al.*, (2012) pesquisaram o teor de ácido ascórbico em polpa de tomate *hot break* e em molho de tomate esterilizado à 96°C por 35 minutos e obtiveram como resultado, teores de ácido ascórbico de 90mg/100g para polpa de tomate *hot break* e 17mg/100g no molho de tomate esterilizado.

Pérez-Conesa *et al.*, (2009) avaliaram o efeito do processamento de polpa *hot break* na redução do teor de ácido ascórbico. Ao compararem o teor de vitamina C nos tomates *in natura*, utilizados para processamento com o teor encontrado na polpa *hot break*, verificaram que o processamento da polpa de tomate promoveu redução de 46% do teor de ácido ascórbico quando comparado ao teor inicial presente nos tomates *in natura*.

É possível que a diferença entre os resultados do teor de ácido ascórbico em produtos derivados de tomate, esteja relacionada diretamente a fatores como: condições de plantio, grau de maturação da matéria-prima, intensidade do tratamento térmico aplicado, do tempo e das condições de estocagem do produto (DAVEY *et al.*, 2000).

4.4 Quantificação dos carotenoides totais por espectrofotometria

As tabelas 14 e 15 apresentam os teores de carotenoides totais encontrados nas amostras de P, ME e MECS. O valor encontrado na polpa de tomate *hot break* foi de 216,55±3,52 mg/100g de polpa em base seca. Este resultado foi superior aos relatados pelos autores Toma *et al.*, (2008) e Capanoglu *et al.*, (2008) que reportaram valores entre 95,66 mg/100g e 101,9 mg/100g (base seca) respectivamente, para polpas *hot break*. Na literatura, observa-se que o teor de carotenoides em polpas pode oscilar, pois a estabilidade desses compostos são dependentes das condições de plantio dado aos tomates (clima, irrigação), estágio de maturação das matérias-primas e da intensidade do processamento térmico durante sua fabricação (PÉREZ-CONESA *et al.*, 2009).

Tabela 14: Teor médio de carotenoides totais (mg/100g de polpa em base seca) das amostras P, ME e MECS ± desvio padrão.

Tratamentos	Teor de carotenoides totais (mg/100g de polpa em base seca)
Polpa <i>hot break</i> (P)	216,55±3,52 ^a
Molho Esterilizado (ME)	170,54±6,58 ^b
Molho Est. Sardinha (MECS)	73,32±4,81 ^c

Letras diferentes significam que as amostras obtiveram diferença significativa com confiabilidade de 95% de confiança (p<0,05).

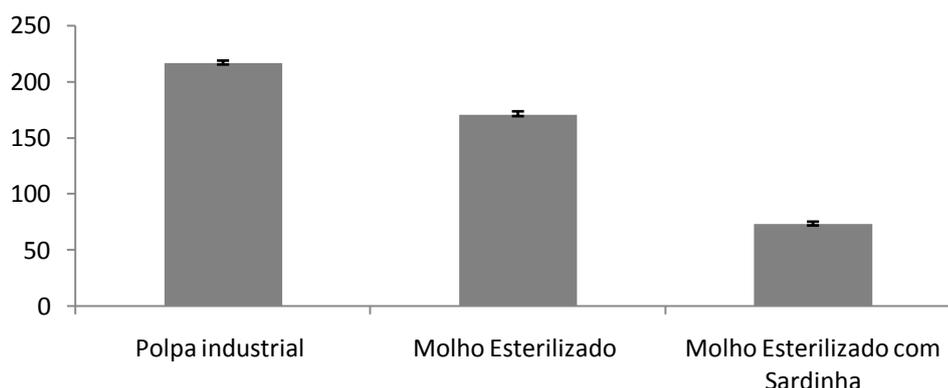


Figura 46: Variação do teor de carotenoides dos tratamentos.

Amostras de ME apresentaram percentual médio de $170,54 \pm 6,58$ mg/100g de polpa em base seca. Resultado este, significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado as amostras de P. A esterilização das amostras de ME, promoveram degradação de 22% do total de carotenos quando comparado ao teor médio encontrado na polpa. No entanto, nas amostras de MECS o valor médio obtido foi de $73,32 \pm 4,81$ mg/100g polpa base seca, resultado este três vezes inferior ao encontrado na polpa de tomate (Figura 46). A esterilização do MECS resultou degradação de 66% do teor total de carotenos.

Estudos demonstraram que o processamento térmico promove redução dos teores de carotenoides de produtos derivados de tomate (COLE E KAPUR, 1957; SHI *et al.*, 2000; MAYER-MIEBACH *et al.*, 2005; CAPANOGLU *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2008; BOON *et al.*, 2010; JACOB *et al.*, 2010; KOBORI *et al.*, 2010; CHANFORAN *et al.*, 2012; ABETE *et al.*, 2013).

Jacob *et al.*, (2010) verificaram que polpas de tomates esterilizadas à 110°C por 30 minutos, proporcionaram degradação de 35% do total de carotenoides. No entanto, Sharma & Le Maguer, (1996) verificaram perda de 20% do teor de carotenoides após o aquecimento da polpa de tomate.

Tabela 15: Teor de carotenoides totais (mg/100g de polpa em base seca) das réplicas das amostras de S, ME , MECS, SE.

Amostras	Teor de carotenoides totais (mg/100g de polpa em base seca)
S	Nd
ME 1	$168,03 \pm 4,91$
ME 2	$163,23 \pm 3,42$
ME 3	$172,10 \pm 2,29$
ME 4	$178,78 \pm 4,48$
MECS 1	$66,21 \pm 5,93$
SE 1	$8,16 \pm 0,58$
MECS 2	$67,93 \pm 5,98$
SE 2	$6,62 \pm 0,72$
MECS 3	$61,56 \pm 3,90$
SE 3	$4,61 \pm 0,80$
MECS 4	$71,59 \pm 4,27$
SE 4	$6,63 \pm 0,93$

nd= não detectável na amostra

Na amostra S não foram detectados teores de carotenoides totais, no entanto, ao analisar separadamente as sardinhas esterilizadas (SE), observou-se que a esterilização nas latas de sardinhas com molho de tomate (SE) proporcionou migração dos carotenoides presentes no molho, para o pescado. Os teores encontrados no pescado variaram de 4,61 à 8,16 mg/100g polpa em base seca (Tabela 15). Estudos realizados em conservas de sardinhas evidenciaram que durante a esterilização do pescado ocorre transferência dos componentes químicos do molho de cobertura para o pescado e, simultaneamente, uma migração dos ácidos graxos do tecido intramuscular do pescado para o molho de cobertura (GARCIA ARIAS *et al.*, 1991; LAGO & ANTONIASSI, 2000; TARLEY *et al.*, 2004). No entanto, os percentuais de migração podem oscilar, pois dependem da homogeneização do molho em cada lata, do tempo de separação molho/pescado (peneiramento), do processo de esterilização dado as conservas e do tempo de armazenamento latas (GARCIA ARIAS *et al.*, 1991).

4.5 Identificação dos carotenoides por CLAE

4.5.1 Comparação da quantificação por método de normalização e padronização externa

Os resultados obtidos foram apresentados na Tabela 17. Foi observado que os resultados apresentaram elevadas variações entre os métodos de quantificação. As variações oscilaram de 21 % a 204%.

O método de quantificação por curva analítica obteve o maior desvio padrão, coeficiente de variação, erro padrão e coeficiente de variação entre as réplicas, quando comparado aos resultados obtidos pelo método de normalização (Tabela 16).

Tabela 16: Comparação dos valores de desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação encontrados nas réplicas das amostras por diferentes métodos de quantificação.

Resultados	Método de padronização externa (Curva)		Método de normalização (%Área)	
	ME	MECS	ME	MECS
Desvio Padrão (DP)	36,67	38,68	5,18	4,76
Erro padrão (EP)	18,37	19,34	2,59	2,38
Coef. Variação (CV)	13,85	55,12	3,43	7,35

As variações analíticas encontradas no método de quantificação por padronização externa foram mais elevadas. As causas para essas oscilações são a dependência do volume injetado, o uso de solvente de elevada volatilidade (acetona) e uso de reduzida quantidade de solvente na etapa de diluição da amostra. A pouca experiência na análise ocasionou elevado tempo de elaboração das amostras a serem injetadas propiciando que acetona (solvente utilizado na ressuspensão das amostras) evaporasse. A acetona é um solvente orgânico polar de elevada volatilidade quando comparado ao etanol e água (FERREIRA *et al.*, 2007). Oscilações podem ainda estarem associadas ao erro de pipetagem do volume a ser injetado no cromatógrafo, visto que o volume injetado de amostra é reduzido (200 µL). Desta forma, o método de normalização foi definido como o mais apropriado, para quantificação de carotenoides nas amostras P, ME, MECS.

Tabela 17: Comparação dos teores de *trans*-licopeno quantificados por método de normalização e padronização externa.

Amostras	Carotenoides Totais (mg/100g de polpa em base seca)	Teor <i>trans</i> -licopeno (mg/100g de polpa em base seca)		% Diferença de quantificação pela Curva X Área
		Curva	% Área	
P	216,55±3,52	156,49±3,88	201,06±4,20	-
S	nd	Nd	Nd	-
ME 1	168,03±4,91	273,07±2,06	150,39±9,27	82,00%
ME 2	163,23±3,42	218,06±3,28	144,70±3,70	50,70%
ME 3	172,10±2,29	306,80±1,37	150,56±1,80	204,00%
ME 4	178,78±4,48	260,52±4,07	157,38±2,34	65,00%
MECS 1	66,21±5,93	55,35±5,69	58,94±7,14	-
SE 1	8,16±0,58	2,89±0,40	6,52±0,53	-
MECS2	67,93±5,98	32,52±4,45	59,25±4,93	
SE 1	6,62±0,72	6,99±5,70	5,77±0,57	21,00%
MECS 3	61,56±3,90	79,61±3,81	54,26±3,03	46,00%
SE 3	4,61±0,80	5,61±1,51	4,11±0,71	36,00%
MECS4	71,59±4,27	109,7±3,15	63,95±4,52	71,00%
SE 1	6,63±0,93	4,28±4,16	5,97±0,04	-

nd= ausência de teor de carotenoides na amostra

4.6 Efeito da esterilização sobre os teores de β -caroteno

Na Figura 47 estão apresentados os perfis cromatográficos e espectros de absorção UV/VIS do β -caroteno obtidos das amostras de P, ME, MECS e SE. A eluição do β -caroteno se deu com 16 minutos de corrida e sua identificação foi feita por comparação do espectro de absorção citado por Pacheco, (2009). O tempo de eluição do composto e de seu espectro de absorção dependem exclusivamente dos solventes e o modo de eluição utilizado na corrida cromatográfica. Assim, ao comparar os resultados cromatográficos reportado por Pacheco *et al.*, (2014), observou-se que o tempo de separação e do espectro de identificação foram os mesmos obtido pelos autores.

Nas Tabelas 18 e 19 estão apresentados os teores de β -caroteno encontrados nas amostras de P, ME e MECS.

Tabela 18: Teor de β -caroteno (mg/100g de polpa em base seca) nas réplicas das amostras de S, ME, MECS, SE.

Tratamentos	Teor β -caroteno (mg/100g de polpa em base seca)
S	nd
ME 1	0,49±0,05
ME 2	2,98±0,37
ME 3	3,14±0,53
ME 4	2,89±0,56
MECS 1	0,04±0,06
SE 1	0,09±0,02
MECS 2	0,90±0,03
SE 2	0,14±0,10
MECS 3	0,87±0,38
SE 3	0,05±0,02
MECS 4	0,81±0,51
SE 4	0,08±0,02

nd= não identificado na amostra

O teor de β -caroteno da amostra P ($3,36\pm 0,54$ mg/100g) apresentou conteúdo ligeiramente superior quando comparado ao do ME ($2,37\pm 1,26$ mg/100g), no entanto, esta diferença não foi significativa ($p < 0,05$). Este resultado comprova que o pigmento permaneceu estável ao processamento térmico aplicado (126°C por 40 minutos). Quando comparado os teores de β -caroteno das amostras de MECS e do ME, observou-se que a esterilização na presença da sardinha resultou na redução de 31% do composto, apresentando diferença significativa entre os resultados. Esses resultados mostram que a estabilidade deste caroteno, não foi influenciada pelo binômio tempo-temperatura do processo térmico aplicado, mas sim, pela presença da sardinha no molho de tomate.

Marx *et al.*, (2003) também observaram, que os teores de β -caroteno presentes em sucos de cenouras não esterilizados e em sucos esterilizados, não diferiram significativamente

entre si ($p < 0,05$). Entretanto, Demiray *et al.*, (2013) concluíram que a temperatura influencia na estabilidade de β -caroteno no tomate, foi observado que em temperaturas inferiores a 70°C houve maior retenção do composto, quando comparado à tomates aquecidos a temperatura de 100°C , onde o teor de β -caroteno degradou em 96%.

Quando comparado os teores de β -caroteno das amostras de MECS e da P, observou-se que a esterilização na presença da sardinha promoveu a degradação significativa de 78% do composto.

Tabela 19: Teores médios de β -caroteno (mg/100g de polpa em base seca) das amostras de P, ME e MECS.

Tratamentos	β -caroteno (mg/100g de polpa em base seca)
Polpa <i>hot break</i> (P)	$3,36 \pm 0,54^a$
Molho Esterilizado (ME)	$2,37 \pm 1,26^a$
Molho Est. Sardinha (MECS)	$0,74 \pm 0,41^b$

Letras diferentes significam que as amostras obtiveram diferença significativa com confiabilidade de 95% de confiança ($p < 0,05$).

É possível que a degradação nas amostras de MECS tenha ocorrido pela atuação do β -caroteno como um agente antioxidante do molho de tomate, retardando assim a oxidação lipídica da sardinha. Sardinhas por serem pescados ricos em lipídeos são facilmente oxidadas quando expostas ao aquecimento (SALDANHA *et al.*, 2008). A oxidação lipídica gera radicais livres e promove a degradação dos ácidos graxos poliinsaturados proporcionando desta forma, modificações no aroma e textura dos pescados (FRANKEL, 1987). Além disso, pesquisadores sugerem que a oxidação lipídica promove a formação de substâncias nocivas ao organismo humano associadas principalmente a processos inflamatórios e carcinogênese (KUBOW, 1992; VICENTE *et al.*, 2012).

Estudo realizado por Biacs e Daood, (2000) verificaram que o β -caroteno é rapidamente oxidado na presença de radicais peróxil, formados durante aquecimento de alimentos ricos em ácidos graxos poliinsaturados. O aquecimento de pescados promove aceleração da degradação lipídica e, portanto, a forma de amenizar esta degradação é a utilização de antioxidantes como carotenoides e ácido ascórbico, como uma possível alternativa para proteção dos ácidos graxos poliinsaturados presentes (HUR *et al.*, 2007).

Foi verificado que a esterilização promoveu migração de 5 a 15% do β -caroteno presente no molho de tomate para a sardinha esterilizada (ANEXO C). Resultado elucidado também pelos autores Garcia arias *et al.*, (1991); Lago e Antoniassi, (2000); Tarley *et al.*, (2004). A variação encontrada nas amostras pode ter sido promovida devido à homogeneização irregular nas latas.

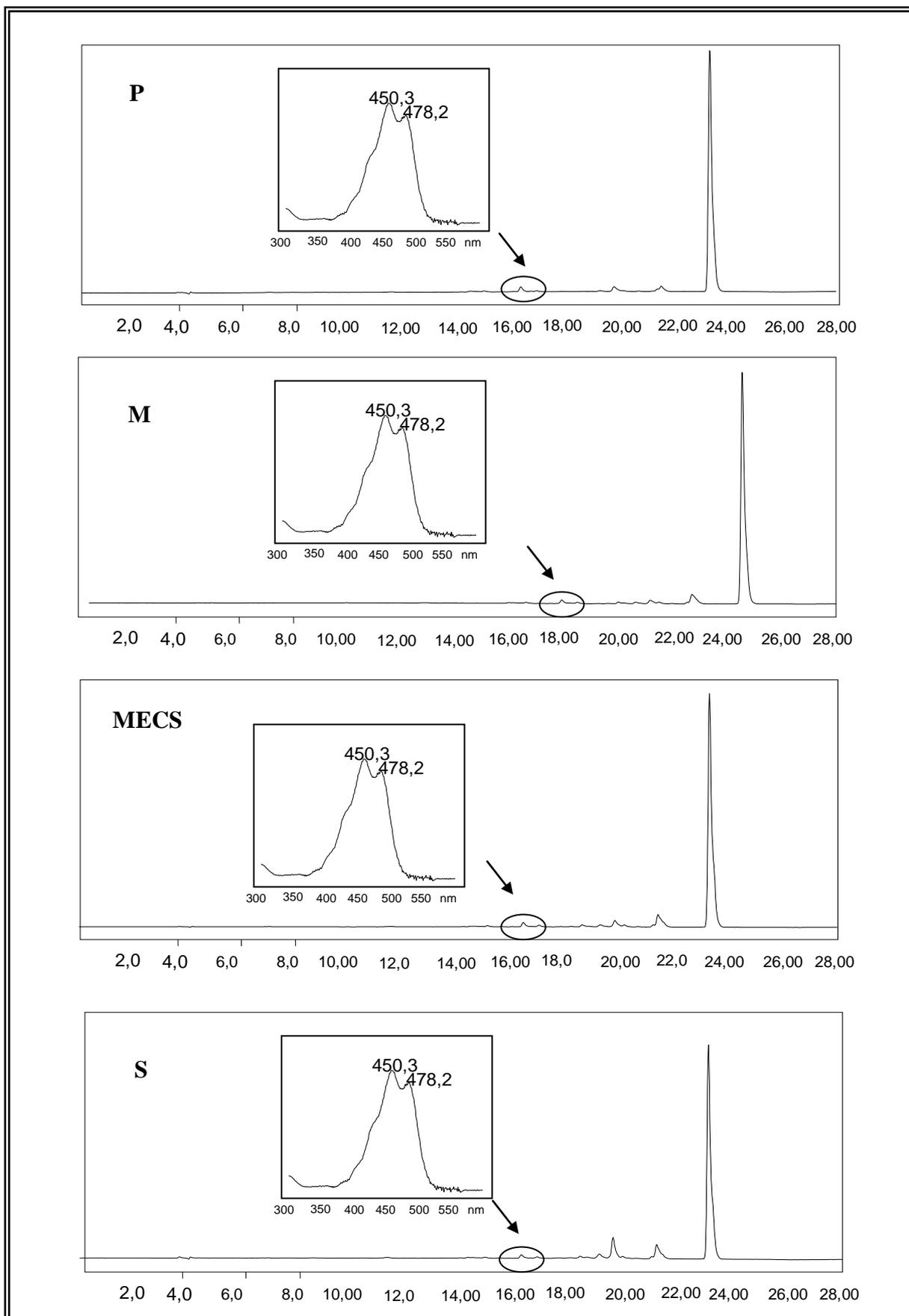


Figura 47: Perfil cromatográfico e espectro de absorção UV/VIS do β -caroteno presente nas amostras P, ME, MECS e SE.

4.7 Efeito da esterilização sobre a formação de isômeros *cis*-licopeno

O licopeno é encontrado nos alimentos *in natura* em torno de 90% na forma geométrica *trans* (SHI *et al.*, 2000). Entretanto, estudos demonstram que o processamento térmico destes alimentos pode promover a isomerização do licopeno e assim, aumentar a proporção da forma isomérica *cis* (SHI *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2008).

Na tabela 21 estão apresentadas as porcentagens encontradas de isômeros *cis* nas amostras de P, ME, MECS. A polpa de tomate *hot break* analisada possui teor de 94,5% de *trans* licopeno e 5,5% de *cis* licopeno. Apesar de a polpa ser um produto processado termicamente, o teor de isômeros *cis* encontrado foi inferior ao relatado por Tavares & Rodriguez, (1994) e Shi *et al.*, (2008), que verificaram teores de 15% a 29% de isômeros *cis* em polpas de tomate. É possível que essa oscilação seja devida a diferenças no tempo-temperatura do processamento aplicado no produto.

Ao comparar o teor de isômeros encontrado nas amostras de ME com P, observa-se que a esterilização do molho de tomate proporcionou aumento de 89% do teor de isômeros. Esta porcentagem foi o dobro da obtido pelos autores Unlu *et al.*, (2007), ao compararem o teor de isômeros *cis* do molho de tomate não aquecido com molhos de tomates enlatados esterilizados a 127°C por 40 minutos. No entanto, os teores de *cis* encontrados nas MECS foram 4,8% superiores ao teor do ME. Este aumento no teor de isômeros pode ter sido propiciado pela presença lipídica da carne de sardinha. Segundo Stahl e Sies, (1992); Xianquan *et al.*,(2005); Unlu *et al.*,(2007) a presença de óleo em produtos derivados de tomate, pode favorecer formação de isômeros *cis*.

Tabela 20: Porcentagem média de isômeros das amostras de P, ME e MECS.

Tratamento	licopeno total (mg/100g polpa b.s)	% <i>trans</i>	% <i>cis</i>
Polpa <i>hot break</i> (P)	212,71±3,64 ^a	94,5	5,47
Molho Esterilizado (ME)	168,15±6,39 ^b	89,68	10,32
Molho Est. Sardinha(MECS)	72,57±5,24 ^c	89,01	10,84

Letras diferentes significam que as amostras obtiveram diferença significativa com confiabilidade de 95% de confiança (p<0,05).

Agarwal *et al.*,(2001) observaram que ao aquecer durante 1 hora, suco de tomate contendo 10% de óleo de milho, obteve-se aumento de 30% de isômeros *cis*, quando comparado ao suco sem adição de óleo de milho. Resultado este, também concluído pelos autores Van Het Hof *et al.*, (1998) que, após aquecerem polpa de tomate com 10% de óleo de milho a 100°C por 30 minutos, verificaram que os teores de isômeros *cis* aumentaram em 55% quando comparado a polpas não adicionadas de óleo. Os pesquisadores sugerem que a presença lipídica, favorece a melhor solubilização do licopeno, tornando-o mais exposto a isomerização.

Nas Figuras 49 a 52 estão apresentados os perfis cromatográficos e espectros de absorção UV/VIS dos isômeros *cis*-licopeno das amostras P, ME, MECS e SE. Nos cromatogramas é possível observar a prevalência de espectro de absorbância de *cis* licopeno apresentado na Figura 48. Aproximadamente 4 picos de isômeros *cis* foram encontrados em quase todas as amostras (exceto ME₄). Não foi observado diferença de isômeros nas amostras de ME, MECS e S (ANEXO D). Não foi possível a identificação dos isômeros individualmente.

Observou-se neste estudo, que o aumento do teor de isômeros *cis* ocorreu simultaneamente com decréscimo do teor de *trans* licopeno. O resultado deste estudo confirma o sugerido pelos autores Stahl & Sies, (1996); Shi & Le Maguer, (2000); Unlu *et al.*, (2007) e Shi *et al.*, (2008) que o aquecimento térmico favorece a formação de isômeros *cis*, porém, contradiz os resultados obtidos nas pesquisas realizadas por Nguyen & Schwartz, (1998); Nguyen *et al.*, (2001); Re *et al.*, (2002) que mostraram que o aquecimento não promoveu modificações de relevantes de formas isoméricas *cis*.

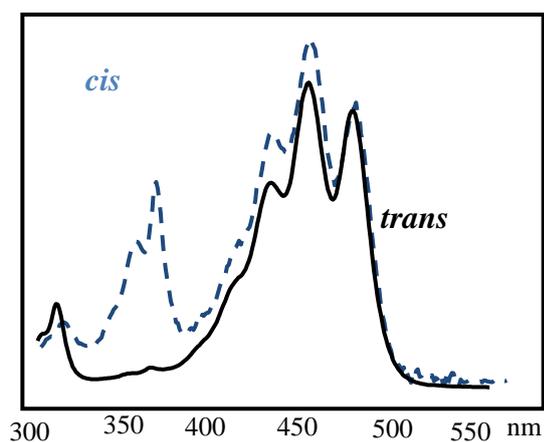


Figura 48: Espectro de absorvância de sobreposição do *trans* licopeno e principal *cis*-isômero encontrado nas amostras (-----).

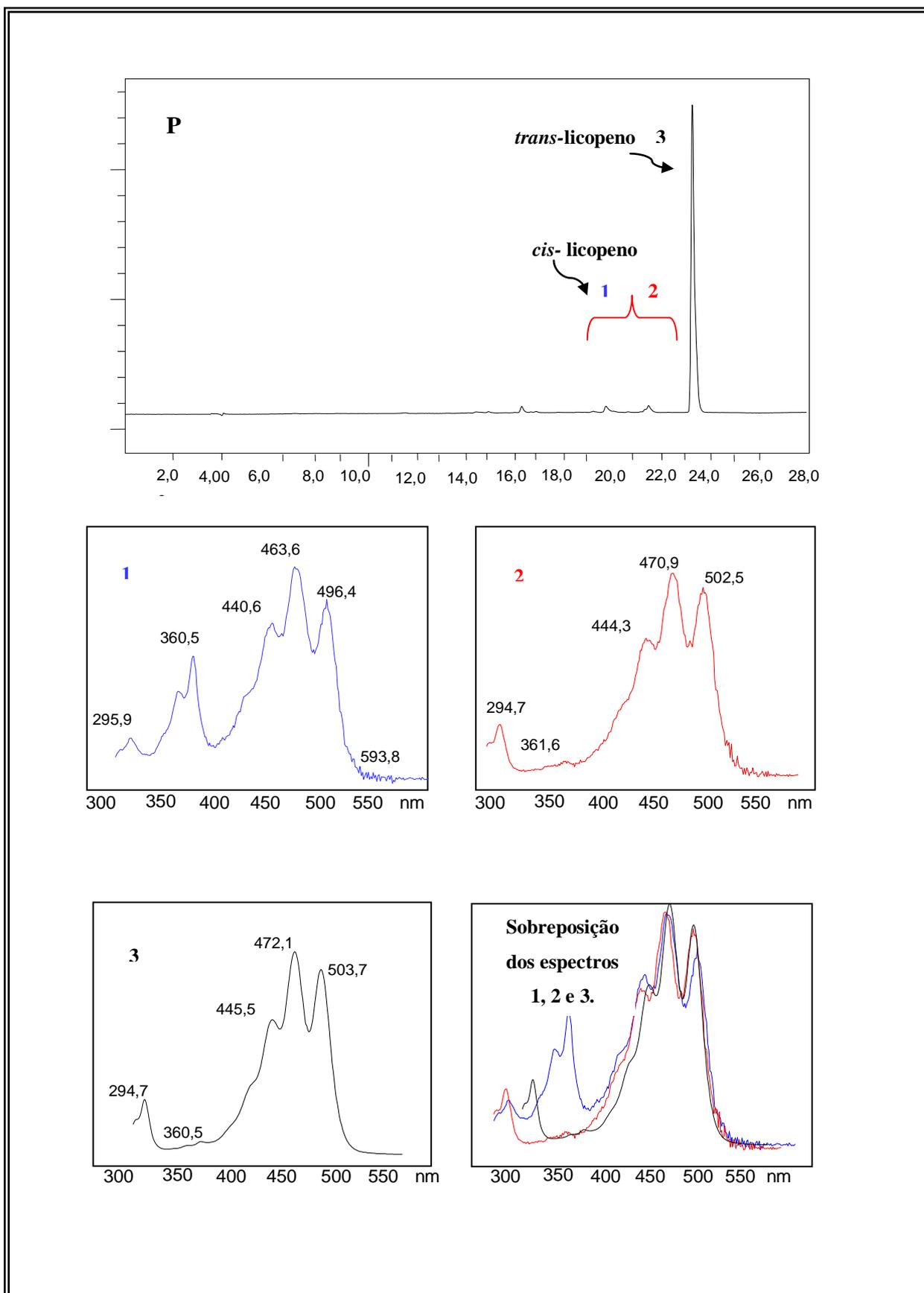


Figura 49: Perfil cromatográfico e espectros de absorção UV/VIS dos isômeros *cis*-licopeno encontrados na amostra de P.

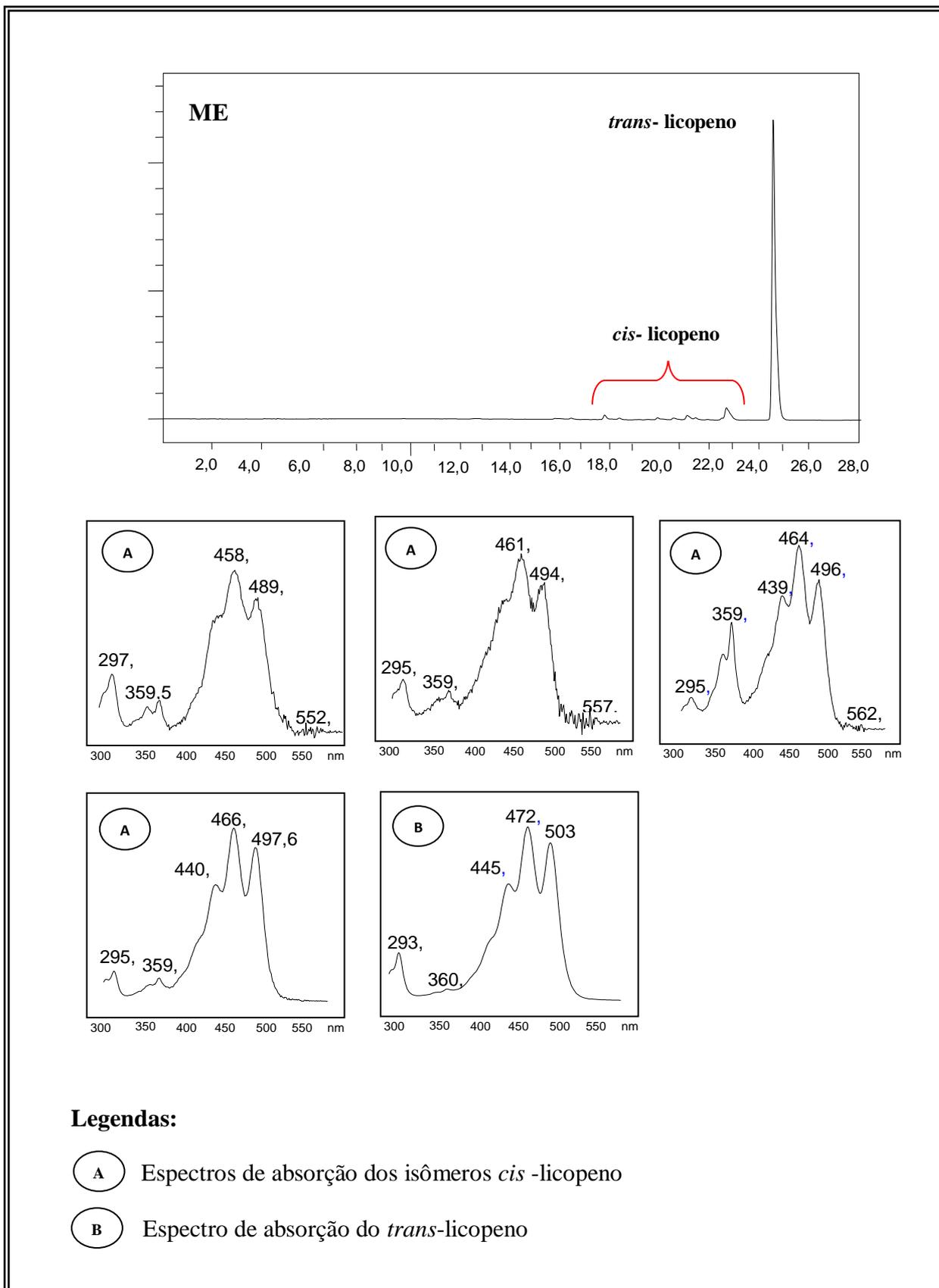


Figura 50: Perfil cromatográfico e espectros de absorção UV/VIS dos isômeros *cis* encontrados na amostra de ME 1.

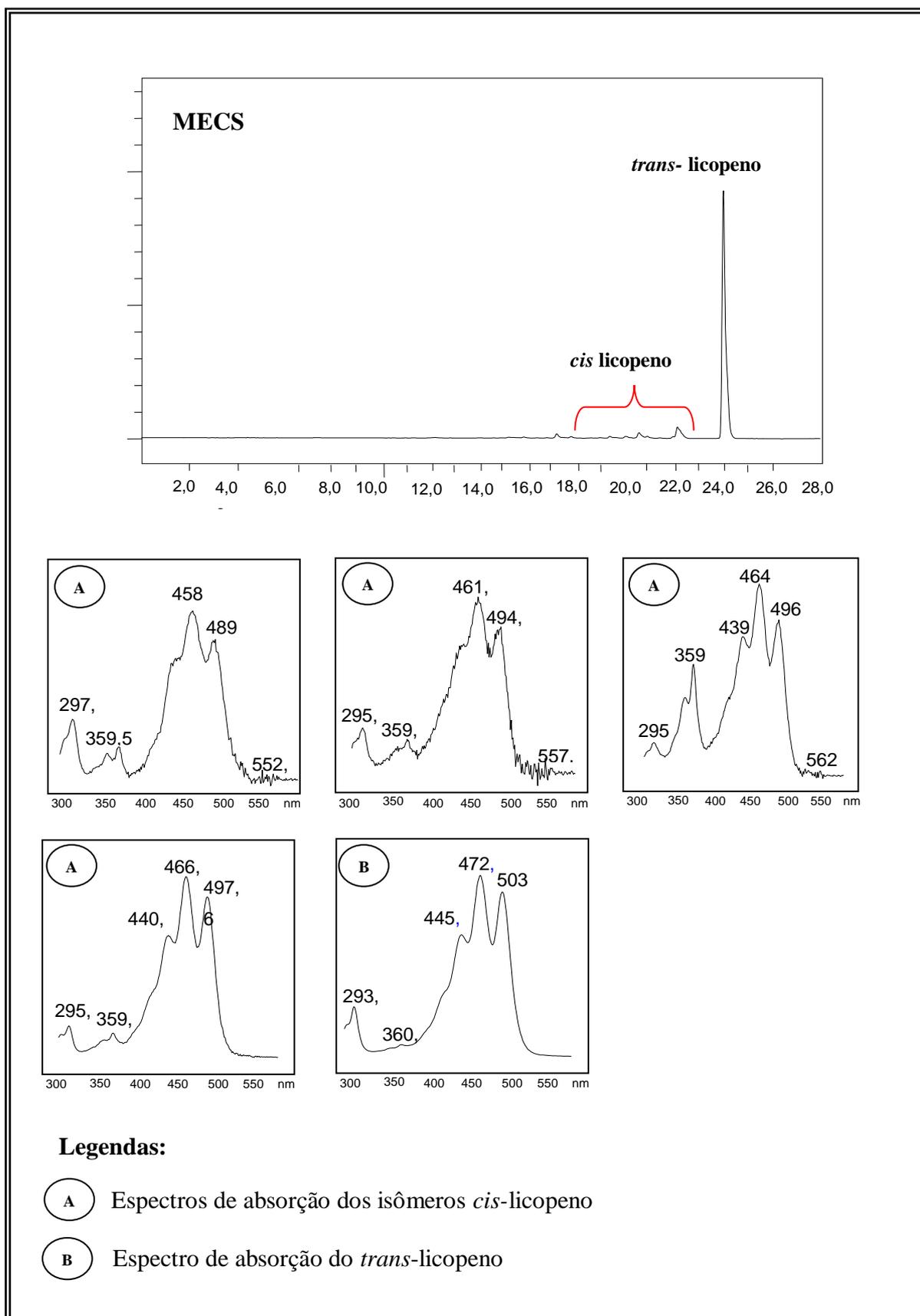


Figura 51: Perfil cromatográfico e espectros de absorção UV/VIS dos isômeros *cis*-licopeno encontrados na amostra de MECS 1.

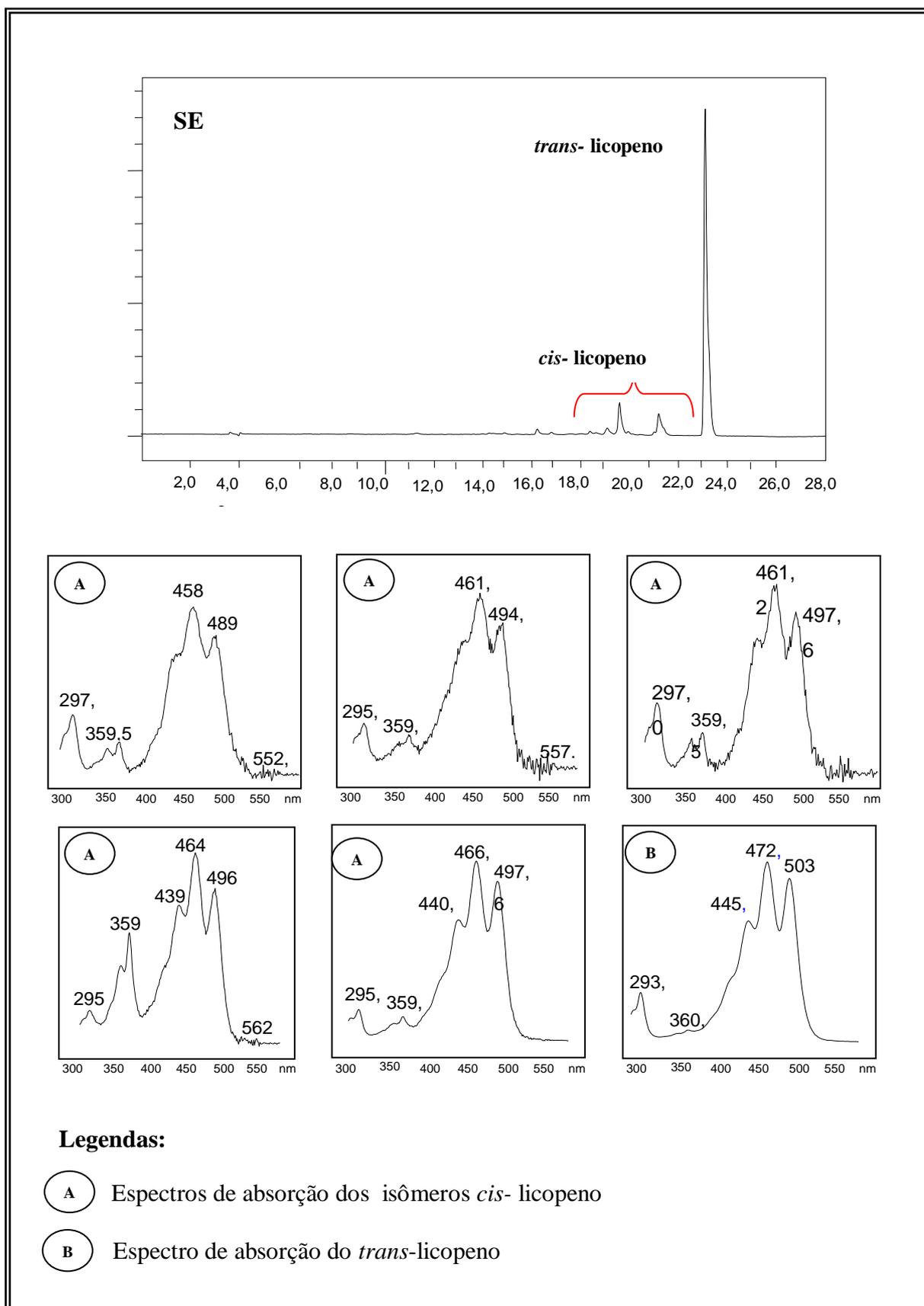


Figura 52: Perfil cromatográfico e espectros de absorção UV/VIS dos isômeros *cis* encontrados na amostra de SE 1.

Nas Tabelas 21 e 22 estão apresentados os teores em mg/100g de polpa em base seca de *cis*-licopeno, *trans*-licopeno e licopeno total.

Tabela 21: Teores médios de *cis*-licopeno, *trans*-licopeno e licopeno total em mg/100g de polpa em base seca nas amostras de P, ME, MECS.

Tratamentos	Concentração em mg/100g de polpa em base seca		
	<i>cis</i> -licopeno	<i>trans</i> -licopeno	licopeno total
Polpa <i>hot break</i> (P)	11,65±0,56 ^b	201,06±4,20 ^a	212,71±3,64 ^a
Molho Esterilizado (ME)	17,39±1,37 ^a	150,8± 5,18 ^b	168,15±6,39 ^b
Molho Est.Sardinha (MECS)	7,87±0,91 ^c	64,6±4,76 ^c	72,57±5,24 ^c

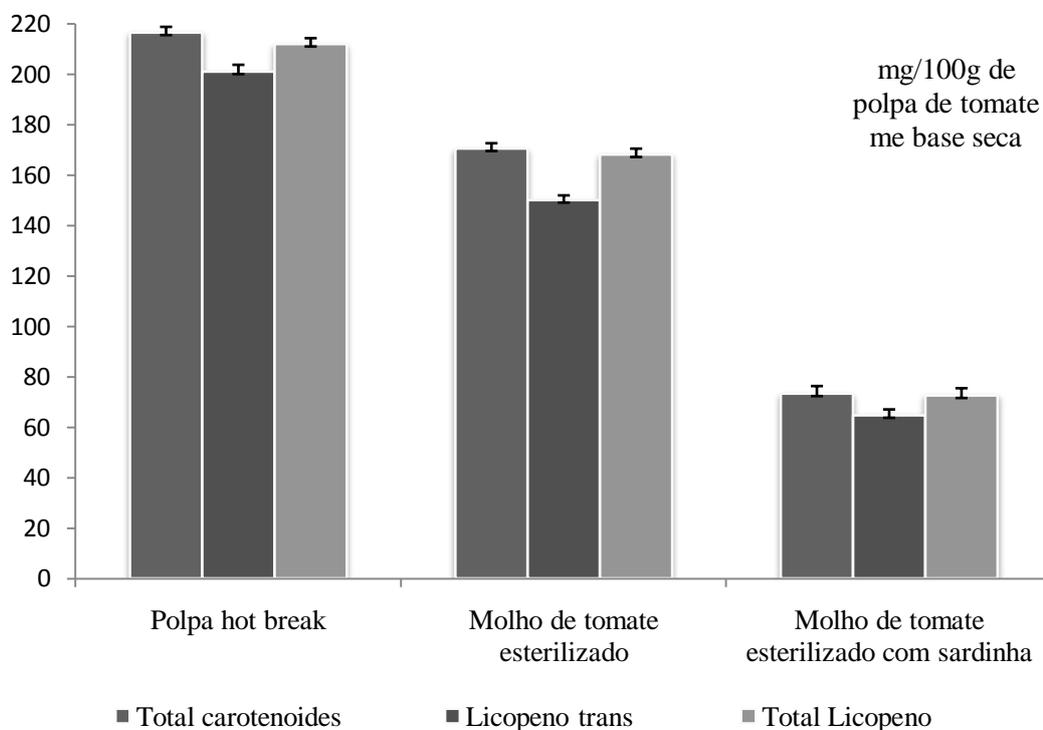


Figura 53: Teor de carotenoides, *trans*-licopeno e licopeno total das médias das amostras de P, ME e MECS

Tabela 22: Teores *cis*-licopeno, *trans*-licopeno e licopeno total em mg/100g de polpa em base seca encontrados nas réplicas das amostras de ME, MECS, SE.

Amostras	Concentração mg/100g de polpa em base seca		
	<i>cis</i> -licopeno	<i>trans</i> -licopeno	licopeno total
ME 1	17,14±0,95	150,39±9,27	167,54±9,9
ME 2	15,55±1,62	144,70±3,70	160,25±0,08
ME 3	18,40±1,37	150,56±1,80	168,96±3,04
ME 4	18,48±1,68	157,38±2,34	175,86±15,05
MECS 1	7,24±0,88	58,94±7,14	66,18±7,99
SE 1	1,48±0,21	6,52±0,53	7,99±0,54
MECS 2	7,78±1,06	59,25±4,93	67,04±6,00
SE 2	0,71±0,14	5,77±0,57	6,48±0,01
MECS 3	6,44±0,77	54,26±3,03	60,69±3,76
SE 3	0,45±0,19	4,11±0,71	4,57±0,79
MECS 4	6,83±0,26	63,95±4,52	70,78±4,78
SE 4	0,57±0,07	5,97±0,04	6,54±0,11

Pesquisas realizadas pelos autores Chanforan *et al.*, (2012) e Sharma & Le Maguer, (1996) não constatarem diferença significativa no teor de licopeno após polpas e molhos tomates serem ao aquecidos a temperaturas superiores a 100°C.

No presente trabalho, ao avaliar a estabilidade do licopeno das amostras de ME, foi observado que a esterilização promoveu degradação significativa de 21% do composto comparado com o teor da polpa *hot break* (Figura 53). Entretanto, este resultado foi satisfatório, visto que mesmo com esta degradação, obteve-se retenção de 79% do licopeno. Este resultado foi bastante similar ao encontrado na pesquisa realizada por Luterroti *et al.*, (2015) que verificaram após processarem polpas de tomates enlatadas a temperaturas de 120°C por 60 minutos e a 135°C pelo mesmo tempo obtiveram degradação de 23% e 21% respectivamente.

Resultados de degradações superiores, foram encontrados pelos autores Shi & Le Maguer, (2003) e Jacob *et al.*, (2010). Após aquecerem polpas de tomate a 150°C por 2 horas e a 110°C por 30 minutos obtiveram teores de degradação do licopeno de 30% e 38% respectivamente. Mayeaux *et al.*, (2006) pesquisaram o efeito do aquecimento de polpas de tomates quando expostas ao forno convencional, microondas e sob fritura. Concluíram, que em polpas aquecidas em forno a 100°C por 60 minutos ou a 125 °C por 20 minutos ou a 150 °C por 10 minutos, a degradação de licopeno foi igual a 50% em todos os binômios tempo-temperatura. No entanto, verificaram que o aquecimento da polpa em microondas sob alta potência ou pelo método de fritura, durante apenas 1 minuto de exposição, promoveu degradação do licopeno em 36% e 64% respectivamente.

No entanto, segundo Dewanto *et al.*, (2002) e Ordóñez *et al.*, (2009) o aquecimento do licopeno pode melhorar a extração deste caroteno e elevar sua atividade antioxidante.

Dewanto *et al.*, (2002) verificaram que a atividade antioxidante e o teor de licopeno de tomates aquecidos a temperaturas entre 60-120°C, era superior a de tomates não processados. Ordóñez *et al.*, (2009) avaliaram a estabilidade do licopeno presente em tomates cerejas

enlatados. Os autores observaram que tomates não-esterilizados, continham teores significativamente menores ($p < 0,01$) de licopeno (90,2 mg/Kg), quando comparados com tomates esterilizados, que continham teores de (98,36 mg/Kg). Propuseram que este aumento foi, devido à maior exposição do tempo do tomate a determinada temperatura, o que favoreceu a ruptura das paredes celulares do fruto, proporcionando maior liberação celular do licopeno. Estudo realizado por Abete *et al.*, (2013) ao comparar o teor de licopeno em tomates enlatados e tomates *in natura*, observaram que os frutos enlatados possuíam 154,66 mg/100g licopeno em base seca enquanto que os tomates *in natura*, possuíam basicamente, teor de 90% inferior de licopeno (81,26mg/100g licopeno base seca). Assim, concluíram que a esterilização, favorece a melhor liberação e extração do pigmento.

Entretanto, neste estudo, a esterilização das amostras de ME e MECS não promoveram o aumento do teor de licopeno. As amostras de ME apresentaram teor médio de 168 mg/100g de licopeno total, enquanto as amostras de MECS obtiveram teor de 77mg/100g. Foi observado que a esterilização do molho esterilizado com sardinha (MECS) resultou na redução de 66% do total de licopeno quando comparado a polpa. Este resultado demonstra que, apesar de ambas amostras terem sido submetidos ao mesmo processamento térmico ou seja, mesmas condições de tempo-temperatura de exposição, a estabilidade do licopeno foi muito diferente, levando a conclusão que os carotenos são mais suscetíveis a degradação quando expostos a presença da sardinha do que ao processamento térmico propriamente dito.

A provável explicação para maior degradação nas amostras de MECS pode ser relacionada a diversos fatores ocorridos simultaneamente. Um dos fatores, é que a esterilização promoveu a migração do licopeno para carne da sardinha e simultaneamente, a migração do óleo da sardinha para o molho, assim, é possível que, devido ao licopeno ser um composto lipossolúvel, esta migração tenha favorecido a melhor solubilização do composto, proporcionando assim, sua maior exposição e suscetibilidade a degradação pela temperatura (KNOCKAERT *et al.*, 2012; SHALIN *et al.*, 2013). O teor de licopeno que migrou para sardinha foi, em média, 7 a 12% do teor total de licopeno do molho, no entanto o teor lipídico migrado para o molho de tomate não foi possível quantificar.

Estudo realizado por Knockaert *et al.*, (2012) compararam a estabilidade do licopeno presente em polpas de tomates *hot break* misturadas a azeite de oliva, após serem submetidas a métodos de processamentos tradicionais, como a pasteurização, a esterilização e o processamento de alta pressão hidrostática (HPH). As polpas de tomates foram pasteurizadas a 90°C por 10 minutos, esterilizadas ($F_0=3\text{min}$) e submetidas HPH por 20 minutos à 600MPa à 45°C. Os binômios de tempo-temperatura e de pressão estabelecidos, foram definidos com base na eliminação de micro-organismos patogênicos, como *Salmonella* e *Clostridium botulinum*. Os autores observaram que o tratamento de HPH, não promoveu degradação do licopeno, no entanto, os tratamentos de pasteurização e esterilização promoveram degradações significativas de 14% e 47% do composto, respectivamente. Sugeriram que a escolha do tipo de tratamento térmico está diretamente relacionado, com a estabilidade do composto, e que, produtos derivados de tomates, quando misturados a componentes lipídicos, são degradados mais rapidamente. Shalin *et al.*, (2013) avaliaram a estabilidade de tomates triturados e misturados em óleo de oliva e vinagre durante 20 minutos. Os autores verificaram que tomates misturados, em óleo de oliva, obtiveram perda de 37% do teor de licopeno, já amostras misturadas com óleo e vinagre, a perda foi de 32%. Porém, amostras homogeneizadas apenas com vinagre, obtiveram degradação do licopeno em apenas 7%. Assim, concluíram que a presença de lipídeos impacta diretamente na degradação do composto.

Outra possível explicação para maior degradação do licopeno nas amostras de MECS é que, o licopeno tenha atuado como antioxidante nas amostras, afim de combater a formação de radicais livres gerados pela degradação dos ácidos graxos das sardinha.

Segundo Hur *et al.*,(2007), o processamento térmico de pescados promove a oxidação lipídica e a degradação dos ácidos graxos presentes. No entanto, a intensidade desta degradação é variável, pois é dependente da qualidade da matéria prima, da presença de antioxidante, das condições de processamento (binômio tempo-temperatura) e das condições de estocagem que os produtos foram submetidos (JACOBSEN *et al.*, 2007).

Estudos sugerem que o licopeno possa retardar a peroxidação lipídica (AGARWAL *et al.*, 2001; BOON *et al.*,2008) e portanto, deva ser utilizado com antioxidante natural em alimentos processados, para reduzir a formação de radicais livres gerados pelo processamento térmico (XU *et al.*, 2009; BOSELLI *et al.*, 2012). No entanto, a efetividade do antioxidante no alimento é dependente de sua concentração, da composição lipídica do alimento e do tipo de processamento aplicado (HUR *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2009).

A degradação do licopeno na presença de lipídeos, pode ser acelerada devido a presença de compostos pró-oxidantes e/ou presença de íons metálicos (MAYEAUX *et al.*, 2006; COSMAI *et al.*, 2013). Pesquisa realizada por Boon *et al.*, (2008) avaliou a estabilidade de emulsões formuladas com licopeno e a relação da formação de produtos de oxidação lipídica em relação a degradação do licopeno. Os autores verificaram que a degradação de ácidos graxos das emulsões impactaram significativamente na perda do licopeno. Concluíram também, que a presença do licopeno nas emulsões, promoveu a retardação da degradação lipídica apesar de não ter evitá-la completamente. Em outro estudo, Boon *et al.*,(2009) avaliaram o efeito da presença de hidroperóxidos e íon férrico na degradação de emulsões contendo licopeno. Os pesquisadores observaram que a presença de ambos, proporcionaram rápida degradação do carotenoide. No entanto, sugeriram que em produtos com baixo pH, a presença de íons metálicos impactam, mais significativamente, na degradação do que a presença de hidroperóxidos.

Em tecidos de animais, é possível encontrar íons metálicos ligados as proteínas, como por exemplo, a mioglobina. Esta proteína conjugada é constituída por uma fração protéica, denominada globina e uma parte não proteica denominada *grupo heme*. Este grupo possui uma estrutura relativamente frágil aos processos oxidativos, devido à presença de íon ferroso central (Fe^{+2}). Durante a esterilização da sardinha, o aquecimento promove a desnaturação proteica e por conseqüência, propicia a oxidação do grupo heme e liberação do íon ferroso (CARLSEN *et al.*, 2005; HUR *et al.*, 2007; DEVINE *et al.*,2014). O íon ferroso (Fe^{+2}) é oxidado a íon férrico (Fe^{+3}) durante o aquecimento, tornando-se assim, um radical pró-oxidante capaz de promover o aumento da formação de hidroperóxidos e da degradação do licopeno (HUR *et al.*,2007; BOON *et al.*,2008; DEVINE, *et al.*,2014). Assim, pode-se sugerir, que a presença da sardinha propiciou a formação de radicais livres, resultando na degradação significativa do licopeno nas amostras de MECS.

É importante notar que apesar da degradação do licopeno nas amostras de ME e MECS ter sido significativa, a concentração média deste composto por lata, foi considerada elevada. Na Tabela 23 estão apresentados os teores encontrados de mg/licopeno por lata. Os teores médios foram calculados, conforme item 3.3.4.4 e 3.3.4.5. O peso médio encontrado nas latas das amostras foi de 133g de produto, teor 7% superior ao encontrado nas latas tradicionais de conservas de pescado. De acordo com a Tabela 23, as amostras de MECS apresentaram teores de licopeno entre 4,66 mg a 6,40 mg. Também, pode-se observar que grande parte do licopeno presente na lata, foi encontrada na sardinha, devido à migração do licopeno presente no molho para a carne do pescado. Do total de licopeno presente na lata, cerca de 32 a 60% deste composto foi encontrado na sardinha.

Tabela 23: Teor de mg/licopeno por lata analisada de ME, MECS, SE.

Amostras	Licopeno total mg/100g base seca polpa	peso da amostra na lata (g)	umidade (g/100g)	mg/licopeno por lata
ME 1	167,54	133	87,28	28,344
ME 2	160,25	132	87,57	26,293
ME 3	168,96	133	87,61	27,842
ME 4	175,86	133	87,38	29,517
MECS 1	66,18	33	82,64	3,791
SE 1	7,99	100	67,35	2,609
MECS 2	67,04	29	86,61	2,603
SE 2	6,48	104	69,44	2,059
MECS 3	60,69	33	83,78	3,248
SE 3	4,57	101	67,25	1,512
MECS 4	70,78	29	83,75	3,336
SE 4	6,54	103	68,33	2,133

O teor médio de licopeno presente por lata de amostras de ME e MECS foi de 28 mg e 5 mg de licopeno, respectivamente. A partir destes resultados, pode-se considerar que a ingestão de conservas de sardinha com molho de tomate é uma excelente fonte de licopeno. Segundo Abete *et al.*,(2013) o consumo diário de 12 a 27 mg de licopeno/dia pode promover a redução das taxas de colesterol LDL. Já, segundo Rao *et al.*,(2002); Porrini *et al.*,(2005) a ingestão diária de 5 a 10mg de licopeno é o suficiente para prevenção de doenças. Assim, conclui-se que o consumo dia de 1 lata de sardinha em conserva com molho de tomate pode ser uma ótima alternativa para o aumento do consumo deste carotenoide e consequentemente, promover melhoria na saúde da população brasileira.

5 CONCLUSÕES

Foi possível preparar e processar sardinhas enlatadas como molho de tomate junto a indústria de conservas de pescados situada no estado Rio de Janeiro. O processamento de sardinhas em conservas utilizado, cumpriu os padrões pré-estabelecidos de identidade e qualidade exigidos pela legislação.

O método de extração e isolamento do padrão analítico de licopeno obtido à partir da matriz de Melão de São Caetano, foi considerado satisfatório, simples e econômico, permitindo a obtenção de padrão analítico com 96% de pureza.

O método de quantificação por normalização comparado com padronização externa mostrou-se ser mais eficaz na quantificação dos carotenoides pois apresentou menor desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação.

Não foram identificados teores de ácido ascórbico em nenhuma das amostras analisadas no experimento.

Não foram detectados carotenoides nas sardinhas evisceradas cruas. Entretanto, após sua esterilização junto ao molho de tomate, foi possível encontrar, em cada lata de amostra migração de aproximadamente de 47% do licopeno para a carne da sardinha.

Foi observado que a esterilização não promoveu a degradação significativa do β -caroteno das amostras de molho esterilizado (ME). No entanto, a presença da sardinha no molho promoveu degradação significativa de 78% do composto.

A esterilização promoveu migração de 5 a 15% do β -caroteno presente no molho de tomate para a sardinha esterilizada.

As amostras de molho esterilizado com sardinha (MECS) apresentaram maior porcentagem de isômeros *cis*-licopeno.

Os teores de licopeno obtidos nas amostras de ME e MECS expostas ao aquecimento a 126°C por 40 minutos foram satisfatórios, visto que, as amostras obtiveram retenção de 79% e 34% do composto respectivamente. Verificou-se que a presença da sardinha impactou significativamente na isomerização e degradação do licopeno e que, as possíveis explicações para que isso sejam a melhor solubilização do licopeno em óleo e atuação do licopeno como antioxidante ao combate de radicais pró-oxidantes gerados da degradação dos ácidos graxos da sardinha e ainda liberação do íon ferroso da mioglobina presente na carne do pescado.

Concluí-se que o licopeno é um carotenoide resistente a esterilização industrial e que sua estabilidade é mais dependente da matriz em que é homogeneizado do que ao tempo/temperatura que é exposto.

Amostras de MECS apresentaram teor aproximadamente de 5 mg de licopeno, valor este, considerado por muitos pesquisadores como quantidade mínima para consumo diário usada a prevenção de doenças. Assim, conclui-se que o consumo dia de 1 lata de sardinha em conserva com molho de tomate processada, nestas condições, pode ser uma ótima alternativa para o aumentar a ingestão deste carotenoide, auxiliando a melhoria da saúde da população brasileira.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste experimento, torna-se necessário novos estudos que correlacionem a cinética de degradação do licopeno em conservas de sardinha com os binômios tempo-temperatura aplicados durante a esterilização destes produtos. Assim, os resultados obtidos poderiam contribuir para o desenvolvimento de processos térmicos mais eficientes, visando minimizar a degradação do licopeno presente no molho de cobertura.

Além disso, sugere-se estudo cinético do efeito do tratamento térmico no perfil lipídico das sardinhas em conservas de molho de tomate e a avaliação do efeito protetor do molho de tomate a frente à oxidação lipídica.

-

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABETE, I.; PEREZ-CORNAGO, A.; NAVAS-CARRETERO, S.; BONDIA-PONS, I.; ZULET, M. A.; MARTINEZ, J. A. A regular lycopene enriched tomato sauce consumption influences antioxidant status of healthy young-subjects: A crossover study. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 28-35, 2013.

ABUSHITA, A. A.; HEBSHI, E. A.; DAOOD, H. G.; BIACS, P. A. Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. **Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 207-212, 1997.

AGARWAL, A.; SHEN, H.; AGARWAL, S.; RAO, A. V. Lycopene Content of Tomato Products: Its Stability, Bioavailability and *In Vivo* Antioxidant Properties. **Journal of Medicinal Food**, v. 4, n. 1, p. 9-15, 2001.

AMANCIO, R. D.; SILVA, M.V. Consumo de carotenoides no Brasil: a contribuição da alimentação fora do domicílio. **Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas**, v. 19, n. 2, p. 130-141, 2012.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16.ed. Arlington: AOAC; 1995

BADOLATO, E. S. G.; AUED-PIMENTEL, S.; TAVARES, M.; MORAIS, C. Sardinhas em óleo comestível. Parte II. Estudo da interação entre os ácidos graxos do peixe e do óleo de cobertura. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n. 1, p. 21-6, 1994.

BANDARRA, N. M.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; EMPIS, J. M.; CHRISTIE, W. Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine (*Sardina pilchardus*). **Journal of Food Science**, v. 62, n. 1, p. 40-42, 1997.

BARRINGER, T. A.; HARRIS, W. S. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease prevention. **Current Nutrition Reports**, v. 1, n. 2, p. 115-122, 2012.

BENDICH, A. Carotenoids and the immune response. **Journal of Nutrition**, v. 119, n. 1, p. 112-115, 1989.

BIACS, P. A.; DAOOD, H. G. Lipoxygenase-catalysed degradation of carotenoids from tomato in the presence of antioxidant vitamins. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, n. 6, p. 839-845, 2000.

BLUM, A.; MONIR, M.; WIRSANSKY, I.; BEN-ARZI, S. The beneficial effects of tomatoes. **European Journal of Internal Medicine**, v. 16, n. 6, p. 402-404, 2005.

BOHM, V.; PUSPITASARI-NIENABER, N. L.; FERRUZZI, M. G.; SCHWARTZ, S. J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 221-6, 2002.

BOILEAU, T. W.; BOILEAU, A. C.; ERDMAN, J. W., JR. Bioavailability of *all-trans* and *cis*-isomers of lycopene. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, n. 10, p. 914-919, 2002.

BONNIE, T. P.; CHOO, M. Oxidation and thermal degradation of carotenoids. **Journal of Oil Palm Research**, v. 11, n.1, p. 62-78, 1999.

BOON, C.; XU, YUE, Z.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. A. Factors Affecting Lycopene Oxidation in Oil-in-Water Emulsions. **Journal. of Agricultural. and Food Chemistry**, v. 56, p. 1408–1414, 2008

BOON,C.; XU, MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E.A. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 6, p. 515-32, 2010.

BOON, C.; ZHIMIN, X.; XIAOHUA Y.; D. JULIAN, M.C.; JOCHEN, W.; ANDERICA, D. Role of Iron and Hydroperoxides in the Degradation of Lycopene in Oil-in-Water Emulsions. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 2993–2998, 2009.

BORGUINI, R. G.; TORRES, E. A. F. S Tomatoes and Tomato Products as Dietary Sources of Antioxidants. **Food Reviews International**, v. 25, n. 4, p. 313-325, 2009.

BOSELLI E.; CARDENIA, V.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T. Cholesterol photosensitized oxidation in muscle foods. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.114, p. 644–655, 2012.

BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, 2011. Disponível: < <http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2140-mpa-lanca-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2011> >.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **Faseb Journal**, v. 9, n. 15, p. 1551-1558, 1995.

BROWN, M.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J.K; DUNSTAN, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, n. 1, p. 315-331, 1997.

CAPONIO, F.; SUMMO, C.; PASQUALONE, A.; GOMES, T. Fatty acid composition and degradation level of the oils used in canned fish as a function of the different types of fish. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 8, p. 1117-1122, 2011.

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 Chemistry**, v. 58, p. 227-231, 1997.

CAPANOGLU, E.; BEEKWILDER, J.; BOYACIOGLU, D.; HALL, R.; VOS, R. Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 964-973, 2008.

CARDENIA, V.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; BALDACCI, E.; LERCKER, G. Health-related lipids components of sardine muscle as affected by photooxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 32-38, 2013.

CARDOSO, C.; AFONSO, C.; LOURENÇO, H.; NUNES, M.L. Seafood consumption health concerns: The assessment of methylmercury, selenium, and eicosapentaenoic + docosahexaenoic fatty acids intake. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 581-588, 2013.

CARLSEN, C. U.; MOLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Heme-iron in lipid oxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, n. 3, p. 485-498, 2005.

CHANFORAN, C.; LOONIS, M.; MORA, N.; CARIS-VEYRAT, C.; DUFOUR, C. The impact of industrial processing on health-beneficial tomato microconstituents. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1786-1795, 2012.

CHASSE, G. A.; MAK, M. L.; DERETAY, E.; FARKAS, I.; TORDAY, L. L.; PAPP, J.G.; SARMA, D. S. R.; AGARWAL, A.; CHAKRAVARTHI, S.; AGARWAL, S.; RAO, A. V. An ab initio computational study on selected lycopene isomers. **Journal of Molecular Structure: Theochem**, v. 571, n. 3, p. 27-37, 2001.

CLINTON, S. K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 2, p. 35-51, 1998.

COLE, E.; KAPUR, N. The stability of lycopene. I.-Degradation by oxygen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, n. 6, p. 360-365, 1957.

COLEMBERGUE, J. P.; GULARTE, M. A.; ESPÍRITO SANTO, M. Caracterização química e aceitabilidade da sardinha (*sardinella brasiliensis*) em conserva adicionada de molho com tomate. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, n. 2, p. 273-278, 2011.

COLLINS, C. H. **Introdução a métodos cromatográficos**. Editora da UNICAMP, 1990.

CONDRON, K. N.; LEMENAGER, R. P.; CLAEYS, M. C.; LIPKIE, T. E.; SCHOONMAKER, J. P. Supplemental β -carotene I: Effect on plasma vitamin A, growth, performance, and carcass characteristics of feedlot cattle. **Meat Science**, v. 98, n. 4, p. 736-743, 2014.

CONN, P. F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 11, n. 1, p. 41-47, 1991.

CONNER, I. P.; SHARMA, S.; LEMIEUX, S. K.; MENDOLA, J. D. Retinotopic organization in children measured with fMRI. **Journal of Vision**, v. 4, n. 6, p. 509-23, 2004.

COOK-MOZAFFARI, P. J.; AZORDEGAN, F.; DAY, N. E.; RESSICAUD, A.; SABAI, C.; ARAMESH, B. Oesophageal cancer studies in the Caspian Littoral of Iran: results of a case-control study. **British Journal of Cancer**, v. 39, n. 3, p. 293-309, 1979.

CRMV/RJ (CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO). NOTA TÉCNICA. **Contribuição das entidades para revisão do RIISPOA**, 2008. Disponível em: <<http://www.crmvsc.org.br/pdf/notatecnicariispoa.pdf>>.

COSMAI, L.; SUMMO, C.; CAPONIO, F.; PARADISO, V.; GOMES, T. Influence of the Thermal Stabilization Process on the Volatile Profile of Canned Tomato-Based Food. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 12, p. 1865- 1870, 2013

DAVEY, M. W.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I.J.; STRAIN, J.J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 825-860, 2000.

DE MELO, P. C. T.; VILELA, N. J. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. **Horticultura brasileira**, v. 23, n. 1, p. 154-157, 2005.

DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K. K.; LIU, R. H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 3010-3014, 2002.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, n. 2, p. 532-538, 1989.

D'EVOLI, L.; LOMBARGI-BOCCIA, G.; LUCARINI, M. Influence of Heat Treatments on Carotenoid Content of Cherry Tomatoes. **Foods**, v. 2, n. 3, p. 352-363, 2013.

EDGE, R.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as anti-oxidants: a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology**, v. 41, n. 3, p. 189-200, 1997.

ENGIN DEMIRAY, YAHYA TULEK, YUSUF YILMAZ. Degradation kinetics of lycopene, β -carotene and ascorbic acid in tomatoes during hot air drying. **LWT - Food Science and Technology**. v.50, p.172-176, 2013.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **Fats and fatty acids in human nutrition. Proceedings of the Joint FAO/WHO Expert**, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/topics/FFA_human_nutrition/en/>.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **The state of world fisheries and aquaculture**. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>>.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **The state of world fisheries and aquaculture**. 2014. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>.

FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION). 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>.

FDA. (FOOD DRUG ADMINISTRATION). **Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies -- Overarching Principles: Kinetics and Pathogens of Concern for All Technologies**. 2013. Disponível :<<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm100198.htm>>.

FEATHERSTONE, S. A review of development in and challenges of thermal processing over the past 200 years — A tribute to Nicolas Appert. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 156-160, 2012.

FERNANDES, C. E.; VASCONCELOS, M. A. S. ; SARUBBO, M.; ANDRADE, L. A; CARDOSO, S.A; DE MELO, A.B. Nutritional and lipid profiles in marine fish species from Brazil. **Food Chemistry**, v. 60, p. 67-71, 2014.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDAO, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, n. 3, p. 172-177, 2002.

FERREIRA, M.; MORAIS, L. ; NICHELE, T. Z.; DEL PINO, J. C. **Química orgânica**. Bookman, 2007.

FLEITH, M.; CLANDININ, M. T. Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v.3, p.205-209, 2005.

FRANKEL, E.N. Secondary products of lipid oxidation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, p.73-85, 1987.

GARCÍA-ARIAS, M. T.; CASTRILLON, A.; NAVARRO, P. Grilling of sardine fillets. Effects of frozen and thawed modality on their protein quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 8, p. 763-769, 2003.

GARCIA ARIAS, T.; CASTRILLON, A.; NAVARRO, P. Modificaciones en la grasa del atún blanco (*Thunnus alalunga*) debidas a la fabricación y almacenamiento de su conserva. **Grasas y aceites**, v. 42, n. 3, p. 179-186, 1991.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 4, p. 317-331, 1999.

GUTIERREZ, L. E.; SILVA, R. C. M. D. Fatty acid composition of commercially important fish from Brazil. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 478-483, 1993.

HALE, M. B.; BROWN, T. Fatty acids and lipid classes of three underutilized species and changes due to canning. **Marine Fisheries Review**, v. 45, n. 4, p. 45-48, 1983.

HUANG, T. L. Omega-3 Fatty Acids, Cognitive Decline, and Alzheimer's Disease: A Critical Review and Evaluation of the Literature. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 21, n. 3, p. 673-690, 2010.

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.

IBAMA (INSTITUO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS). Relatório de reunião sobre a pesca de sardinha-verdadeira nas regiões sul e sudeste. **Brasília: Edições Ibama/MMA–Ministério do Meio Ambiente**, 2004.

IBAMA (INSTITUO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS). Estatística da pesca 2007 Brasil. **Brasília: Edições Ibama/MMA–Ministério do Meio Ambiente** 2007. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/documentos-recursos-pesqueiros/estatistica-pesqueira>>.

IBAMA. (INSTITUO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS). Plano de gestão para o uso sustentável da sardinha-verdadeira *Sardinella brasiliensis* no Brasil. **Brasília: Edições Ibama/MMA–Ministério do Meio Ambiente**. 242p, 2011. Disponível em:< http://www.ibama.gov.br/phocadownload/plano_gestao_sardinha_verdadeira_2011.pdf>.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Pesquisa de orçamentos Familiares 2008-2009: **Aquisição alimentar domiciliar per capita**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf>.

INNIS, S. M. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. **Brain Research**, v. 1237, p. 35-43, 2008.

IOM (INSTITUTE OF MEDICINE). **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids**. National Academies Press, 2000.

JACOB, K.; GARCIA-ALONSO, F. J.; ROS, G.; PERIAGO, M. J. Stability of carotenoids, phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant capacity of tomatoes during thermal processing. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. v. 60, n. 2, p. 192-198, 2010.

JACOBSEN, C.; LET, M. B.; NIELSEN, N. S.; MEYER, A. S. Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation. **Trends in Food Science & Technology**. v. 19, n. 2, p. 76-93, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Editora Artemed, 6ª Ed.711p, 2005.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoid. **Food Chemistry**, v. 78, p. 389–398, 2002.

KILINC, B.; CAKLI, S. Chemical, microbiological and sensory changes in thawed frozen fillets of sardine (*Sardina pilchardus*) during marination. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 275-280, 2004.

KNOCKAERT, G.; PULISSERY, S. K.; COLLE, I.; VAN BUGGENHOUT, S.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Lycopene degradation, isomerization and *in vitro*

bioaccessibility in high pressure homogenized tomato puree containing oil: Effect of additional thermal and high pressure processing. **Food Chemistry**. v. 135, n. 3, p. 1290-1297, 2012.

KOBORI, C. N.; HUBER, L. S.; KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de carotenoides em produtos de tomate; Carotenoid contents in Brazilian tomato products. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 69, n. 1, p. 78-83, 2010.

KRINSKY, N. I.; YEUM, K. J. Carotenoid–radical interactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 305, n. 3, p. 754-760, 2003.

KUBOW, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 2, p.63-81, 1992.

LAGO, R. C. A.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos do óleo de cobertura de sardinhas em conserva armazenadas em temperatura ambiente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. v. 18, n. 2, 2000.

LAMBELET, P.; RICHELLE, M.; BORTLIK, K.; FRANCESCHI, F.; GIORI, A. M. Improving the stability of lycopene Z-isomers in isomerised tomato extracts. **Food Chemistry**. v. 112, n. 1, p. 156-161, 2009.

LIU, D.; SHI, J.; COLINA IBARRA, A.; KAKUDA, Y.; JUN XUE, S. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical. **LWT - Food Science and Technology**. v. 41, n. 7, p. 1344-1349, 2008.

LOIKO, M. R. **Avaliação físico-química e perfil lipídico de Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) e Atum (*Thunnus tynnus*) em óleo e molho com tomate**. 2011. 38p. Curso especialização, Produção, Tecnologia e Higiene de Alimentos de origem animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LUND, E. K. Health benefits of seafood; Is it just the fatty acids? **Food Chemistry**, v. 140, n. 3, p. 413-420, 2013.

LUTEROTTI, S.; BICANIC, D.; MARKOVIĆ, K.; FRANKO, M. Carotenes in processed tomato after thermal treatment. **Food Control**. v, 48, p. 67-74, 2015.

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 Chemistry**. v. 83, n. 1, p. 93-97, 2003.

MALEKSHAHI, M. A.; SAEDISOMEOLIA, A.; DJALALI, M.; DJAZAYERY, A.; POOYA, S.; SOJOUDEI, F. Efficacy of omega-3 fatty acid supplementation on serum levels of tumour necrosis factor-alpha, C-reactive protein and interleukin-2 in type 2 diabetes mellitus patients. **Singapore Medical Journal**. v. 53, n. 9, p. 615-619, 2012.

MARFIL, P. H. M.; SANTOS, E. M.; TELIS, V. R. N. Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1642-1647, 2008.

MARTINS, C. A. A. **Indústria da pesca no Brasil: o uso do território por empresas de enlatamento de pescado**. 2006. 146p. Tese de Doutorado, Geografia, Universidade Federal de Santa Catarina.

MARX, M.; STUPARIC, M.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Effects of thermal processing on *trans-cis*-isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. **Food Chemistry**. v. 83, n. 4, p. 609-617, 2003.

MAYEAUX, M.; XU, Z.; KING, J. M.; PRINYAWIWATKUL, W. Effects of Cooking Conditions on the Lycopene Content in Tomatoes. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 8, p. 461-464, 2006.

MAYER-MIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; REGIER, M.;SCHUCHMANN, H. P. Thermal processing of carrots: Lycopene stability and isomerisation with regard to antioxidant potential. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 1103-1108, 2005.

MEDEIROS, R. J.; DOS SANTOS, L. M. G.; FREIRE, A. S.; SANTELLI, R. E.; BRAGA, A. M. C. B.; KRAUSS, T. M.; JACOB, S. C. Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 535-541, 2012.

MIGUEIS, S. D. C. **Perfis de ácidos gordos do músculo e cérebro de ratos Wistar alimentados com dietas contendo níveis crescentes de conserva de sardinha**. 2010. 58p. Dissertação de Mestrado, Segurança Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa.

MDIC (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR). **Sistema AliceWeb acesso à informação**, 2015. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>>.

MORITZ, B.; TRAMONTE, V. L. C. Biodisponibilidade do licopeno. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 265-273, 2006.

MOTILVA, M. J.; MACIÀ, A.; ROMERO, M. P.; LABRADOR, A.; DOMÍNGUEZ, A.; PEIRÓ, L. Optimisation and validation of analytical methods for the simultaneous extraction of antioxidants: Application to the analysis of tomato sauces. **Food Chemistry**, v. 163, n. 0, p. 234-243, 2014.

MURRAY, J.; BURT, J. R. **The composition of fish**. Torry Research Station, 1969.

NUNES, I.L.; MERCADANTE, A.Z.; Vantagens e Desvantagens das colunas C₁₈ e C₃₀ para separação de carotenoides por CLAE. **RBCF-Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.4, p.539-546, 2006.

NGUYEN, M.; FRANCIS, D.; SCHWARTZ, S. Thermal isomerisation susceptibility of carotenoids in different tomato varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 9, p. 910-917, 2001.

NGUYEN, M. L.; SCHWARTZ, S. J. Lycopene stability during food processing. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 218, n. 2, p. 101-5, 1998.

O'NEIL, C. A.; SCHWARTZ, S. J. Chromatographic analysis of *cis/trans* carotenoid isomers. **Journal of Chromatography**, v. 624, n. 1-2, p. 235-52, 1992.

OKEN, E.; KLEINMAN, K. P.; BERLAND, W. E.; SIMON, S. R.; RICH-EDWARDS, J. W.; GILLMAN, M. Decline in fish consumption among pregnant women after a national mercury advisory. **Obstetrics Gynecology**, v. 102, n. 2, p. 346-51, 2003.

ORDÓÑEZ, A. L.; BALANZA, M.; MARTÍN, F. R.; FLORES, C. A. Estabilidad del Carotenoide Licopeno en Tomates en Conserva. **Información tecnológica**, v. 20, p. 31-37, 2009.

PACHECO, S. **Melhoria e implantação de metodologias de análise de alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2014. 161p. Tese (Doutorado). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida**. 2009. 106p. Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; PORTE, A.; ROSA, J. S.; SANTIAGO, M. C. P. A. Obtenção de Padrões de *cis*-licopeno e β -criptoxantina para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência a Partir de Melão-de-São-Caetano e Caqui. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 81-86, 2012.

PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; PEIXOTO, F. M.; GOUVÊA, A. C. M. S.; SANTIAGO, M. C. P. A.; FELBERG, I.; BORGUINI, R. G. Preparation of high purity analytical standards using high performance liquid chromatography in analytical scale. **Analytical chemistry: an Indian Journal**, v. 12, n. 5, p. 194-197, 2013.

PACHECO, S.; PEIXOTO, F. M.; BORGUINI, R. G.; DO NASCIMENTO, L. DA SILVA. M.; BODEDA, C. R. R.; SANTIAGO, M. C. P. DE ARAÚJO; GODOY, R. L. DE OLIVEIRA. Microscale extraction method for HPLC carotenoid analysis in vegetable matrices. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 416-419, 2014.

PACHECO-AGUILAR, R.; LUGO-SÁNCHEZ, M. E.; ROBLES-BURGUENÑO, M. R. Postmort em Biochemical and Functional Characteristic of Monterey Sardine Muscle Stored at 0 °C. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 1, p. 40-47, 2000.

PEREIRA, A.; TENUTA-FILHO, A. Avaliação de condições de consumo da sardinha *Sardinella brasiliensis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 720-725, 2005.

PÉREZ-CONESA, D.; GARCÍA-ALONSO, J.; GARCÍA-VALVERDE, V.; INIESTA, M. D.; JACOB, K.; SÁNCHEZ-SILES, L. M.; ROS, G.; PERIAGO, M. J. Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and thermal processing of tomato puree. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 179-188, 2009.

PERIAGO, M. J.; RINCON, F.; JACOB, K.; GARCIA-ALONSO, J.; ROS, G. Detection of key factors in the extraction and quantification of lycopene from tomato and tomato products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8825-9, 2007.

PINELA, J.; BARROS, L.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I.L C. F. R. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum L.*) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3, p. 829-834, 2012.

PORRINI, M.; RISO, P. What are typical lycopene intakes? **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 8, p. 2042-2045, 2005.

RAATZ, S.; SILVERSTEIN, J.; JAHNS, L.; PICKLO, M. Issues of Fish Consumption for Cardiovascular Disease Risk Reduction. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1081-1097, 2013.

RAO, A. V.; AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. **Nutrition Research**, v. 19, n. 2, p. 305-323, 1999.

RAO, A. V.; SHEN, H. Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. **Nutrition Research**, v. 22, n. 10, p. 1125-1131, 2002.

RAO, M. R.; CHOUDHURY, B. Studies on canning-qualities of tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 14, n. 4, p. 299-305, 1981.

RE, R.; BRAMLEY, P. M.; RICE-EVANS, C. Effects of food processing on flavonoids and lycopene status in a Mediterranean tomato variety. **Free Radical Research**, v. 36, n. 7, p. 803-10, 2002.

RHODEHAMEL, E. J.; REDDY, N. R.; PIERSON, M. D. Botulism: the causative agent and its control in foods. **Food Control**, v. 3, n. 3, p. 125-143, 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.A. **Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, 2001. 64p.

RODRIGUEZ, D. B.; LEE, T.C.; CHICHESTER, C. O. Comparative Study of the Carotenoid Composition of the Seeds of Ripening Momordica charantia and Tomatoes. **Plant Physiology**, v. 56, n. 5, p. 626-629, 1975.

ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C.; SACCARDO, S.; CERGOLE, M. Are fluctuations in Brazilian Sardine catches related to global-scale climatic changes. **Anais. da Academia Brasileira de Ciências**, v. 68, n. 1, p. 239-250, 1996.

SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. F.; BRAGAGNOLO, N.; EBERLIN, M.N. HPLC separation and determination of twelve cholesterol oxidation products in fish: comparative

study of UV, RI and APCI-MS detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4107-4113, 2006.

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

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 Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1301-1309, 2008.

SANDER, L. C.; SHARPLESS, K. E.; PURSCH, M. C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 189-202, 2000.

SEBRAE. **Diagnóstico da cadeia produtiva da pesca marítima no Estado do Rio de Janeiro** Rio de Janeiro : FAERJ-RJ, 2009

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SHALIN, E.; SAVAGE, G.P.; LISTER, G.P. Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 635-647, 2004.

SHARMA, S. K.; LE MAGUER, M. Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. **Food Research International**, v. 29, n. 3-4, p. 309-315, 1996.

SHI, J.; DAI, Y.; KAKUDA, Y.; MITTAL, G.; XUE, S. J. Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato purée. **Food Control**, v. 19, n. 5, p. 514-520, 2008.

SHI, J.; LE MAGUER, M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 1-42, 2000.

SHI, J.; LE MAGUER, M.; KAKUDA, Y.; LIPTAY, A.; NIEKAMP, F. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. **Food Research International**, v. 32, n. 5, p. 15-21, 2000.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5. ed. Fort Worth: Saunders College Publishing, 1997. 849p.

SOARES, L. M. V. BOLETIM TÉCNICO N^o. 19 Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1 p. 79-84, 2001.

- STAHL, W.; SIES, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 11, p. 2161-2166, 1992.
- STAHL, W.; SIES, H. Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 336, n. 1, p. 1-9, 1996.
- STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D. Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention: A Review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, n. 10, p. 1027-1039, 1996.
- STOFOROS, N. G. Thermal process design. **Food Control**, v. 6, n. 2, p. 81-94, 1995.
- TARLEY, C. R. T.; VISENTAINER, J. V.; MATSUSHITA, M.; DE SOUZA, N. E. Proximate composition, cholesterol and fatty acids profile of canned sardines (*Sardinella brasiliensis*) in soybean oil and tomato sauce. **Food Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 1-6, 2004.
- TAVARES, CASSIA A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid Composition of Brazilian Tomatoes and Tomato Products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 27, n. 3, p. 219-224, 1994.
- TEIXEIRA, A. A.; TUCKER, G. S. On-line retort control in thermal sterilization of canned foods. **Food Control**, v. 8, n. 1, p. 13-20, 1997.
- TENUTA FILHO, A.; MACEDO, L. F. L.; FAVARO, D. I. T. Concentração e retenção do selênio em peixes marinhos. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, p. 210-214, 2010.
- TINKLER, J. H.; BÖHM, F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. Dietary carotenoids protect human cells from damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 26, n. 3, p. 283-285, 1994.
- TOMA, R. B.; FRANK, G. C.; NAKAYAMA, K.; TAWFIK, E. Lycopene content in raw tomato varieties and tomato products. **Journal of Food Service**, v. 19, n. 2, p. 127-132, 2008.
- UAUY, R.; VALENZUELA, A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. **Nutrition**, v. 16, n. 7, p. 680-684, 2000.
- UNLU, N. Z.; BOHN, T.; CLINTON, S. K.; SCHWARTZ, S. J. Carotenoid Absorption from Salad and Salsa by Humans Is Enhanced by the Addition of Avocado or Avocado Oil. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 3, p. 431-436, 2005.
- UNLU, N. Z.; BOHN, T.; FRANCIS, D. M.; NAGARAJA, H. N.; CLINTON, S. K.; SCHWARTZ, S. J. Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 140-6, 2007.
- USDA. **USDA National Nutrient Database for standard reference**: Release 2012.

VALLVERDÚ-QUERALT, A.; MEDINA-REMÓN, A.; CASALS-RIBES, I.; ANDRES-LACUEVA, C.; WATERHOUSE, A. L.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Effect of tomato industrial processing on phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 154-160, 2012.

VAN HET HOF, K. H.; MEDINA-REMÓN, A.; CASALS-RIBES, I.; ANDRES-LACUEVA, C.; WATERHOUSE, A. L.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Potential of vegetable processing to increase the delivery of carotenoids to man. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 68, n. 6, p. 366-70, 1998.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. DE FRANÇA; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VISENTAINER, J. V.; CARVALHO, P. O.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 20, p. 90-93, 2000.

VICENTE, S. J.V; SAMPAIO, G.R; FERRARI, C. K. B; TORRES, E. A. F. S. Oxidation of cholesterol in foods and its importance for human health. **Food Reviews International**. v.28, p. 47-70, 2012.

WAINWRIGHT, P. E. Dietary essential fatty acids and brain function: A developmental perspective on mechanisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, n. 1, p. 61-69, 2002.

WEBER, D.; GRUNE, T. The contribution of beta-carotene to vitamin A supply of humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 2, p. 251-8, 2012.

WILLIAMS, G. M.; WILLIAMS, C. L.; WEISBURGER, J. H. Diet and cancer prevention: the fiber first diet. **Toxicological Sciences**, v. 52, n. 2, p. 72-86, 1999.

XIANQUAN, S.; SHI, J.; KAKUDA, Y.; YUEMING, J. Stability of lycopene during food processing and storage. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 4, p. 413-22, 2005.

XU, G.; GUAN, L.; SUN, J.; CHEN, Z. Y. Oxidation of Cholesterol and β -Sitosterol and Prevention by Natural Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9284-9292, 2009.

YI, J.; LAM, T I.; YOKOYAMA, W.; CHENG, L. W.; ZHONG, F. β -carotene encapsulated in food protein nanoparticles reduces peroxy radical oxidation in Caco-2 cells. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 31-40, 2015.

ZHENG, J. S.; HU, X. J.; ZHAO, Y. M.; YANG, J. D. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. **BMJ-British Medical Journal**, p. 1-10, 2013.

ZOU, Y.; SUN, Q.; LI, J.; YANG, C.; YANG, J.; ZHANG, L. Effects of *E/Z* isomers of lycopene on experimental prostatic hyperplasia in mice. **Fitoterapia**, v. 99, p. 211-217, 2014.

ANEXOS

ANEXO A

Instrução Normativa SDA Nº 45, de 13 de dezembro de 2011

O SECRETÁRIO SUBSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA, DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso das atribuições que lhe conferem os arts. 10 e 42 do Anexo I do Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010, tendo em vista o disposto no Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, na Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, e o que consta do Processo nº 21000.008330/2010-01, resolve:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de conservas de peixes.

§ 1º Este Regulamento Técnico fixa a identidade e as características de qualidade e requisitos que devem apresentar as conservas de peixes para sua comercialização nacional e internacional.

§ 2º O disposto neste Regulamento Técnico não se aplica a sardinhas, atuns e bonitos ou outros produtos contemplados em regulamentos específicos.

Art. 2º A conserva de peixe deve conter, no mínimo, 50% (cinquenta por cento) de carne em relação ao peso líquido declarado.

Parágrafo único. Poderá ser utilizada numa conserva, matéria-prima de espécies diferentes, desde que de mesmo gênero e com propriedades sensoriais semelhantes, devendo ser identificadas corretamente na rotulagem.

Art. 3º Para fins deste regulamento consideram-se as seguintes definições:

I - conserva: entende-se por conserva o produto elaborado com pescado íntegro, envasado em recipientes herméticos e esterilizados;

II - recipientes herméticos: aquele que tenha sido projetado para impedir a entrada de microrganismos durante e depois do tratamento térmico, com o objetivo de manter a esterilidade comercial;

III - esterilidade comercial: estado que se consegue aplicando calor suficiente, só ou em combinação com outros processos de conservação de alimentos, que assegure a destruição das formas viáveis de microrganismos patogênicos e de outros organismos capazes de alterar o produto e que possa multiplicar-se em condições normais de armazenamento e distribuição;

IV - pré-cozimento: processo de cocção a que se submete o peixe para extrair parte de seus líquidos, visando sua elaboração posterior. V - salmoura fraca: solução de água potável com o máximo de 3% (três por cento) de sal de qualidade alimentar.

Art. 4º As conservas de peixes, de acordo com a forma de apresentação da matéria-prima, se classificam em:

I - descabeçada e eviscerada: sem cabeça, sem vísceras, com ou sem rins, gônadas, e nadadeiras;

II - filé: músculo obtido a partir do corte do peixe em sentido paralelo à coluna vertebral, desprovido de ossos da espinha dorsal, com ou sem pele;

III - posta: partes obtidas a partir do corte do peixe eviscerado em sentido perpendicular à sua coluna vertebral, com ou sem pele;

IV - pedaço: corte do peixe que mantenha a estrutura original do músculo em que, no mínimo, 50% (cinquenta por cento) da carne fique retida em uma peneira com malha de 12 mm (doze milímetros);

V - ralado: partículas de carne de peixe não-aglutinadas.

Art. 5º São permitidas outras formas de apresentação, desde que previamente aprovadas pelo órgão competente.

Art. 6º A denominação do produto deve ser composto do nome comum da espécie do peixe, da sua forma de apresentação e do meio de cobertura, quando utilizado, de maneira que não induza o consumidor a erros ou enganos.

§ 1º O nome comum da espécie do peixe é autorizado pelo órgão governamental competente, com base em recomendações de organismos internacionais de referência, de acordo com leis e costumes brasileiros, de maneira a não confundir o consumidor.

§ 2º Para essa autorização, o referido órgão poderá, a seu critério, consultar órgãos governamentais correlatos, instituições de pesquisa e da sociedade civil.

§ 3º O descabeçamento e a evisceração são etapas comuns a todas as conservas de peixes, sendo dispensada a citação desta forma de apresentação no nome do produto.

§ 4º O meio de cobertura pode ser:

I - ao natural: o produto que tenha por líquido de cobertura uma salmoura fraca, adicionada ou não de substâncias aromáticas;

II - ao próprio suco: o produto elaborado à base de peixe com o seu próprio líquido de constituição;

III - ao próprio suco com óleo(s) comestível(eis): o produto elaborado à base de peixe com o seu próprio líquido de constituição, adicionado de óleo(s) comestível(eis);

IV - ao próprio suco com molho: o produto elaborado à base de peixe com o seu próprio líquido de constituição, adicionado de molho;

V - em azeite ou óleo(s) comestível(eis): o produto que tenha por líquido de cobertura azeite de oliva ou óleo(s) comestível(eis) adicionado ou não de substâncias aromáticas;

VI - em molho: o produto que tenha por líquido de cobertura molho com base em meio aquoso ou gorduroso;

VII - em vinho branco: o produto que tenha por líquido de cobertura principal o vinho branco, adicionado ou não de substâncias aromáticas.

§ 5º O produto que tenha por líquido de cobertura o(s) óleo(s) comestível(is) poderá conter, no máximo, 12% (doze por cento) de água em relação ao peso líquido declarado.

§ 6º Na composição dos diferentes molhos, o ingrediente principal que o caracteriza, deve fazer parte do nome do produto;

§ 7º Deve constar do nome do produto se a matéria-prima foi defumada ou em aposto explicativo se o produto foi aromatizado com sabor defumado.

§ 8º Outras conservas de peixe poderão ser elaboradas desde que atendido o disposto neste artigo e nos arts. 4º e 5º deste Regulamento Técnico, submetidas a outras preparações e embalagens diferentes das anteriores devidamente aprovadas pelo órgão competente.

Art. 7º A composição do produto compreende os seguintes ingredientes:

I - ingredientes obrigatórios: carne de peixe;

II - ingredientes opcionais:

a) sal;

b) água potável;

c) azeite de oliva;

d) outros óleos vegetais comestíveis;

e) condimentos, aromas e especiarias;

f) aditivos intencionais;

g) vinagre;

h) vinho;

i) hortaliças;

j) frutas;

k) legumes; e

l) outros previamente aprovados pelo órgão competente.

Art. 8º No processamento de conservas de peixes devem ser atendidos os seguintes requisitos:

I - características da matéria-prima: o peixe utilizado na elaboração de conservas deve atender ao que dispõe a Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997, podendo ser semi elaborada, fresca ou congelada;

II - características sensoriais: o produto deve apresentar aspecto, cor, odor, sabor e textura próprios da espécie de peixe e do tipo de conserva, e caso o produto contenha coluna vertebral ou espinha, devem ser de consistência friável;

III - características físico-químicas: as análises de histamina deverão ser realizadas em caráter eventual, as amostras colhidas de forma aleatória de acordo com o plano de amostragem estabelecido em legislação específica e os resultados destas análises deverão obedecer aos seguintes critérios:

a) o nível de histamina no produto não deve ser superior a 100 mg/kg (cem miligramas por quilograma), tomando como base a média das amostras analisadas; e b) nenhuma unidade da amostra poderá apresentar resultado de histamina superior a 200 mg/kg (duzentos miligramas por quilograma);

Parágrafo único. O disposto no inciso III se aplica às espécies histaminogênicas tais como as espécies das famílias Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryphaenidae, Scomberesocidae e Pomatomidae.

IV - acondicionamento: o produto deverá ser acondicionado em recipientes adequados às condições de processamento e armazenagem e que lhe assegure proteção, com as seguintes características:

a) permitir o fechamento hermético que garanta a integridade do produto, até o prazo de validade estabelecido;

b) ser de material inócuo;

c) na inspeção visual não devem ser evidenciados defeitos que comprometam a integridade e a validade do produto;

d) vácuo: nas conservas de peixes, se necessário o vácuo, deve ser detectável por ensaio qualitativo.

Art. 9º A utilização dos aditivos e coadjuvantes de tecnologia no processamento de conservas de peixes deve estar de acordo com a legislação específica estabelecida pelo órgão competente.

Art. 10. Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo órgão competente.

Art. 11. As práticas de higiene para o processamento do produto devem estar de acordo com o estabelecido na legislação específica.

Art. 12. Os peixes utilizados na elaboração de conservas devem ser submetidos aos métodos de inspeção prescritos no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA.

Art. 13. Quanto aos critérios macroscópicos o produto não deve conter materiais estranhos à sua composição.

Art. 14. Quanto aos critérios microbiológicos aplica-se a legislação específica.

Parágrafo único. O produto não deve conter nenhuma substância, incluindo-se as derivadas de microrganismos, em quantidades que possam se constituir em perigo para a saúde do consumidor.

Art. 15. Quanto a pesos e medidas aplica-se a legislação específica.

Art. 16. Quanto à rotulagem aplica-se a legislação específica.

Art. 17. Quanto aos métodos de análises microbiológicas, físico-químicas e de contaminantes orgânicos e inorgânicos, aplica-se a regulamentação específica.

Art. 18. A amostragem deve realizar-se de acordo com o Plano de Tomada de Amostra para Alimentos Pré-embalados (AQL-6.5), conforme o Anexo I.

Art. 19. No que se refere aos Planos de Tomada de Amostras para os Alimentos Pré-embalados, considera-se:

I - defeituosa: quando uma unidade de amostra apresentar qualquer destas características:

a) material estranho: qualquer material presente na unidade de amostra que não provenha do peixe ou do meio de cobertura, mesmo que não se constitua em perigo para a saúde humana, que possa ser detectado por observação direta (olho nu), sem auxílio de instrumentos óticos, ou se identifique por qualquer método, inclusive pelo uso de uma lente de aumento, onde se caracterize a não-conformidade com as boas práticas de fabricação e higiene;

b) odor e sabor: presença de odores ou sabores indesejáveis, persistentes e inconfundíveis, que indiquem sinais de decomposição ou rancificação;

c) textura: carne excessivamente mole ou excessivamente dura, não característica das espécies que compõem o produto;

d) cor: alterações de cor que indiquem facilmente sinais de decomposição ou rancificação;

e) embalagem: vazamento, estufamento.

II - aceita quando:

a) o número total de unidades defeituosas classificadas de acordo com o art. 19, inciso I, não for superior ao número de aceitação (c) do Plano de Tomada de Amostra especificado no art. 18, deste Regulamento Técnico;

b) o número total de unidades de amostra que não se ajustar ao especificado no art. 6º, não for superior ao número de aceitação (c) do Plano de Tomada de Amostra especificado no art. 18, deste Regulamento Técnico; e

c) cumprir com os requisitos especificados nos arts. 9º, 10 e 16, deste Regulamento Técnico.

Parágrafo único. O lote será rejeitado quando não cumprir os requisitos exigidos no art. 8º, inciso III, ou no art. 19, inciso II, deste Regulamento Técnico.

Art. 20. Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

ENIO ANTONIO MARQUES PEREIRA

ANEXO B

Instrução Normativa SDA Nº 22 DE 11/07/2011 (Federal)

Data D.O.: 12/07/2011

Estabelece o Regulamento Técnico que fixa a identidade e as características mínimas de qualidade que deve apresentar o produto conservas de sardinhas para a sua comercialização.

O Secretário de Defesa Agropecuária, Substituto, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no uso da atribuição que lhe conferem os arts. 10 e 42 do Anexo I do Decreto nº 7.127, de 04 de março de 2010, tendo em vista o disposto no Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, e suas alterações, na Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, e o que consta do Processo nº 21000.003000/2010-11,

Resolve:

Art. 1º. Estabelecer o Regulamento Técnico que fixa a identidade e as características mínimas de qualidade que deve apresentar o produto conservas de sardinhas para a sua comercialização, na forma da presente Instrução Normativa e seus Anexos I e II.

Art. 2º. As espécies de sardinhas abrangidas por este regulamento são determinadas pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - DIPOA/SDA/MAPA, com base em recomendações de organismos internacionais de referência, de acordo com leis e costumes brasileiros, de maneira a não confundir o consumidor.

Parágrafo único. Para essa determinação, o DIPOA/SDA/MAPA poderá, a seu critério, consultar órgãos governamentais correlatos, instituições públicas de pesquisa e da sociedade civil.

Art. 3º. O presente regulamento aplica-se às conservas de sardinhas destinadas ao comércio nacional e internacional.

Parágrafo único. No produto final, ou seja, conservas de sardinha, a carne deve constituir, no mínimo, 50% (cinquenta por cento) em relação ao peso líquido declarado.

Art. 4º. Para fins deste regulamento, consideram-se as seguintes definições:

I - conserva: entende-se por conservas de sardinhas os produtos elaborados a partir de matéria-prima de espécies abrangidas por este regulamento, fresca ou congelada, descabeçada, eviscerada, com exceção de gônadas e rins, acrescidos de meio de cobertura, acondicionados em um recipiente hermeticamente fechado e que tenham sido submetidos a um tratamento térmico que garanta sua esterilidade comercial;

II - recipiente hermeticamente fechado: aquele que tenha sido projetado para impedir a entrada de microrganismos durante e depois do tratamento térmico, com o objetivo de manter a esterilidade comercial;

III - esterilidade comercial: estado que se consegue aplicando calor suficiente, só ou em combinação com outros processos de conservação de alimentos que assegure a destruição das formas viáveis de microrganismos patogênicos e de outros organismos capazes de alterar o produto e que possam multiplicar-se em condições normais de armazenamento e distribuição;

IV - pré-cozimento: processo de cocção a que se submete o peixe para extrair parte de seus líquidos, visando sua elaboração posterior.

Art. 5º. As conservas de sardinhas, de acordo com a sua forma de apresentação, se classificam em:

I - descabeçada e eviscerada: com exceção de rins e gônadas;
II - filé: músculo obtido a partir do corte do peixe em sentido paralelo à coluna vertebral, desprovido de ossos da espinha dorsal, com ou sem pele;
III - pedaço: pedaços de sardinhas que tenham, no mínimo, 3 (três) cm de comprimento mantendo a estrutura original do músculo; e

IV - ralada: pequenos pedaços de músculo de tamanho uniforme que não estão aglutinados.

Parágrafo único. Outras formas de apresentação serão permitidas desde que previamente aprovadas pelo órgão competente com base em legislação específica.

Art. 6º. A designação de venda do produto quanto à espécie de pescado processada será atribuída pelo DIPOA/SDA/MAPA.

Parágrafo único. Para os produtos que já estejam registrados e autorizados pelo DIPOA/SDA/MAPA, a designação de venda do produto é considerada devidamente atribuída, nos termos deste regulamento.

Art. 7º. O nome do produto deve ser composto da espécie, da sua forma de apresentação e do meio de cobertura, quando utilizado.

§ 1º O descabeçamento e a evisceração são etapas comuns a todas as conservas de sardinha, sendo dispensada a citação desta forma de apresentação no nome do produto.

§ 2º O meio de cobertura, quando utilizado, fará parte da denominação do produto, listando-se os seguintes exemplos:

I - ao natural: o produto que tenha por meio de cobertura uma salmoura fraca de, no máximo 3% (três por cento) de sal;

II - ao próprio suco: o produto elaborado com o próprio líquido de constituição da matéria-prima utilizada;

III - ao próprio suco com óleo comestível: quando, além do líquido de constituição da matéria-prima, for adicionado no mínimo 6% (seis por cento) de óleo comestível;

IV - ao próprio suco com molho: o produto elaborado à base de sardinha com o seu próprio líquido de constituição, adicionado de molho;

V - em óleo comestível: o produto que tenha por meio de cobertura óleo comestível, com, no máximo, 12% (doze por cento) de água em relação ao peso líquido declarado;

VI - em molho: o produto que tenha por meio de cobertura molho com base em meio aquoso, gorduroso ou aquoso e gorduroso, sendo que, na composição dos diferentes molhos, o ingrediente principal que o caracteriza deve fazer parte do nome do produto;

VII - em escabeche: o produto que tenha por meio de cobertura vinagre, adicionado ou não de água, sal e outros ácidos alimentícios e substâncias aromáticas, com pH apropriado ao produto; e

VIII - em vinho branco: o produto que tenha por meio de cobertura principal o vinho branco, adicionado ou não de ingredientes e aditivos.

§ 3º Deve constar do nome do produto se a matéria-prima tiver sido defumada ou em aposto explicativo se a matéria-prima tiver sido aromatizada com sabor de defumado.

§ 4º Outras conservas de sardinhas poderão ser elaboradas desde que atendido o disposto nos arts. 6º e 7º deste regulamento, submetidas a outras preparações diferentes das anteriores, devidamente aprovadas pelo órgão competente com base em legislação específica.

Art. 8º. A composição do produto compreende os seguintes ingredientes: I - ingrediente obrigatório: sardinhas; e

II - ingredientes opcionais:

a) sal;

b) água potável;

c) azeite de oliva;

d) outros óleos vegetais comestíveis;

- e) condimentos, aromas e especiarias;
- f) aditivos intencionais;
- g) vinagre;
- h) vinho;
- i) hortaliças;
- j) frutas;
- k) legumes; ou
- l) outros previamente aprovados pelo órgão competente.

Parágrafo único. Não é permitida a utilização de proteínas hidrolisadas.

Art. 9º. No processamento de sardinhas em conserva, devem ser atendidos os seguintes requisitos:

I - características da matéria-prima: a sardinha utilizada na elaboração de conservas deve atender ao que dispõe a Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997, sendo limpa, lavada, sem cabeça, sem vísceras, com exceção de rins e gônadas;

II - características sensoriais do produto: aparência, cor, odor, sabor e textura devem apresentar características próprias;

III - aplicando-se a Tabela de Defeitos constante no Anexo II da presente Instrução Normativa, o número total de unidades defeituosas não pode ser superior ao número de amostras defeituosas toleráveis em um lote (c) do Plano de Tomada de Amostras para os Alimentos Pré-Embalados (AQL-6.5) (CAC/RM 42-1969), contido no Anexo I da presente Instrução Normativa;

IV - características físico-químicas: as análises de histamina deverão ser realizadas em caráter eventual, e as amostras colhidas de forma aleatória, de acordo com o plano de amostragem estabelecido em legislação específica, observando-se, ainda, que:

a) o nível de histamina no produto final não deve ser superior a 100 mg/kg, tomando como base a média das amostras analisadas; e b) nenhuma unidade da amostra pode apresentar resultado superior a 200 mg/kg;

V - acondicionamento: o produto deve ser acondicionado em recipientes adequados às condições de processamento e armazenagem e que lhe assegure proteção; estes recipientes devem reunir as seguintes características: a) permitir o fechamento hermético e inviolável que garanta a integridade do produto, até o prazo de validade estabelecido; b) ser de material inócuo; e c) na inspeção visual, não devem ser evidenciados defeitos que comprometam a integridade e a validade do produto final, conforme especificados na tabela de defeitos constante do Anexo II da presente Instrução Normativa.

Art. 10º. Os aditivos e coadjuvantes de tecnologia utilizados no processamento de conservas de sardinhas devem estar de acordo com a legislação nacional, bem como as regulamentações estabelecidas pelos órgãos competentes.

Art. 11º. Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelos órgãos competentes.

Art. 12º. As práticas de higiene para elaboração do produto devem estar de acordo com o estabelecido na legislação específica.

Art. 13º. As sardinhas utilizadas na elaboração de conservas devem ser submetidas aos métodos de inspeção prescritos no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal- RIISPOA.

Art. 14º. Quanto aos critérios macroscópicos, o produto não deve conter materiais estranhos à sua composição.

Art. 15º. Quanto aos critérios microbiológicos, aplica-se a legislação específica.

Parágrafo único. O produto final deve estar isento de microrganismos capazes de se desenvolverem nas condições normais de armazenagem, distribuição e comercialização e não

deve conter nenhuma outra substância, incluindo-se as derivadas de microrganismos, em quantidades que possam se constituir em perigo para a saúde do consumidor.

Art. 16º. Quanto a pesos e medidas, aplica-se a legislação específica.

Art. 17º. Quanto à rotulagem, aplica-se a legislação específica.

Art. 18º. Quanto aos métodos de análises microbiológicas, físico-químicas e de contaminantes orgânicos e inorgânicos, aplica-se a legislação específica.

Art. 19º. A amostragem deve realizar-se de acordo com a Norma do *Codex Alimentarius* CAC/RM 42-1969, conforme Anexo I da presente Instrução Normativa.

Art. 20º. No que se refere aos planos de tomada de amostras para os alimentos pré-embalados, considera-se:

I - defeituosa qualquer unidade que não esteja de acordo com os limites fixados pela Tabela de Defeitos para Conservas de Sardinhas constante do Anexo II da presente Instrução Normativa;

II - aceito o lote quando o número total de unidades defeituosas classificadas de acordo com os limites fixados pela Tabela de Defeitos para Conservas de Sardinhas constante do Anexo II da presente Instrução Normativa não é superior ao número de aceitação (c) do plano de amostragem especificado no art. 19 do presente regulamento;

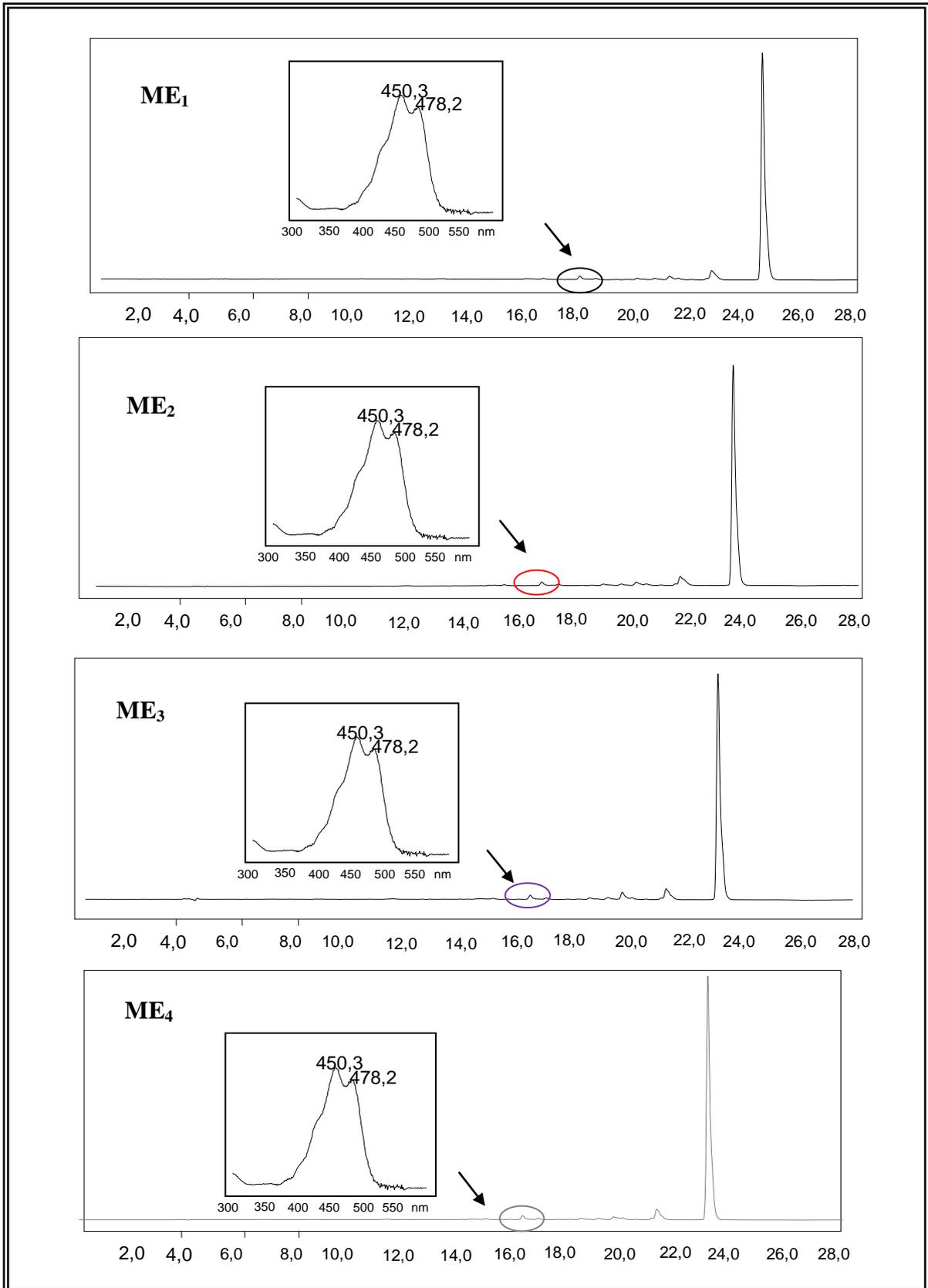
III - que o número total de unidades de amostra que não se ajusta ao especificado nos arts. 6º e 7º deste regulamento não é superior ao número de aceitação (c) do plano de amostragem especificado no art. 19;

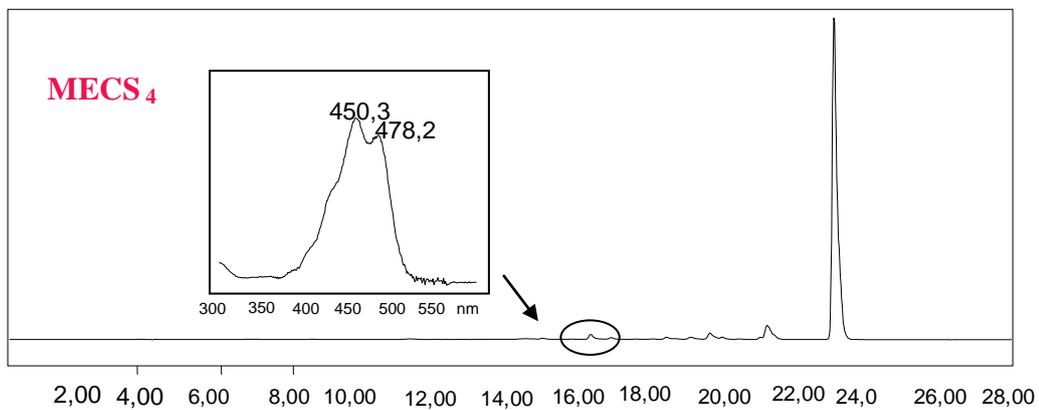
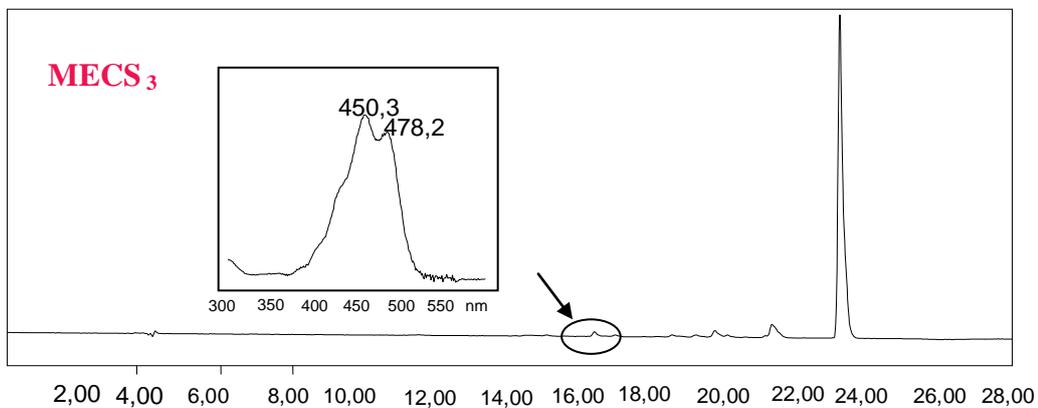
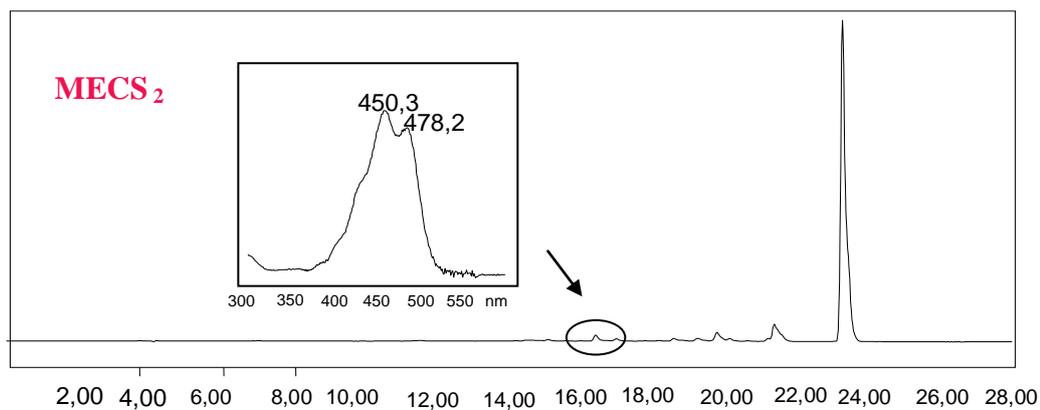
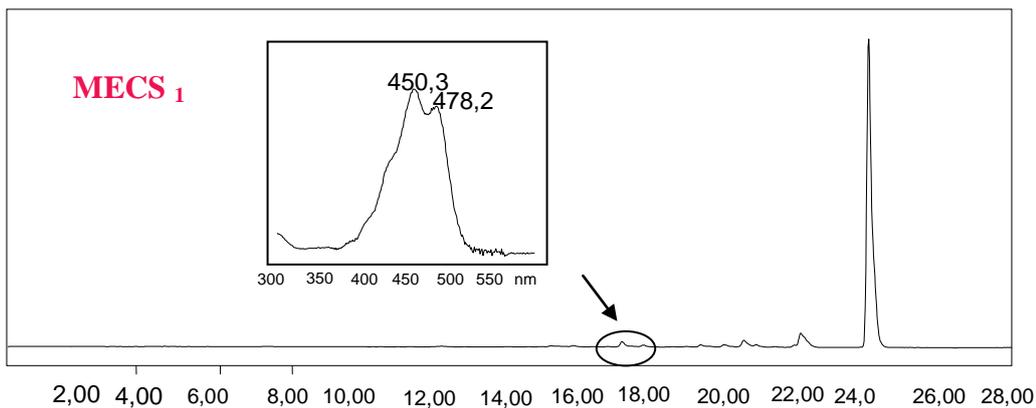
IV - o cumprimento dos requisitos especificados nos arts. 6º, 7º, 8º e 10; e

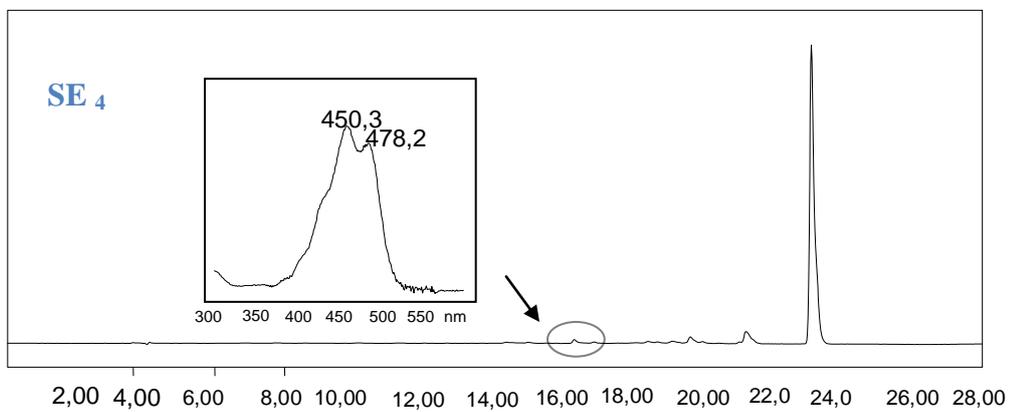
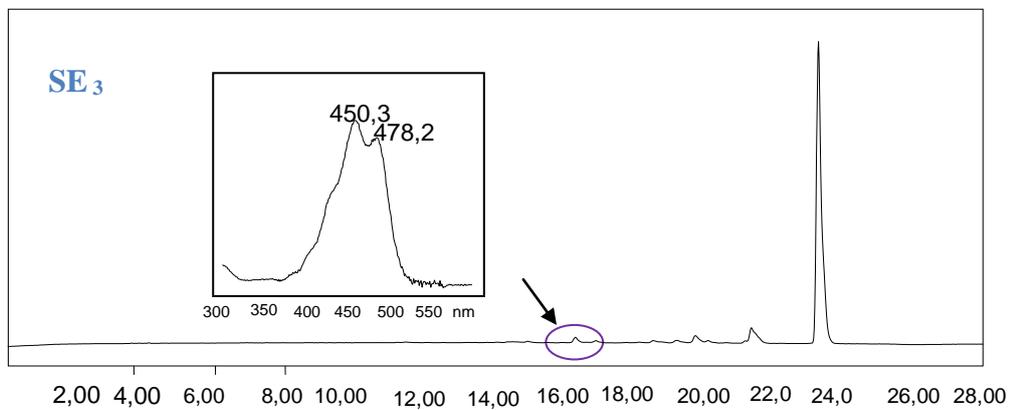
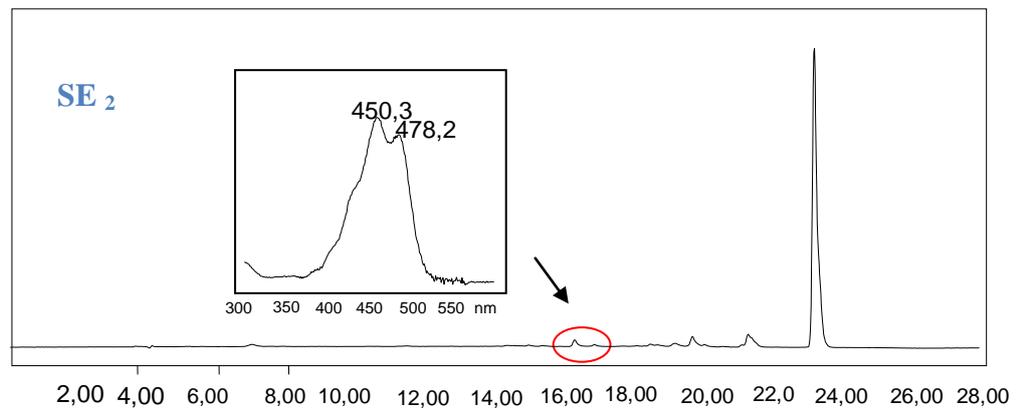
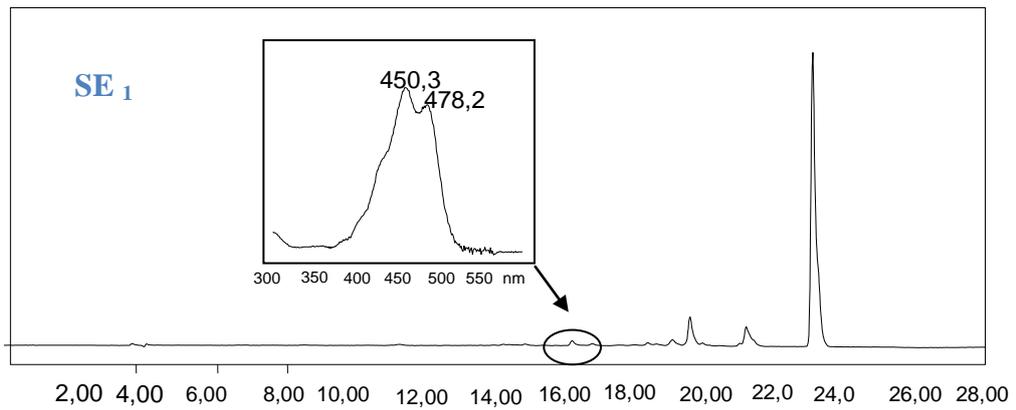
V - rejeitado o lote que não cumpra os requisitos indicados neste regulamento no art. 9º, inciso IV, no art. 19, e no inciso I deste artigo.

ENIO ANTONIO MARQUES PEREIRA

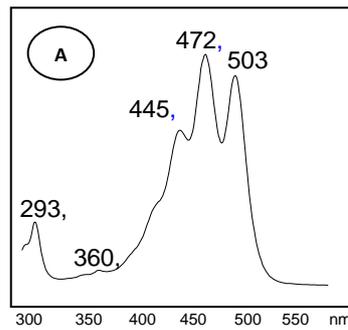
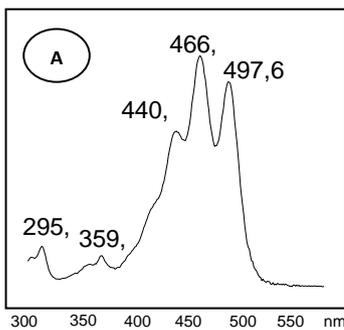
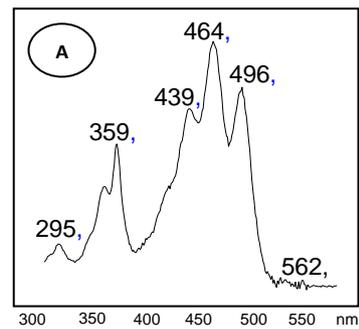
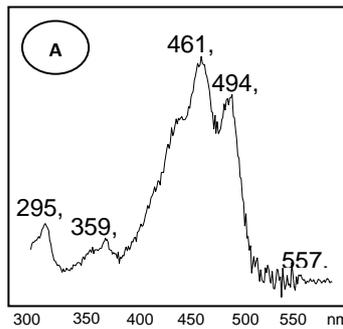
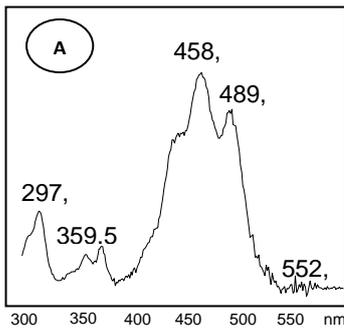
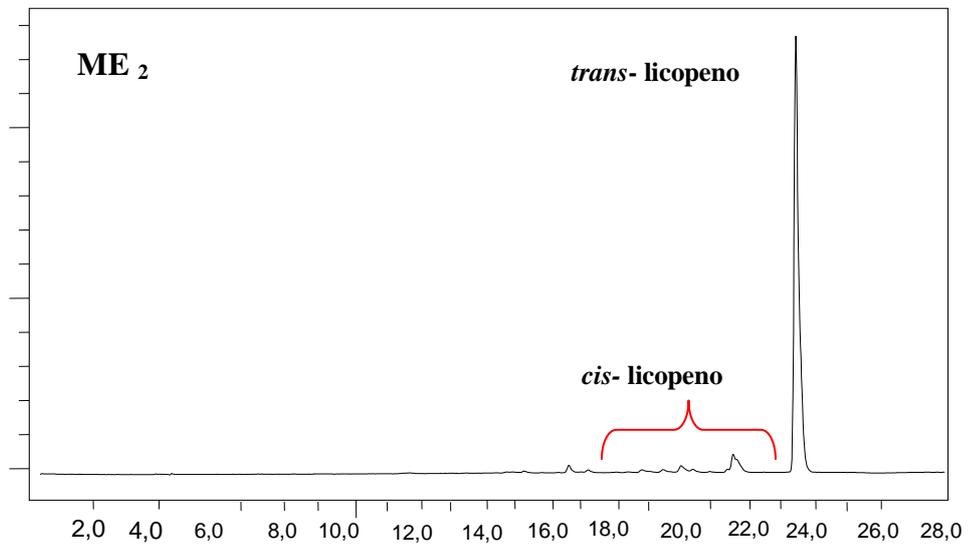
ANEXO C





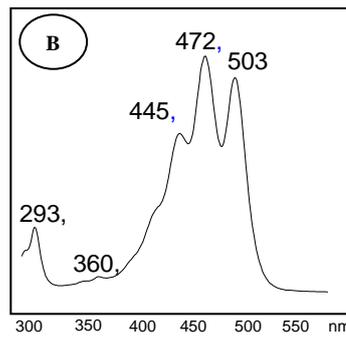
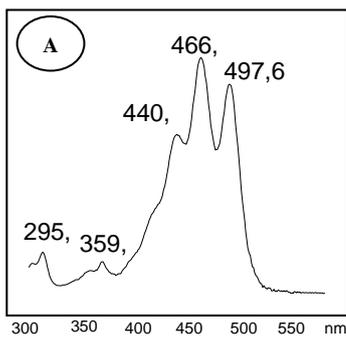
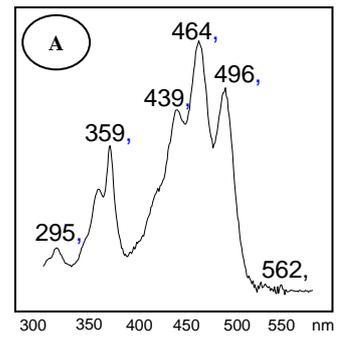
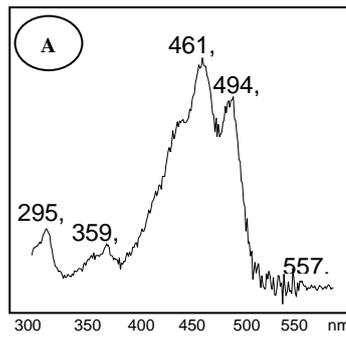
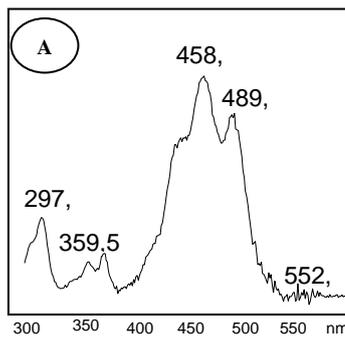
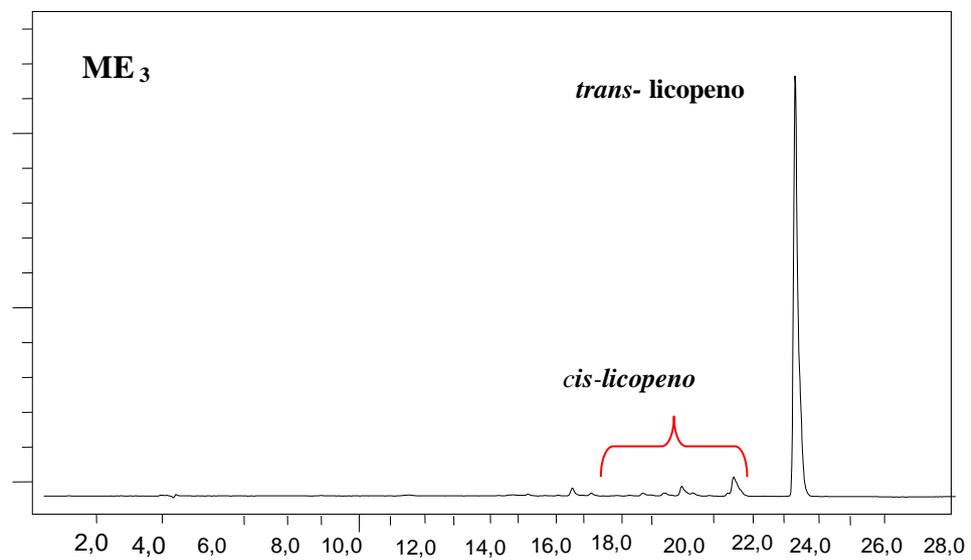


ANEXO D



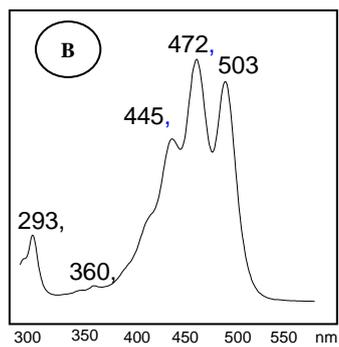
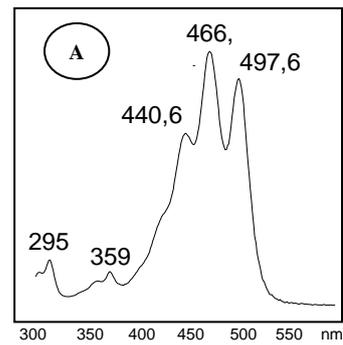
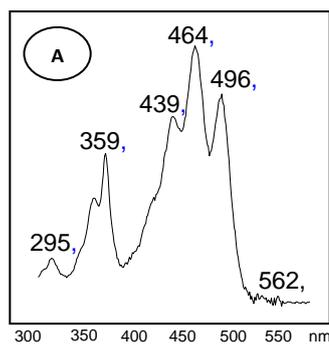
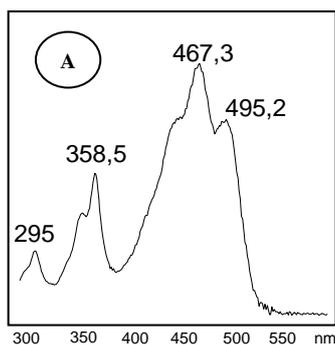
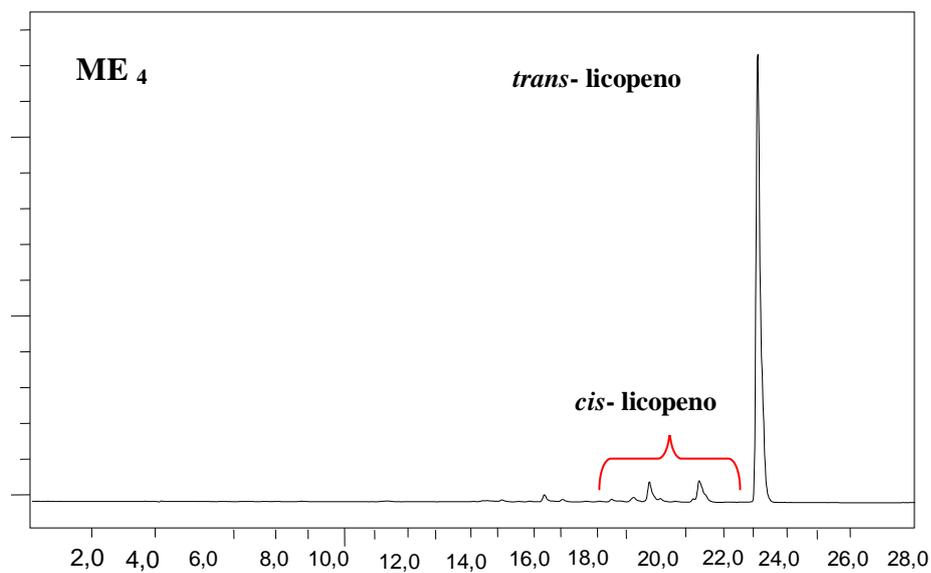
Legendas:

- (A) Espectros de absorção dos isômeros *cis*-licopeno
- (B) Espectro de absorção do *trans*-licopeno



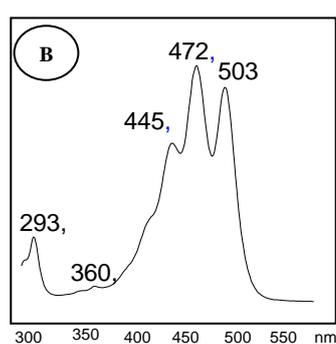
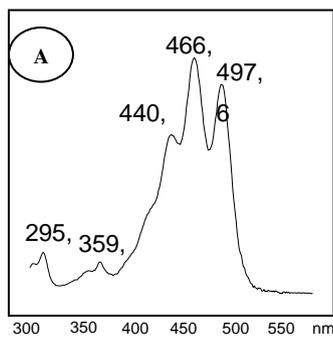
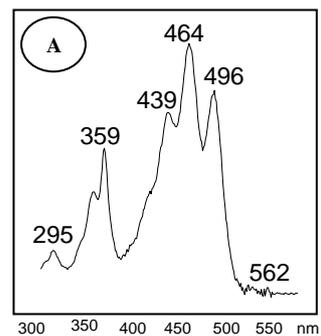
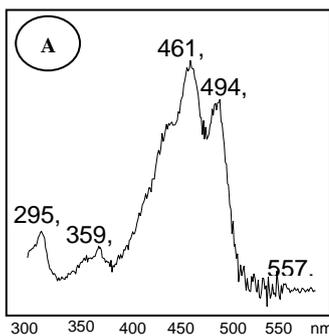
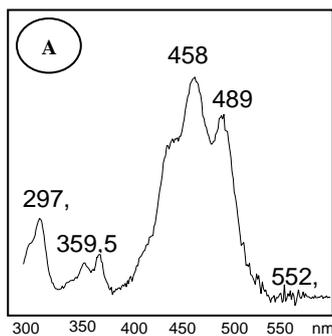
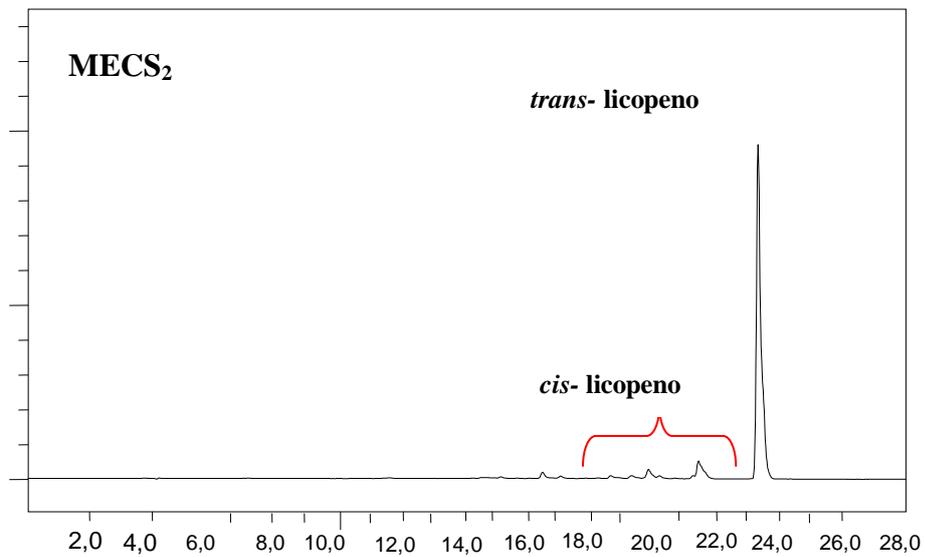
Legendas:

- A Espectros de absorção dos isômeros *cis*-licopeno
- B Espectro de absorção do *trans*-licopeno



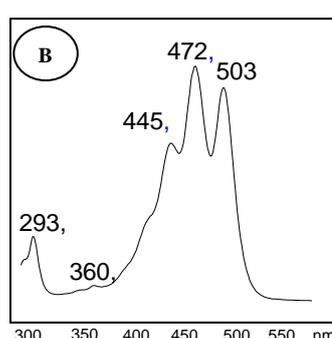
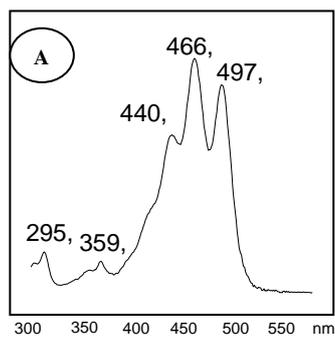
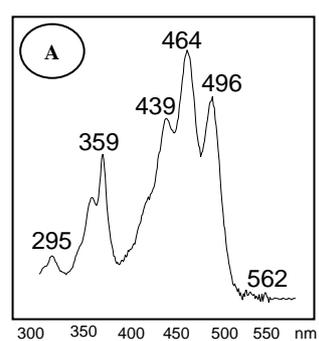
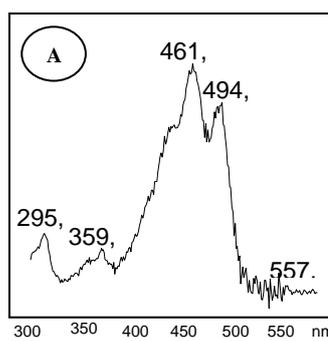
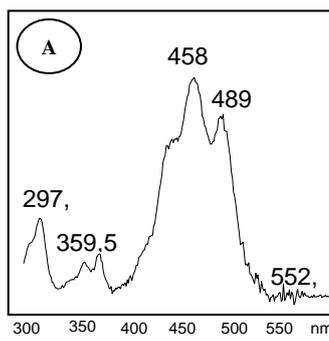
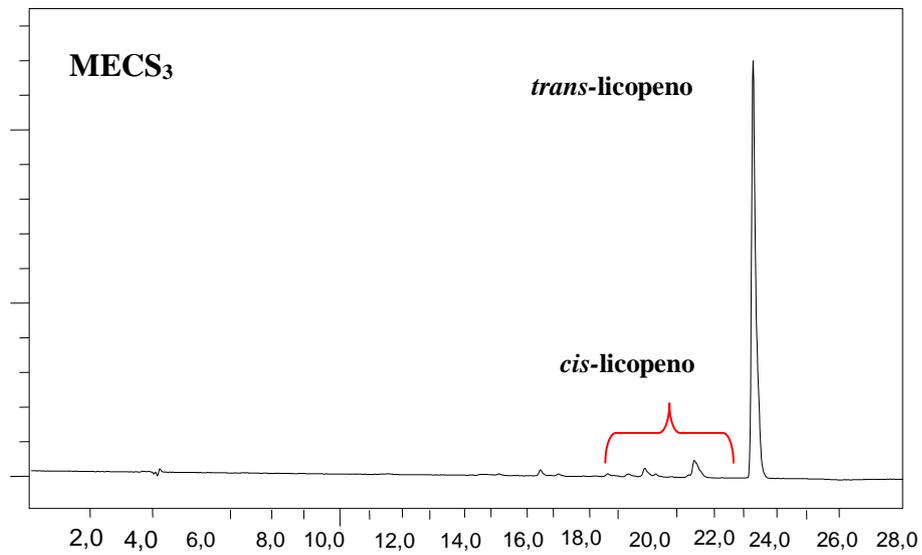
Legendas:

- (A) Espectros de absorção dos isômeros *cis*-licopeno
- (B) Espectro de absorção do *trans*-licopeno



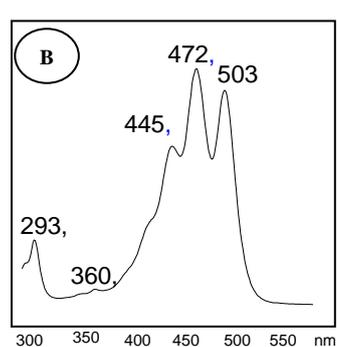
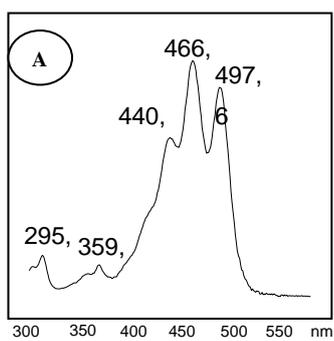
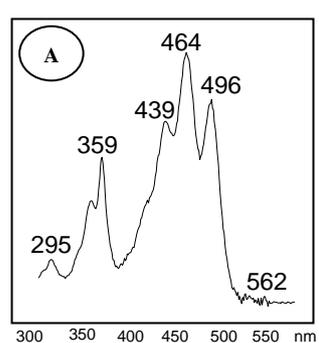
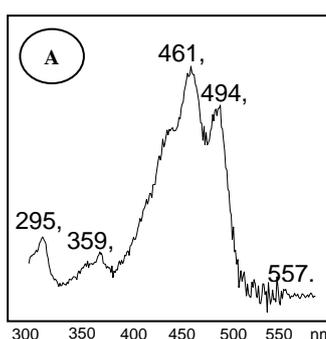
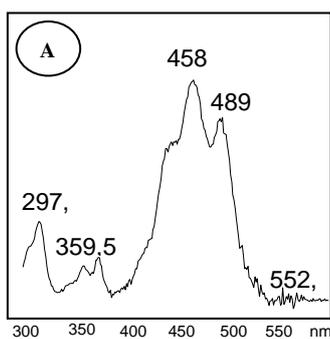
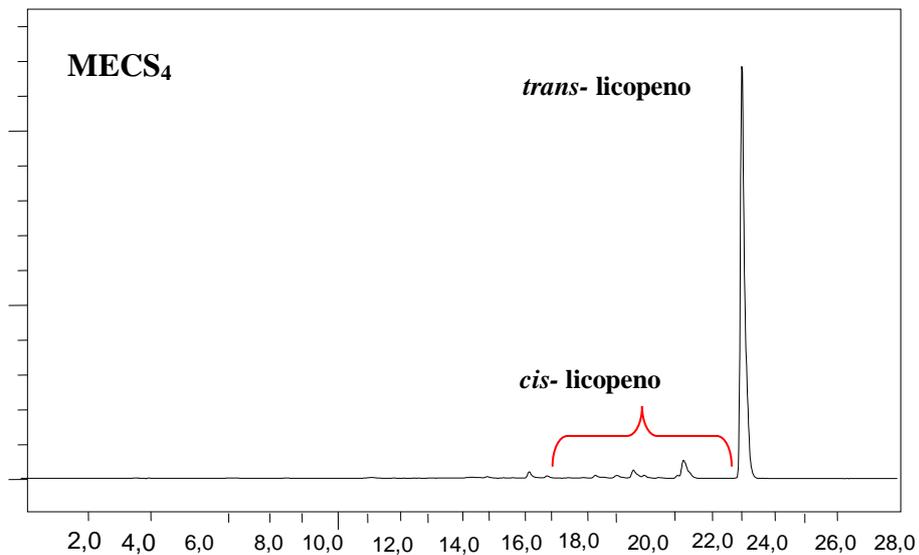
Legendas:

- (A) Espectros de absorção dos isômeros *cis*-licopeno
- (B) Espectro de absorção do *trans*-licopeno



Legendas

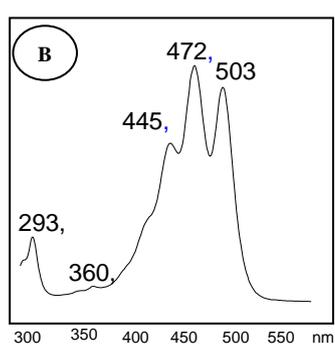
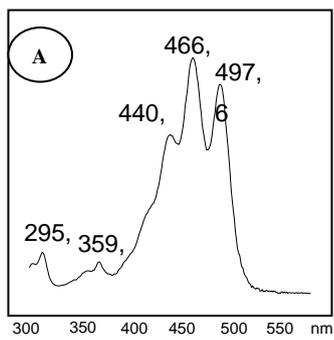
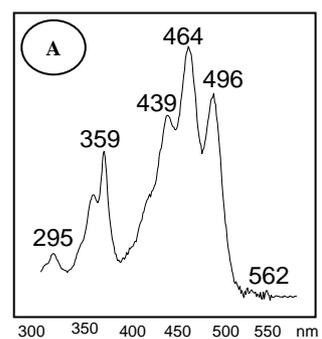
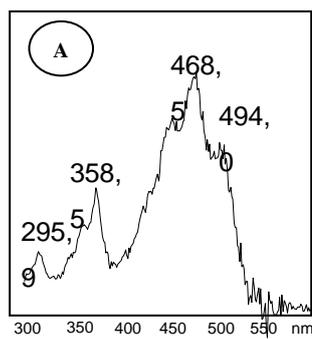
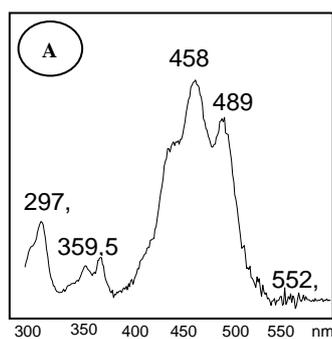
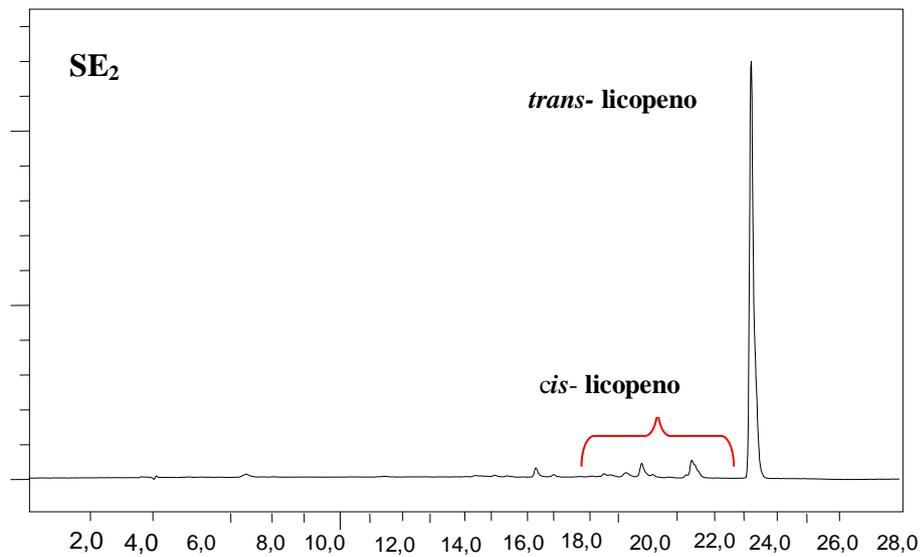
- (A) Espectros de absorção dos isômeros *cis*-licopeno
- (B) Espectro de absorção do *trans*-licopeno



Legendas

(A) Espectros de absorção dos isômeros *cis*-licopeno

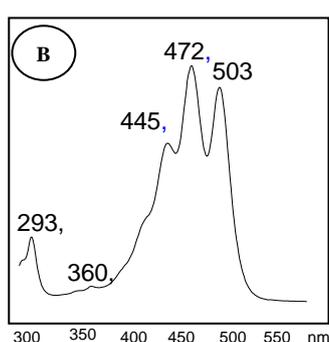
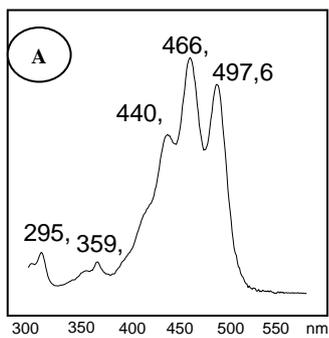
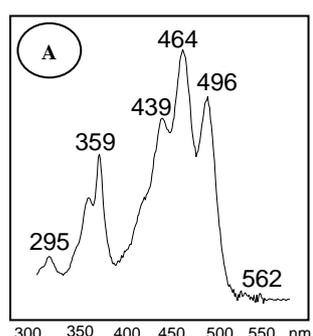
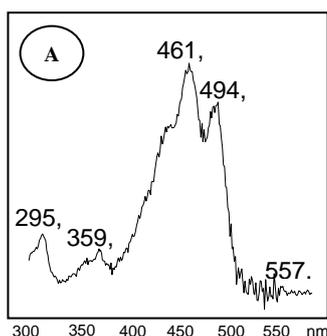
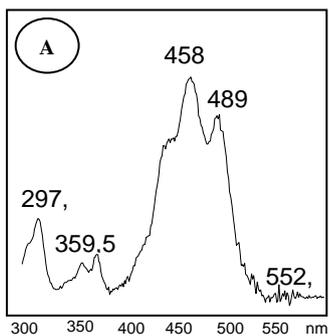
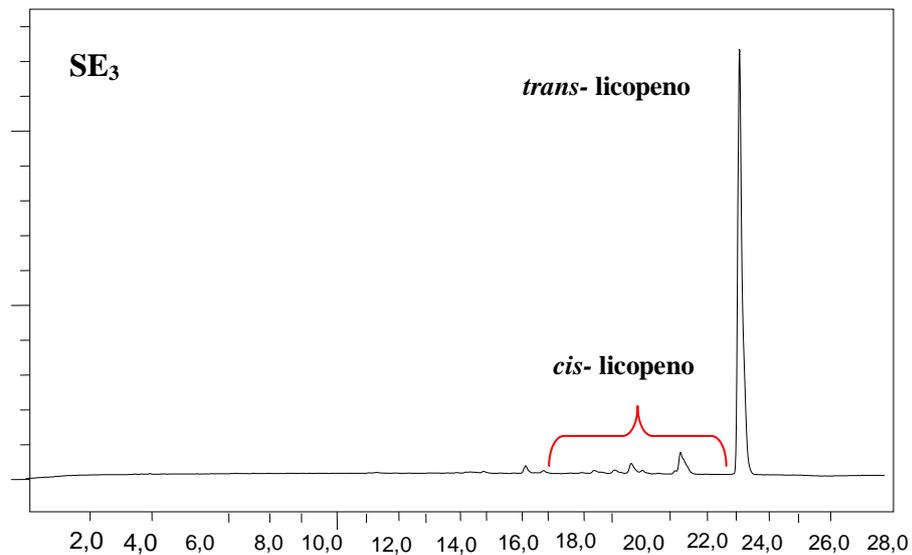
(B) Espectro de absorção do *trans*-licopeno



Legendas

(A) Espectros de absorção dos isômeros *cis*-licopeno

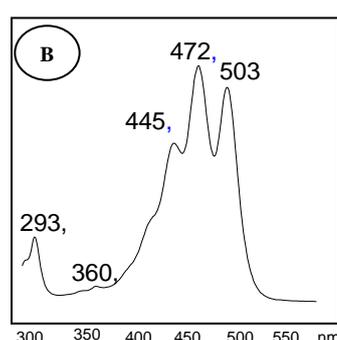
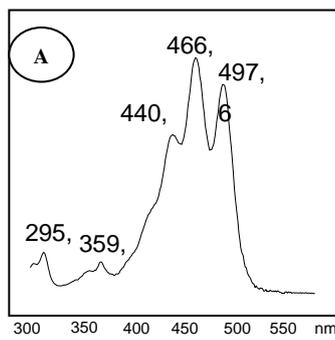
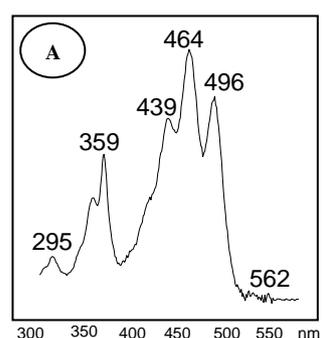
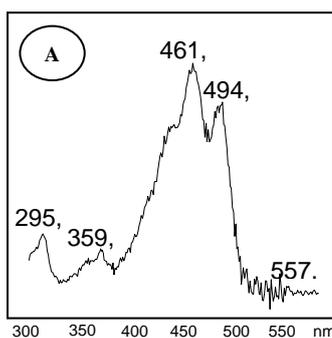
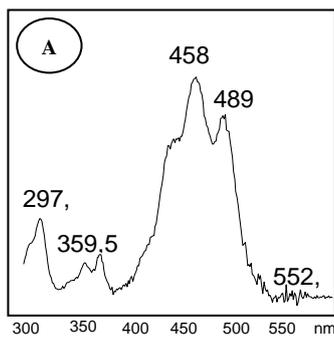
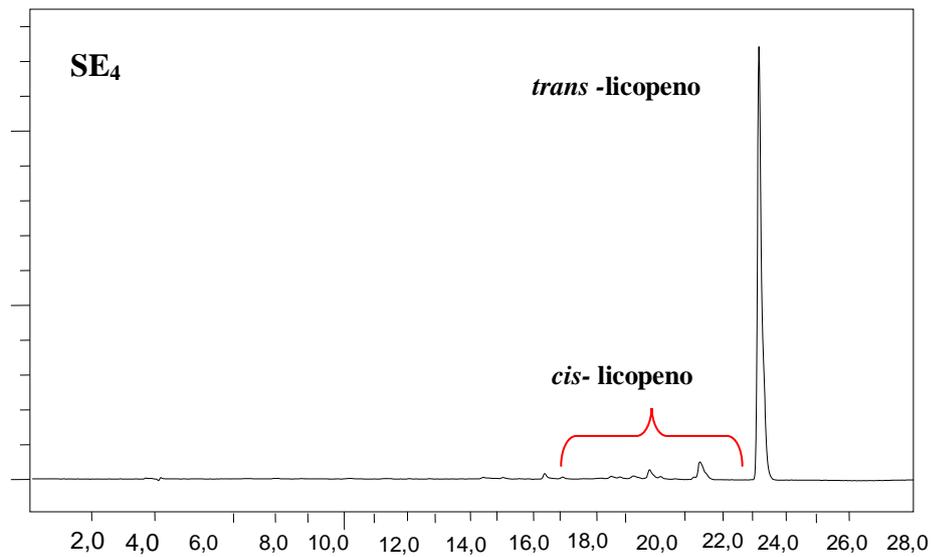
(B) Espectro de absorção do *trans*-licopeno



Legendas

A Espectros de absorção dos isômeros *cis*-licopeno

B Espectro de absorção do *trans*-licopeno



Legendas:

(A) Espectros de absorção dos isômeros *cis*-licopeno

(B) Espectro de absorção do *trans*-licopeno