



HUGO ANTONIO LIMA DE SOUZA

**"DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO
DE PRODUTOS DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA E SUA APLICAÇÃO EM CAMARÃO
(*Litopenaeus vannamei*)"**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HUGO ANTONIO LIMA DE SOUZA

"DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO
DE PRODUTOS DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA E SUA APLICAÇÃO EM CAMARÃO
(*Litopenaeus vannamei*)"

Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador(a): Profa. Dra. Neura Bragagnolo

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Hugo Antonio Lima de Souza e orientada pela Profa. Neura Bragagnolo

Assinatura do orientador

Campinas

2014

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Helena Joana Flipsen - CRB 8/5283

So89d Souza, Hugo Antonio Lima, 1984-
Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de produtos de oxidação lipídica e sua aplicação em camarão (*Litopenaeus vannamei*) / Hugo Antonio Lima de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Compostos voláteis. 2. Camarão. 3. Colesterol. 4. Óxidos. 5. Microondas. I. Bragagnolo, Neura, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of analytical methods for the determination of lipid oxidation products and application in shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Palavras-chave em inglês:

Volatile compounds

Shrimp

Cholesterol

Oxides

Microwaves

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Neura Bragagnolo [Orientador]

Daniel Barrera Arellano

Eduardo Vicente

Gislaine Chrystina Nogueira de Faria

Mônica Roberta Mazalli

Data de defesa: 22-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Neura Bragagnolo
Orientadora

Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Dr. Eduardo Vicente
Membro Titular
Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

Dra. Gislaine Chrystina Nogueira de Faria
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Profa. Dra. Mônica Roberta Mazalli
Membro Titular
Universidade de São Paulo (FZEA/USP)

Dra. Lilian Regina Barros Mariutti
Membro Suplente
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Dra. Michele Nehemy Bertéli
Membro Suplente
Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

Dra. Sueli Regina Baggio
Membro Suplente
Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

*À minha família Ádria, Carlos,
Selma, Thaís e João com muito
carinho dedico mais essa conquista.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, em sua imensa bondade, por me conceder saúde e força para chegar até aqui.

À minha noiva Ádria por estar ao meu lado e me apoiar em todos os momentos difíceis.

Aos meus pais por serem uma fonte de incentivo e amor, da qual eu sempre pude recorrer.

Aos meus irmãos que sempre me deram força e estímulo para continuar

À Profa. Dra. Neura Bragagnolo por ter aceitado o desafio de me orientar e por toda a paciência que teve comigo todos esses anos.

A todos os professores da UEPA, UFPA e UNICAMP, pelos conhecimentos transmitidos, sem os quais eu não seria capaz de concluir este trabalho.

Às técnicas de laboratório Lilian Mariutti, Regiane Palhares e Rosemar Sant'Anna por serem profissionais exemplares, mas também amigas que sempre estavam dispostas a ajudar.

Aos membros da banca, titulares e suplentes pelas correções e sugestões que contribuíram muito para a melhora da tese.

À Fapesp pelo apoio financeiro e ao CNPq pela bolsa de doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Química de Alimentos: Adones, Aline, Ana, Blanca, Bruno, Camila, Daniele, Débora, Elisângela, Eliseu, Fabiane, Fernanda, Gilsandro, Kleidson, Marcella, Mery, Monique, Naira, Poliana, Renan, Renata, Rodolfo e

Sarah pelas trocas de conhecimentos, pelas ostentações e tantos momentos de descontração.

Aos meus amigos da escalada, principalmente do GEEU, por todas as viagens, momentos divertidos e pelo k'mon.

Aos amigos da UBF pelo apoio e orações nos momentos mais difíceis.

Aos amigos da querida vila Modesto: Fernando, Marden, Peter, Ruth e nossos amiguinhos caninos Petra e Manny (*in memoriam*), pelas conversas agradáveis e motivadoras.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho pudesse ser concretizado.

"Quem é sábio procura aprender, mas os tolos
estão satisfeitos com a sua própria ignorância"

Provérbios 15:14

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	xvii
SUMMARY	xix
INTRODUÇÃO GERAL	1

CAPÍTULO I

Revisão de literatura

1 Camarão cinza	7
2 Salga e secagem.....	8
3 Oxidação lipídica	9
3.1 Formação de produtos voláteis de oxidação lipídica	13
3.2 Oxidação do colesterol	15
4 Métodos para análise de produtos da oxidação lipídica.....	16
4.1 Micro-extração em fase sólida de compostos voláteis.....	16
4.2 Extração assistida por micro-ondas	18
5 Referências Bibliográficas	20

CAPÍTULO II

**New method for the extraction of volatile lipid oxidation products from
shrimp by headspace–solid-phase microextraction–gas
chromatography–mass spectrometry and evaluation of the effect of salting
and drying**

Abstract	31
1 Introduction.....	32
2 Material and methods.....	33

2.1 Reagents and materials	33
2.2 Samples	34
2.3 Optimization of the analysis of the volatiles by HS-SPME-GC-MS	35
2.4 GC-MS	36
2.5 Validation	37
2.6 Fatty acid composition of the shrimp lipids	38
2.7 Statistical analysis.....	39
3 Results and discussion.....	39
3.1 Optimization of HS-SPME method.....	39
3.2 Validation	46
3.3 Effect of processing on the shrimp fatty acids.....	47
3.4 Effect of processing on shrimp VLOPs	50
References	52
Supporting information	57

CAPÍTULO III

Saponificação direta assistida por micro-ondas para determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol

Resumo	67
1 Introdução	68
2 Materiais e métodos	70
2.2 Materiais	70
2.2 Amostras.....	71
2.3 Otimização da saponificação direta assistida por micro-ondas.....	71

2.4 Extração, derivatização e análise do colesterol e COPs por GC-MS	72
2.5 Validação	74
2.6 Efeito do processamento na formação de COPs	75
2.7 Análise estatística	76
3 Resultados e discussão.....	76
3.1 Otimização da saponificação direta assistida por micro-ondas	76
3.2 Validação	80
3.3 Efeito do processamento na formação de óxidos de colesterol.....	82
4 Conclusão	85
Referências	85
Material suplementar	91
CONCLUSÃO GERAL	95

RESUMO GERAL

O camarão é um dos principais produtos da pesca e da aquicultura mundial. A salga e a secagem constituem um dos métodos de preservação mais comuns e baratos utilizados para pescados, contudo, esse método de preservação pode levar à oxidação dos lipídios do camarão, principalmente pela presença de ácidos graxos poli-insaturados. Durante a oxidação lipídica podem ser formados vários produtos, entre eles destacam-se os produtos voláteis de oxidação lipídica que são os principais responsáveis pelo “*off-flavor*” dos alimentos oxidados. Além dos ácidos graxos poli-insaturados, o camarão, ainda apresenta altos teores de colesterol, que também são suscetíveis à oxidação e os produtos dessa oxidação são associados a várias doenças degenerativas. Assim, os objetivos deste trabalho foram: desenvolver um método para a determinação de produtos voláteis da oxidação lipídica (PVOLs) por micro-extração em fase sólida do headspace (HS-SPME); desenvolver um método de saponificação direta assistida por micro-ondas para a determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol e avaliar o efeito da salga e da secagem na formação dos PVOLs, na oxidação dos ácidos graxos, e na formação de óxidos de colesterol. Um novo método para a determinação de PVOLs por HS-SPME foi desenvolvido utilizando a fibra com recobrimento de divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB.CAR.PDMS). A melhor condição de análise obtida através de uma otimização sequencial foi a homogeneização de amostra em água destilada na proporção 1:3 em turrax e extração a 40 °C por 30 minutos. O método otimizado e validado permitiu a extração rápida e simples dos PVOLs, com baixos limites de detecção ($\leq 0,15 \text{ ng.g}^{-1}$) e quantificação ($\leq 0,50 \text{ ng.g}^{-1}$), com alta precisão ($\leq 12,67\%$) e eficiência de extração ($\geq 96,11\%$). Para a determinação simultânea de colesterol e óxidos de

colesterol com saponificação assistida por micro-ondas foi realizado um planejamento experimental seguido de uma cinética de saponificação. A melhor condição de saponificação foi utilizando 0,5 g de amostra com 20 mL de solução etanólica de KOH (1 mol/L) com as seguintes condições no micro-ondas: temperatura mantida a 45 °C, por 16 min, com potência máxima fixada em 200 W e velocidade de agitação magnética de 120 rpm. O método otimizado e validado permitiu uma redução significativa do tempo saponificação (75 vezes), com baixos limites de detecção ($\leq 0,57 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e quantificação ($\leq 1,73 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), com boa precisão ($\leq 10,50\%$ intradia e $\leq 8,56\%$ interdia) e eficiência de extração ($\geq 87,67\%$). Com os resultados obtidos pode-se concluir que os métodos desenvolvidos foram rápidos, simples, precisos e com boa eficiência de extração. Além disso, os processos de salga e secagem afetaram negativamente a qualidade dos lipídios do camarão, reduzindo o teor de ácidos graxos, além de aumentar os produtos voláteis de oxidação lipídica, principalmente o hexanal. Durante a salga também se observou um aumento significativo nos óxidos de colesterol, os quais sofreram redução após a etapa de secagem.

SUMMARY

Shrimp is one of the main products of world fishing and aquaculture. Salting and drying are two common and inexpensive preservation methods used for fish products; however, these preservation methods can favor lipid oxidation in shrimp, especially of the polyunsaturated fatty acids. Several products can be formed during lipid oxidation, and among them the volatile products of lipid oxidation should be highlighted because they are the main responsible for the off flavor in oxidized food. In addition to the polyunsaturated fatty acids, shrimp also has a high content of cholesterol, which is also prone to oxidation and the cholesterol oxidation products have been associated to several degenerative diseases. Thus, the aims of this work were: develop a method to determinate the volatile lipid oxidation products (VLOPs) by headspace solid phase microextraction (HS-SPME); develop a direct microwave assisted saponification to determine cholesterol oxides and cholesterol simultaneously and evaluate the effects of salting and drying on the formation of VLOPs, on the oxidation of fatty acids, and on the formation of cholesterol oxides. A new method to determine the VLOPs by HS-SPME was developed using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB.CAR.PDMS) fiber, which was the most adequate among the four evaluated fibers. The best analysis condition achieved by a sequential optimization was sample homogenization with water (1:3) in a turrax and extraction at 40 °C for 30 min. The optimized method was validated and allowed the simple and fast extraction of the VLOPs with low detection ($\leq 0.15 \text{ ng.g}^{-1}$) and quantification ($\leq 0.50 \text{ ng.g}^{-1}$) limits, high precision ($\leq 12.67\%$) and extraction efficiency ($\geq 96.11\%$). An experimental design followed by saponification kinetics was carried out for the simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides by microwave

assisted saponification. The best extraction condition was achieved by using 0.5 g of sample with 20 mL of a 1 mol/L ethanolic KOH solution and the following microwave conditions: temperature held at 45 °C for 16 min at maximum potency fixed at 200 W and magnetic stirring at 120 rpm. The optimized method was validated and allowed a significant reduction of the saponification time (75 times), with low detection ($\leq 0.57 \mu\text{g/mL}$) and quantification ($\leq 1.73 \mu\text{g/mL}$) limits, good precision ($\leq 10.50\%$ intermediate precision and $\leq 8.56\%$ intraday) and extraction efficiency ($\geq 87.67\%$). In conclusion, the developed methods were fast, simple, precise and showed good extraction efficiency. Salting and drying process negatively affected the quality of the shrimp lipids, decreasing the content of fatty acids and increasing the content of volatile products of lipid oxidation, mainly hexanal. After salting process a significant increase of cholesterol oxides was also observed, which were reduced after drying step.

INTRODUÇÃO GERAL

O camarão salgado e seco é um produto muito consumido no Brasil, principalmente na região nordeste (Kraemer et al., 2001). O camarão apresenta baixo teor de lipídios (0,90 a 1,30 %) e esses lipídios são predominantemente insaturados (Bragagnolo & Rodriguez-Amaya, 2001, Luzia et al, 2003; Sriket et al. 2007), porém durante o processo de salga e secagem vários compostos podem ser formados pela oxidação desses lipídios (Sampaio et al, 2006).

Os produtos voláteis de oxidação lipídica são os que apresentam maior impacto na qualidade sensorial em alimentos que sofrem oxidação. Esses compostos são formados pela β -cisão homolítica dos hidroperóxidos de ácidos graxos e podem ser álcoois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos de cadeia curta (Bartosz & Kolakowzka, 2011). A análise desses compostos voláteis apresenta boa correlação com o índice de peróxidos e de TBARs (Iglesias & Medina, 2008, Mariutti et al., 2009) e com as análises sensoriais (Wu & Sheldon, 1988). A micro-extração em fase sólida (SPME) é uma das técnicas mais utilizadas para a análise de compostos voláteis em alimentos, por apresentar tempo curto de análise, ausência de solventes e alta sensibilidade e seletividade (Wardenick et al., 2004; Wardenick et al., 2007). Vários fatores afetam a extração dos compostos voláteis, como o recobrimento da fibra utilizada, a temperatura e o tempo de extração, por isso, as variáveis de análise devem ser cuidadosamente avaliadas para o estabelecimento de um método por SPME (Marsili, 1999; Jordán et al. 2005; Mallia et al., 2005; Iglesias & Medina, 2008; Mariutti et al., 2009).

Durante a oxidação do camarão também podem ser formados óxidos de colesterol (Sampaio et al., 2006; Soto-Rodríguez et al., 2008). Vários estudos

indicam que esses compostos são potencialmente perigosos para saúde, pois apresentam atividade citotóxica, aterogênica, mutagênica e carcinogênica (Guardiola et al. 1996; Otaegui-Arrazola et al., 2010; Vicente et al., 2012). O colesterol e seus óxidos são encontrados em alimentos tanto na forma livre, como na forma de ésteres, assim, para a análise destes compostos é necessária uma etapa de saponificação, para a saponificação dos óxidos de colesterol são utilizadas condições brandas de temperatura e várias horas de reação (Bragagnolo, 2009). Novas técnicas como o uso das micro-ondas têm sido utilizadas visando análises mais rápidas que as convencionais e com economia de solvente (Eskilsson & Björklund, 2000). No entanto, ainda não há na literatura nenhum método utilizando as micro-ondas para a análise de óxidos de colesterol.

De acordo com o exposto os objetivos deste trabalho foram: (1) desenvolver e validar um método de HS-SPME-GC-MS para analisar os produtos voláteis oriundos de oxidação lipídica em camarão cinza (*Litopenaeus vannamei*) salgado e seco; (2) avaliar o efeito das etapas de salga e secagem na estabilidade dos lipídios do camarão cinza; (3) desenvolver um método de saponificação direta assistida por micro-ondas (*direct microwave assisted saponification* - DMAS) para a determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol em camarão cinza salgado e seco e análise dos mesmos por GC-MS; (4) avaliar o efeito das etapas de salga e secagem na formação de óxidos de colesterol no camarão cinza.

Referências Bibliográficas

- Bartosz, G., Kolakowska, A. (2011) Lipid oxidation in food systems, in: Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. (Eds.), *Chemical, biological, and functional aspects of food lipids*: CRC Press, Boca Raton, pp.163-184. Bragagnolo, N. (2009). Cholesterol and cholesterol oxides in meat and meat products, in: Nollet, L.,

- Toldra, F. Handbook of muscle foods analysis, CRC Press: Boca Raton, pp. 187-219.
- Bragagnolo, N., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). Total Lipid, Cholesterol, and Fatty Acids of Farmed Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and Wild Marine Shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(4), 359–369.
- Eskilsson, C. S., Björklund, E., (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Guardiola, F., Codony, R., Addis, P. B., Rafecas, M., Boatella, J. (1996). Biological effects of oxysterols: current status. *Food and chemical toxicology*, 34(2), 193–211.
- Iglesias, J., Medina, I. (2008). Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *Journal of chromatography. A*, 1192(1), 9–16.
- Jordán, M. J., Goodner, K. L., Castillo, M., Laencina, J. (2005). Comparison of two headspace solid phase microextraction fibres for the detection of volatile chemical concentration changes due to industrial processing of orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 1065–1071.
- Kraemer, F. B., Stussi, J. S. P., Santos, N. N., Sgarbi, D. B. D. G., Clemente, S. C. D. S. (2001). Chemical-physical control in dried-salted shrimp comercialized in Rio de Janeiro State. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 8(2), 78–80.
- Luzia, L. A., Sampaio, G. R., Castelluci, C. M. N., Torres, E. A. F. S. (2003). The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chemistry*, 83(1), 93–97.
- Mallia, S., Fernández-García, E., Olivier Bosset, J. (2005). Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 741–758.
- Mariutti, L. R. B., Nogueira, G. C., Bragagnolo, N. (2009). Solid phase microextraction-gas chromatography for the evaluation of secondary lipid oxidation products in chicken patties during long-term storage. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 20(10), 1849–1855.
- Marsili, R. T. (1999). Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *Journal of chromatographic science*, 37(1), 17–23.

- Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2010). Oxysterols: A world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3289–303.
- Sampaio, G. R., Bastos, D. H. M., Soares, A. M., Queiroz, Y. S., Torres, E. A. F. S. (2006). Fatty acids and cholesterol oxidation in salted and dried shrimp. *Food Chemistry*, 95(2), 344–351.
- Soto-Rodriguez, I., Campillo-Velazquez, P., Ortega-Martinez, J., Rodriguez-Estrada, M., Lercker, G., Garcia, H. (2008). Cholesterol oxidation in traditional Mexican dried and deep-fried food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(6), 489–495.
- Sriket, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kijroongrojana, K. (2007). Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. *Food Chemistry*, 103(4), 1199–1207.
- Vicente, S. J. V., Sampaio, G. R., Ferrari, C. K. B., Torres, E. A. F. S. (2012). Oxidation of Cholesterol in Foods and Its Importance for Human Health. *Food Reviews International*, 28(1), 47–70.
- Wardencki, W., Curyło, J., Namieśnik, J. (2007). Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(2), 275–88.
- Wardencki, W., Michulec, M., Curyło, J. (2004). A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(7), 703–717.
- Wu, T. C., Sheldon, B. W. (1988). Flavor Components and Factors Associated with the Development of Off-Flavors in Cooked Turkey Rolls. *Journal of Food Science*, 53(1), 49–54.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1 Camarão cinza

O camarão é um dos produtos de maior importância econômica para a pesca e a aquicultura no Brasil (Brasil, 2007), ocupando atualmente a 12ª posição na produção de camarões no mundo (FAO, 2014). Neste contexto, o camarão cinza (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) merece destaque por ser a espécie de camarão mais produzida no mundo (2,26 milhões de toneladas/ano). No Brasil, sua produção anual é de 65.000 toneladas, o que correspondeu no ano de 2008 a US\$ 191,41 milhões (FAO, 2014).

O camarão cinza, também conhecido como camarão branco do pacífico ou camarão vannamei, pode ser naturalmente encontrado no oceano pacífico oriental de Sonora, no México, ao sul do Peru, podendo alcançar 32 cm de comprimento total (Holthuis, 1980). Contudo, 99,94% de sua produção é oriunda de aquicultura (FAO, 2014), o que pode ser justificado por suas características de crescimento e conversão alimentar favoráveis associadas à sua resistência a doenças (Cuzon et al., 2004).

Apesar de apresentar baixo teor de lipídios (Tabela 1), a fração lipídica do camarão cinza é rica em colesterol e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA, Tabela 2) como os ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e docosaenoico (DHA, 22:6n-3) tornando-a altamente suscetível a oxidação (Luzia et al., 2003; Sampaio et al., 2006).

Tabela 1 – Composição do camarão cinza

Umidade ^a	77,21	g/100g
Proteínas ^a	18,80	g/100g
Cinzas ^a	1,47	g/100g
Lipídios ^a	1,30	g/100g
Colesterol ^b	121,14	mg/100g

Fonte: ^a Sriket et al., 2007; ^b Abreu et al. (2010)

Figura 2 – Principais ácidos graxos do camarão cinza

Ácidos graxos	%
16:0	34,20
16:1	4,55
17:0	2,09
18:0	14,70
18:1	24,50
18:1 trans	2,41
20:5	4,83
22:2	3,24
22:6	8,55
23:0	0,90

Fonte: Luzia et al., 2003

2 Salga e secagem

O camarão se deteriora facilmente, principalmente pela ação de micro-organismos e enzimas, e por isso, necessita ser submetido a um método de preservação para aumentar sua vida de prateleira (Makarios-Laham & Lee, 1993; Chandrasekaran, 1994; Niamnuy et al., 2007; Tsironi et al., 2009). Entre os métodos de preservação do camarão, a salga seguida de secagem se destaca por permitir o armazenamento do camarão à temperatura ambiente (Kraemer et al., 2001).

A secagem, ou desidratação, é uma das operações unitárias mais antigas e importantes na indústria alimentícia, conferindo aos alimentos maior vida útil (Barbosa-Canovas & Ibarz, 2002; Sun, 2005). Durante a secagem ocorre a redução da atividade de água, preservando o alimento através da redução do crescimento microbiano e da velocidade das reações químicas e enzimáticas (Akoh & Min, 2002; Rahman, 2007).

O uso da desidratação osmótica, como pré-tratamento da secagem apresenta várias vantagens para a indústria de alimentos, como a melhoria da

qualidade em termos de sabor e textura, aumentando a eficiência energética do processo, a maior estabilidade do produto e a retenção de nutrientes durante o armazenamento (Sun, 2005; Rahman, 2007). Por estes motivos, a maioria dos pescados secos tradicionais apresenta algum grau de salga (Doe, 1998).

A adição de cloreto de sódio (NaCl) é muito eficiente para a preservação, pois o sal se ioniza em cátions de sódio e ânions de cloro, que atraem camadas de água, formando uma porção de água ionicamente associada, que não está disponível para os microrganismos, além de gerar uma tensão osmótica que irá desidratar os microrganismos levando-os a morte ou esporulação e consequente inatividade (Hall, 1997). Além disso, a cocção com NaCl, evita o escurecimento enzimático do camarão (melanose) pela inativação das enzimas envolvidas no processo (Niamnuy et al., 2007).

No entanto, o sal também pode atuar como pró-oxidante ao reduzir a atividade de enzimas antioxidantes ou por aumentar a retenção do teor de ferro não-heme nos tecidos (Ahn et al., 1993; Lee et al., 1997; Kristensen & Purslow, 2001). Além disso, o aumento da temperatura durante a secagem pode acelerar a oxidação lipídica pelo aumento da velocidade de reação (Tan et al., 2001). Dessa forma a salga e a secagem, podem acelerar a oxidação lipídica e formar produtos com sabor desagradável ou “*off-flavors*”, além de ocasionar a perda de ácidos graxos essenciais (Akoh & Min, 2002; Sun, 2005).

3 Oxidação lipídica

A “oxidação lipídica” é um termo utilizado para descrever uma complexa reação em cadeia que ocorre entre os lipídios e o oxigênio e pode ocorrer por três caminhos diferentes: oxidação enzimática; oxidação não-enzimática não-radicalar

(fotooxidação) e oxidação não-enzimática mediada por radicais livres (autooxidação) (Laguerre et al., 2007).

O oxigênio molecular (tripleto, $^3\text{O}_2$) não reage muito bem com substratos não radicalares. Por outro lado, este oxigênio na presença de radiação ultravioleta e fotosensibilizadores, como a clorofila e a riboflavina, pode se converter em uma forma mais reativa conhecida como oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que apresenta caráter eletrofílico e pode se ligar às ligações duplas dos lipídios insaturados formando hidroperóxidos. No entanto, esta reação denominada de oxidação não enzimática não radicalar ou foto-oxidação contribui muito pouco para a oxidação lipídica nos alimentos em relação à autooxidação (Chien et al., 2003; Laguerre et al., 2007; Kim & Min 2008).

Embora, a cinética e a termodinâmica das reações envolvidas na autooxidação lipídica não tenha sido completamente elucidada, é amplamente aceito que esse processo ocorre em três fases: iniciação, propagação e terminação (Figura 1) (Kamal-Eldin et al., 2003; McClements & Decker, 2008).

Na etapa de iniciação, um átomo de hidrogênio é removido da molécula de um lipídio insaturado (LH) formando uma espécie radicalar L^\bullet . Como a energia de ativação necessária para a formação da espécie radicalar de lipídio é alta, a reação necessita de um iniciador que pode ser a presença de calor, da radiação UV, de metais de transição (como o cobre, ferro e manganês) e de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species, ROS).

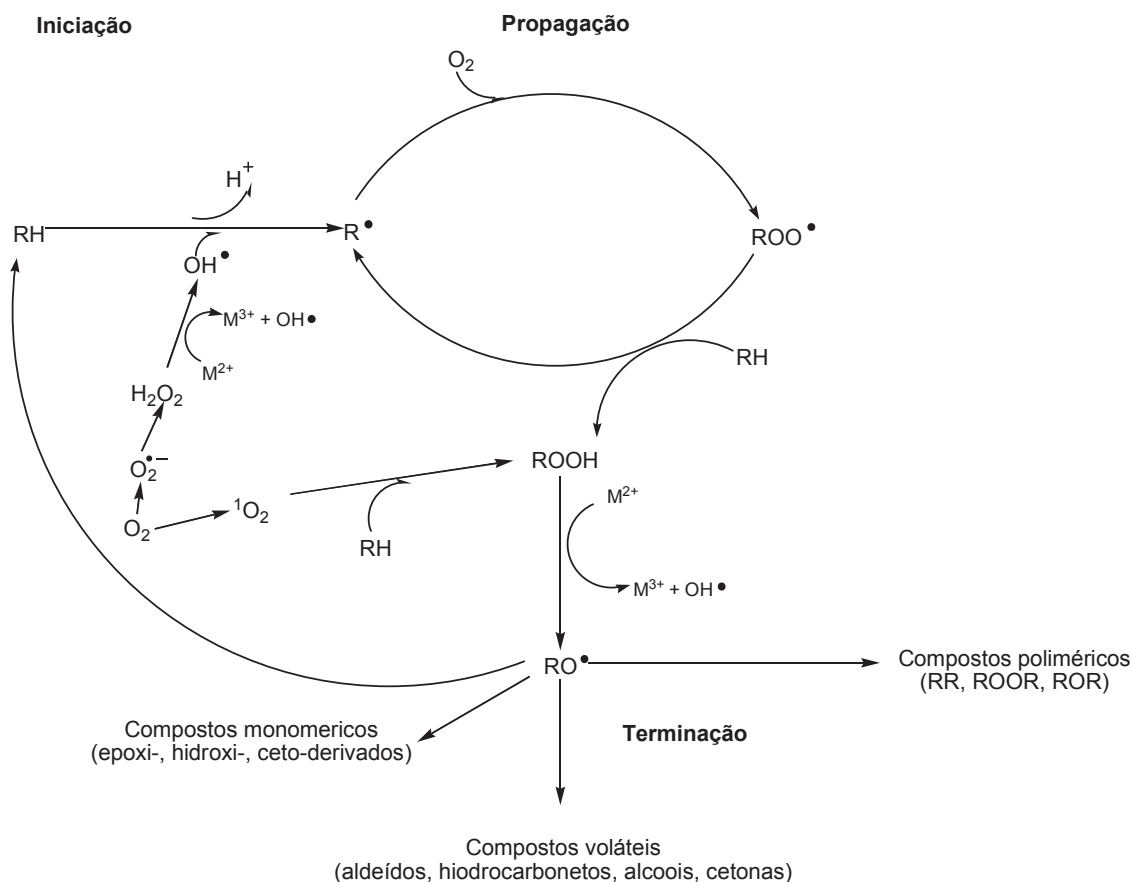


Figura 1 – Etapas da oxidação lipídica. Adaptado de Sancho (2010)

As ROS podem ser espécies radiculares (moléculas com elétron desemparelhado) como os radicais peróxila (ROO^{\bullet}), hidroxila (OH^{\bullet}), alcóxila (RO^{\bullet}) e hidroperoxila (HOO^{\bullet}) e também espécies não radiculares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e o ozônio (O_3) (Kamael-Eldin & Pokorný, 2008; Bartosz & Kolakowska, 2011).

A formação da espécie radicalar L^{\bullet} ocorre no carbono que necessita da menor quantidade de energia para perder o hidrogênio, assim, quanto maior o número de ligações duplas mais facilmente o lipídio será oxidado. A energia

necessária para a retirada de um hidrogênio de um carbono bisalílico (localizado entre duas duplas ligações) é de 50 kcal/mol, enquanto de um monoalílico (adjacente a uma ligação dupla) é de 75 kcal/mol e ~100 kcal/mol para um carbono saturado (sem ligação dupla) (Kamael-Eldin et al., 2003; Kim & Min, 2008).

Na forma de radical alquila (L^{\bullet}), o lipídio reage rapidamente com o oxigênio triplete formando um radical peroxila. O radical peroxila apresenta alto potencial redutor e facilmente abstrai um hidrogênio de outro lipídio insaturado para se converter em hidroperóxido (produto primário da oxidação), convertendo o lipídio insaturado em um novo radical alquila (L^{\bullet}) propagando a reação de oxidação (Kim & Min, 2008).

Apesar de serem mais estáveis que os radicais formados, os hidroperóxidos, em presença de metais ou calor, podem se decompor em radicais alcóxila e peroxila que também podem realimentar a cadeia oxidativa (Kamael-Eldin et al., 2003). O aumento na velocidade de reação de oxidação na fase de propagação é atribuído principalmente à decomposição dos hidroperóxidos (Bartosz & Kolakowska, 2011).

A reação de oxidação lipídica continua até a formação dos produtos secundários não-radicalares que podem ser compostos de degradação monomérica (como epóxidos, cetonas ou monômeros cíclicos), compostos de alto peso molecular (formados pela polimerização dos radicais de decomposição dos hidroperóxidos que podem ser alifáticos ou cíclicos) e os compostos voláteis de baixo peso molecular (como aldeídos, hidrocarbonetos, cetonas e álcoois) (Laguerre et al., 2007; Kamael-Eldin et al., 2003).

3.1 Formação de produtos voláteis de oxidação lipídica

A principal via de decomposição dos hidroperóxidos é através da quebra da ligação oxigênio-oxigênio (44 kcal/mol) formando um radical hidroxila e um radical alcóxila (Figura 2). O radical alcóxila pode então, sofrer uma β -cisão homolítica da ligação carbono-carbono dando origem a vários compostos, principalmente os de baixo peso molecular, como aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia curta (Kamael-Eldin et al., 2003; Bartosz & Kolakowzka, 2011).

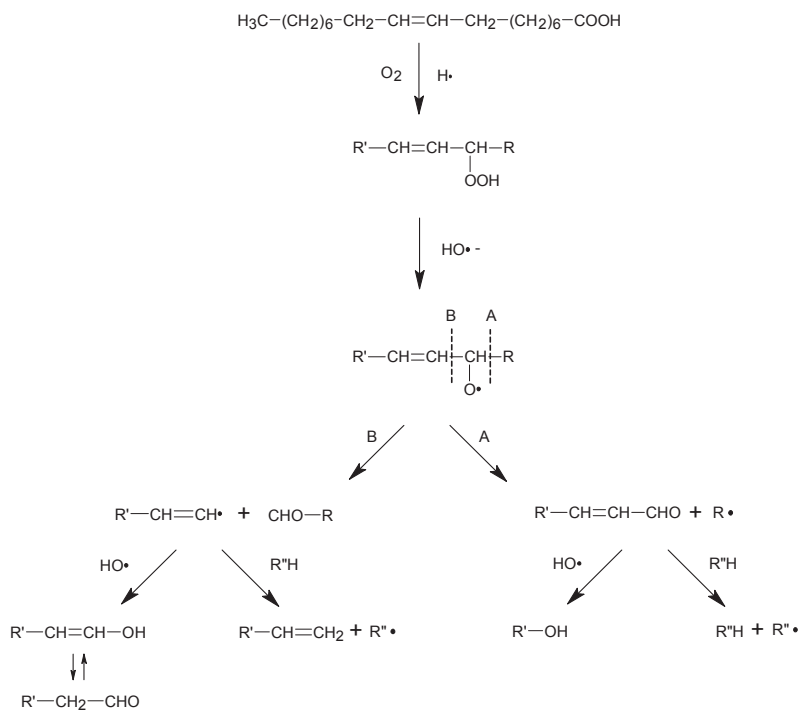


Figura 2 – Formação e decomposição dos hidroperóxidos (Kim & Min, 2008).

Por apresentarem baixo peso molecular esses produtos secundários da oxidação são voláteis e, por isso, são os responsáveis pelo desenvolvimento dos

“*off-flavors*” em alimentos oxidados. Esses produtos voláteis da oxidação lipídica (volatile lipid oxidation products, VLOPs) apresentam baixos *thresholds* impactando fortemente na qualidade dos alimentos, em especial os aldeídos que apresentam *thresholds* entre 0,7 e 15 ng/g (Buttery et al., 1988; Bartosz & Kolakowzka, 2011). O perfil de VLOPs de um alimento depende diretamente da composição de seus ácidos graxos (Tabela 1) (Genot et al., 2003; Volden et al., 2011).

Tabela 1 – Compostos voláteis produzidos durante a oxidação lipídica das diferentes ou famílias de ácidos graxos.

Ácidos graxos n-9	Ácidos graxos n-6	Ácidos graxos n-3
1-heptanol	1-hepten-3-ol	1,5-ocatadien-3-ona
1-octanol	1-hexanol	1-penten-3-ol
2-decenal	1-octen-3-ol	1-penten-3-ona
2-undecenal	1-octen-3-ona	2,3-pentadienona
decanal	1-pentanol	2,4,7-decatrienal
heptanal	2,3-octanediona	2,4-heptadienal
heptano	2,4-decadienal	2,4-hexadienal
nonanal	2-heptenal	2,6-nonadienal
octanal	2-hexanol	2-butenal
	2-hexen-1-ol	2-etilfurano
	2-octenal	2-pentanal
	2-pentilfurano	2-penten-1-ol
	heptanal	2-propenal
	hexanal	3-hepten-3-ol
	pentanal	3-hexanal
	pentano	4-penten-1-ol
		etano
		pentano
		propanal

Adaptado de Genot et al. (2003) e Volden et al.(2011).

3.2 Oxidação do colesterol

O colesterol apresenta uma ligação dupla entre os carbonos 5 e 6 no anel B (Figura 3), o que faz com que os carbonos 4, 7 e 10 sejam alílicos, no entanto, o carbono 4 raramente sofre abstração de seu hidrogênio por impedimento estérico devido à possível influência do grupo metila do carbono 19 e o carbono 10 é um carbono quaternário e por isso não possui hidrogênios, assim, o carbono 7 é o principal sítio de autoxidação (Lercker & Rodriguez-Estrada, 2002; Bragagnolo, 2009).

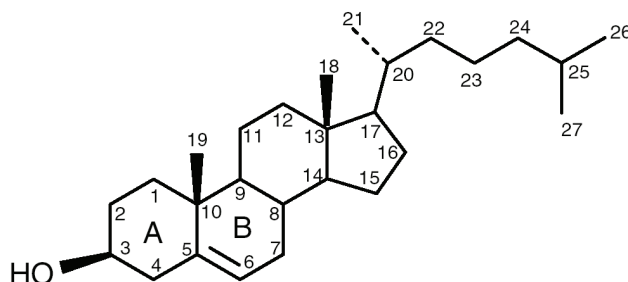


Figura 3 – Estrutura do colesterol.

Os hidroperóxidos podem ser formados no carbono 7 nas formas α e β , os quais podem se decompor formando o 7 α -hidroxicolesterol, o 7 β -hidroxicolesterol e o 7-cetocolesterol. Pela interação com ROS são formados os epoxicolesteróis (5,6 α -epoxicolesterol e 5,6 β -epoxicolesterol) que posteriormente podem ser hidratados formando o colestanoetriol. Os principais óxidos de colesterol encontrados nos alimentos são aqueles formados no anel B, mas a cadeia lateral também pode sofrer oxidação e formar hidroxicolesterol nas posições 20, 24, 25 e 26. A oxidação do colesterol pode dar origem a mais de 70 moléculas diferentes (Lercker & Rodriguez-Estrada, 2002; Hur et al., 2007; Bragagnolo, 2009).

Alimentos frescos contêm baixos níveis de produtos de oxidação do colesterol (cholesterol oxidation products, COPs), no entanto, o armazenamento, o processamento e o tratamento térmico dos alimentos pode elevar os níveis de COPs chegando até a 23 % do colesterol total (Soto-Rodríguez et al., 2008; Bartosz & Kolakowzka, 2011).

Os COPs formados pelo organismo humano ou absorvidos através da dieta podem se depositar nos tecidos e participar ativamente de várias rotas metabólicas, como reguladores de expressão gênica, mediadores do transporte de esteróis e precursores de vários outros compostos. Por outro lado, estudos indicam que os COPs podem apresentar atividade citotóxica, aterogênica, mutagênica e carcinogênica (Guardiola et al., 1996; Otaegui-Arazola et al., 2010; Vicente et al., 2012). Embora apresentem importância na saúde, valores seguros para a ingestão dos COPs ainda não foram estabelecidos (Vicente et al., 2012).

4 Métodos para análise de produtos da oxidação lipídica

A análise dos produtos da oxidação lipídica é uma tarefa complexa, pois um grande número de compostos é formado e a composição destes varia com a matéria prima, com a etapa de oxidação e com a extensão do processo oxidativo. Dessa forma, os métodos analíticos devem ser selecionados e/ou adaptados de acordo com a composição e quantidade desses produtos de oxidação (Kamal-Eldin & Pokorný , 2008).

4.1 Micro-extração em fase sólida de compostos voláteis

Dentre os compostos formados durante a oxidação lipídica, os mais impactantes na qualidade sensorial dos alimentos são os produtos voláteis de

cadeia curta (Venkateshwarlu et al., 2004; Varlet, et al., 2007), formados a partir da β -cisão dos hidroperóxidos (McClements & Decker, 2008; Kamal-Eldin & Pokorný, 2008). A análise desses produtos secundários da oxidação lipídica apresenta, ainda, boa correlação com as análises mais tradicionais como índice de peróxidos (PV) e o teste de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) (Iglesias & Medina, 2008; Mariutti et al., 2009).

Entre os vários métodos disponíveis para a análise dos produtos voláteis oriundos da oxidação lipídica, podem-se destacar as técnicas de *headspace* (HS), como alternativas rápidas e confiáveis, principalmente quando se considera a complexidade das matrizes alimentícias e a estabilidade de alguns destes produtos (Wrolstad et al., 2005; Scott, 2010).

O princípio básico da análise de HS consiste na extração dos analitos voláteis presentes na atmosfera adjacente à amostra seja de um sólido ou de um líquido (Stekelenburg & Koorevaar, 1971; Wampler, 2002). Entre as técnicas de HS pode-se destacar o *headspace* estático (S-HS), o *headspace* dinâmico, (D-HS), e a micro-extração em fase sólida (HS-SPME) (Wampler, 2002; Wrolstad et al., 2005).

O S-HS é a mais simples entre as técnicas citadas, onde a amostra é depositada em um recipiente vedado e aquecida até que os compostos voláteis alcancem o equilíbrio entre a fase gasosa e a fase líquida (ou sólida). Após atingir o equilíbrio, uma alíquota da fase gasosa é recolhida e injetada diretamente em um cromatógrafo gasoso (Flórez-Menéndez et al., 2004).

A técnica de D-HS consiste em submeter a amostra a um fluxo de gás (comumente nitrogênio ou hélio de alta pureza), causando o arraste dos compostos voláteis para um material adsorvente, onde estes serão retidos e, em

seguida, dessorvidos termicamente no cromatógrafo gasoso (Wrolstad et al., 2005; Scott, 2010). Quando a amostra é líquida utiliza-se o termo “Purge and Trap”, na qual o gás é borbulhado através da amostra (Wampler, 2002).

No HS-SPME, uma microfibras de sílica fundida revestida com polímeros absorventes é exposta à atmosfera adjacente à amostra, para a adsorção dos analitos que serão, posteriormente, dessorvidos termicamente direto em um cromatógrafo gasoso (Arthur & Pawliszyn, 1990; Wercinski & Pawliszyn, 1999).

Entre as técnicas de HS, a de D-HS é a que apresenta maior sensibilidade, porém apresenta alto custo em relação às demais, enquanto a de HS-SPME, além de apresentar bons níveis de sensibilidade, é mais efetiva para a extração dos compostos com pontos de ebulição médios e altos, sendo por isso uma técnica mais atraente. No entanto, vários fatores afetam o equilíbrio dessa análise, como o recobrimento da fibra utilizada, a temperatura e o tempo de extração, por esse motivo os parâmetros da análise devem ser cuidadosamente avaliados para o estabelecimento de um método utilizando HS-SPME (Marsili, 1999; Jordán et al. 2005; Mallia et al., 2005; Iglesias & Medina, 2008; Mariutti et al., 2009).

4.2 Extração assistida por micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas com frequência entre 300 MHz e 300 GHz, e estão localizadas entre a radiação infravermelha e as ondas de rádio. Os aparelhos de micro-ondas domésticos e industriais utilizam a frequência de 2,45 GHz para evitar interferências com os aparelhos de telecomunicação (Jacob et al., 1995). O aquecimento pelas micro-ondas se baseia em dois princípios, que podem atuar simultaneamente: a rotação dipolar e a condução iônica. Na rotação dipolar, os dipolos das moléculas se realinham de acordo com a

orientação do campo elétrico, como o campo varia rapidamente o movimento das moléculas gera aquecimento. Na condução iônica, os íons livres ou as espécies iônicas também se orientam de acordo com o campo elétrico, resultando no aquecimento por atrito (Hayes, 2002; Leonelli et al., 2013).

As radiações de micro-ondas são utilizadas em análises de laboratório desde a década de 1970 (Hesek & Wilson, 1974) e atuam como fonte de energia de ativação para acelerar reações químicas, pois geram um rápido e uniforme aquecimento dos compostos ou do meio reacional, enquanto as fontes convencionais transferem energia por condução, que é um processo mais lento. Nos métodos convencionais, geralmente, o recipiente é aquecido e a temperatura do meio reacional varia de acordo com a distância da fonte de energia, levando a diferentes velocidades de reação, de acordo com a posição da molécula no meio. Quando a fonte de energia cessa, o recipiente continua transferindo calor para o meio, o que não ocorre com as micro-ondas (Hayes, 2002).

4.2.1 Extração de colesterol assistida por micro-ondas

Em sistemas alimentícios, tanto o colesterol como seus óxidos podem ser encontrados na forma livre e na forma de ésteres e, por isso, requerem saponificação antes das análises cromatográficas. Existem basicamente duas formas de análise: na primeira, os lipídios são extraídos da amostra e então saponificados e na segunda os lipídios são saponificados diretamente na amostra e, então, o colesterol e os óxidos são extraídos. Contudo, a saponificação direta apresenta maior eficiência, melhor precisão e menor formação de artefatos (Ulberth & Buchgraber, 2002; Bragagnolo, 2009).

No método oficial, a saponificação da amostra para extração de colesterol requer aquecimento a 90 °C por 1 h, enquanto no método de saponificação assistida por micro-ondas (MAS) são necessários somente 2,5 min. Além da economia de tempo, o método utilizando a MAS também apresenta boa recuperação e alta precisão (AOAC, 1997; Piñeiro-Avila et al., 1998).

4.2.2 Extração de óxidos de colesterol assistida por micro-ondas

Para a análise de COPs são necessárias condições mais brandas do que aquelas para a análise do colesterol para evitar a formação de artefatos, no entanto, esses métodos requerem várias horas de saponificação (Mariutti et al., 2008; Georgiou et al., 2014). O método de MAS para a extração do colesterol utiliza uma potência relativamente alta (~350 W) e não controla a temperatura final, o que pode gerar a formação de óxidos de colesterol (Piñeiro-Avila et al., 1998). Atualmente não há na literatura nenhum método específico para a extração de COPs utilizando micro-ondas.

5 Referências Bibliográficas

- Ahn, D. U.; Wolfe, F. H.; Sim, J.S. (1993), 3 methods for determining nonheme iron in turkey meat. *Journal of Food Science*, 58, 288-291.
- Akoh, C. C.; Min, D. B. (2002) *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. Marcel Dekker: New York, 1005p.
- AOAC (1997) Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis; AOAC: Gaithersburg.

- Arthur, C. L., Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145–2148.
- Barbosa-Canovas, G; Ibarz, A. (2002) *Unit Operations in Food Engineering*. Boca Raton: CRC Press, 873p.
- Bartosz, G., Kolakowska, A. (2011) Lipid oxidation in food systems, in: Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. (Eds.), *Chemical, biological, and functional aspects of food lipids*: CRC Press, Boca Raton, pp.163-184.
- Bragagnolo, N. (2009). Cholesterol and cholesterol oxides in meat and meat products, in: Nollet, L., Toldra, F. *Handbook of muscle foods analysis*, CRC Press: Boca Raton, pp. 187-219.
- Brasil (2007). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Estatística da pesca 2005 Brasil*: grandes regiões e unidades da federação, Brasília: IBAMA, 2007. 174 p.
- Buttery, R., Turnbaugh, J., Ling, L. (1988). Contribution of volatiles to rice aroma. *Journal of agricultural and food chemistry*, 36(5), 1006–1009.
- Chandrasekaran, M. (1994) Methods for preprocessing and freezing of shrimps: a critical evaluation. *Journal of Food Science and Technology*, 3, 441-452.
- Chien, J. T., Lu, Y. F., Hu, P. C., Chen, B. H. (2003). Cholesterol photooxidation as affected by combination of riboflavin and fatty acid methyl esters. *Food Chemistry*, 81(3), 421–431.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillauma, J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235(1-4), 513–551.

- Doe, P. E. (1998) *Fish Drying and Smoking: Production and Quality*. Technomic: Lancaster, 250p
- FAO - Food and Agriculture Organization of The United Nations. Overview: major trends and issues. Fisheries and Aquaculture Department. ftp://ftp/fao.org/FI/STAT/summary/YB_Overview.pdf (Mar 15 2014).
- Flórez Menéndez, J. C., Fernández Sánchez, M. L., Fernández Martínez, E., Sánchez Uría, J. E., Sanz-Medel, A. (2004). Static headspace versus head space solid-phase microextraction (HS-SPME) for the determination of volatile organochlorine compounds in landfill leachates by gas chromatography. *Talanta*, 63(4), 809–814.
- Genot, C., Meynier, A., Riaublanc, A. Lipid Oxidation in Emulsions. In: *Lipid Oxidation Pathways*; Kamal-eldin A., Eds.; AOCS Press: Champaign, 2003, pp. 190-244.
- Georgiou, C. A, Constantinou, M. S., Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2014). Sample preparation: a critical step in the analysis of cholesterol oxidation products. *Food chemistry*, 145, 918–26.
- Guardiola, F., Codony, R., Addis, P. B., Rafecas, M., Boatella, J. (1996). Biological effects of oxysterols: current status. *Food and chemical toxicology*, 34(2), 193–211.
- Hall, G. M. (1997). *Fish processing technology*. Blackie Academic and Professional: Cornwall, 292p.
- Hayes, B.L., (2002). *Microwave synthesis: chemistry at the speed of Light*. CEM Publishing: Matthews, 295p..
- Hesek, J. A., Wilson, R. C. (1974) Use of a microwave oven in in-process control. *Analytical Chemistry*, 46(8), p. 1160-1160.

- Holthuis, L. B. (1980). *FAO species catalogue*: Vol. 1. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. Rome: FAO Fisheries Synopsis.
- Hur, S. J., Park, G. B., Joo, S. T. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. *Food Control*, 18(8), 939–947.
- Iglesias, J., Medina, I. (2008). Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *Journal of chromatography. A*, 1192(1), 9–16.
- Jacob, J., Chia, L.H.L., Boey, F.Y.C., (1995). Thermal and nonthermal interaction of microwave-radiation with materials. *Journal of Materials Science*, 30(21), 5321-5327.
- Jordán, M. J., Goodner, K. L., Castillo, M., Laencina, J. (2005). Comparison of two headspace solid phase microextraction fibres for the detection of volatile chemical concentration changes due to industrial processing of orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 1065–1071.
- Kamal-Eldin, A., Pokorný, J. (2008). Lipid oxidation products and methods used for their analysis, in: Kamal-Eldin, A., Pokorný, J. (Eds), *Analysis of lipid oxidation*, AOCS Press: Champaign.
- Kamal-Eldin, A.; Mäkinen, M., Lampi, A. (2003). The challenging contribution of hydroperoxides to the lipid oxidation mechanism, in: Kamal-Eldin, A. (Ed), *Lipid Oxidation Pathways*, AOCS Press: Champaign.
- Kim, H. J., Min, D. B. (2008). Chemistry of lipid oxidation, in: Akoh, D. U., Min, D. B. (Eds), *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*. CRC Press: Boca Raton, pp. 299-320.

- Kraemer, F. B., Stussi, J. S. P., Santos, N. N., Sgarbi, D. B. D. G., Clemente, S. C. D. S. (2001). Chemical-physical control in dried-salted shrimp comercialized in Rio de Janeiro State. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 8(2), 78–80.
- Kristensen, L., Purslow, P. (2001). The effect of processing temperature and addition of mono-and di-valent salts on the heme-nonheme-iron ratio in meat. *Food chemistry*, 73, 433–439.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244–82.
- Lee, S. K., Mei, L., Decker, E. A. (1997). Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. *Meat science*, 46(4), 349–55.
- Leonelli, C., Veronesi, P., Cravotto, G., (2013). Microwave-Assisted Extraction: An Introduction to Dielectric Heating, in: Chemat, F., Cravotto, G. (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*. Springer, New York, pp. 1-14.
- Lercker, G., Rodriguez-Estrada, M. T. (2002). Cholesterol oxidation mechanisms, in: Gardiola, F., Dutta, P. C. Codony, R., Savage, G. P. (Eds), *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects*. AOCS Press: Champaign.
- Luzia, L. A., Sampaio, G. R., Castelluci, C. M. N., Torres, E. A. F. S. (2003). The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chemistry*, 83(1), 93–97.

- Makarios-Laham, I., Lee, T. (1993). Protein hydrolysis and quality deterioration of refrigerated and frozen seafood due to obligately psychrophilic bacteria. *Journal of food science*, 58(2), 310–313.
- Mallia, S., Fernández-García, E., Olivier Bosset, J. (2005). Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 741–758.
- Mariutti, L. R. B., Nogueira, G. C., Bragagnolo, N. (2008). Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides extraction in chicken meat using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 2913–8.
- Mariutti, L. R. B., Nogueira, G. C., Bragagnolo, N. (2009). Solid phase microextraction-gas chromatography for the evaluation of secondary lipid oxidation products in chicken patties during long-term storage. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 20(10), 1849–1855.
- Marsili, R. T. (1999). Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *Journal of chromatographic science*, 37(1), 17–23.
- McClements, D. J., Decker, E. (2008) Lipids, in: Damodaran, S., Parkin, K., Fennema, O. R. (Eds), *Fennema's food chemistry*, CRC Press: Boca Raton, pp. 155-216.
- Niamnuy, C., Devahastin, S., Soponronnarit, S. (2007). Quality changes of shrimp during boiling in salt solution. *Journal of food science*, 72(5), S289–97.

- Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I. (2010). Oxysterols: A world to explore. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(12), 3289–303.
- Piñeiro-Avila, G., Salvador, A., Guardia, M. de la. (1998). Microwave-assisted saponification of animal greases for cholesterol determination. *Analytica chimica acta*, 371, 297–303.
- Rahman, M. S. (2007) *Handbook of food preservation*. CRC Press: Boca Raton, 1068p.
- Sampaio, G. R., Bastos, D. H. M., Soares, A. M., Queiroz, Y. S., Torres, E. A. F. S. (2006). Fatty acids and cholesterol oxidation in salted and dried shrimp. *Food Chemistry*, 95(2), 344–351.
- Sancho, R. A. S. (2010). *efeito da adição de coentro e urucum na composição de ácidos graxos em filé de pescada branca (Cynoscion spp)*. Tese de doutorado (Doutorando em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas: Campinas, 90p.
- Scott, R.P.W., 2010. Headspace sampling, in: *Encyclopedia of chromatography*, CRC Press: Boca Raton, pp. 1048–1049.
- Soto-Rodriguez, I., Campillo-Velazquez, P., Ortega-Martinez, J., Rodriguez-Estrada, M., Lercker, G., Garcia, H. (2008). Cholesterol oxidation in traditional Mexican dried and deep-fried food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(6), 489–495.
- Stekelenburg, G. J., Koorevaar, G. (1971). Head space analysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 34(2), 305–10.

- Sun, D. (2005) *Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues*. CRC Press: Boca Raton, 664p
- Tan, C. P., Che Man, Y. B., Selamat, J., & Yusoff, M. S. a. (2001). Application of arrhenius kinetics to evaluate oxidative stability in vegetable oils by isothermal differential scanning calorimetry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(11), 1133–1138.
- Tsironi, T., Dermesonlouglou, E., Giannakourou, M., Taoukis, P. (2009). Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 42(2), 664–671.
- Ulberth, F., Buchgraber, M. (2002). Extraction and purification of cholesterol oxidation products, in: Gardiola, F., Dutta, P. C. Codony, R., Savage, G. P. (Eds), *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects*. AOCS Press: Champaign.
- Varlet, V., Prost, C., Serot, T. (2007). Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurrence and mechanisms of formation. *Food Chemistry*, 105(4), 1536–1556.
- Venkateswarlu, G., Let, M. B., Meyer, A. S., Jacobsen, C. (2004). Modeling the sensory impact of defined combinations of volatile lipid oxidation products on fishy and metallic off-flavors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(6), 1635–41.
- Vicente, S. J. V., Sampaio, G. R., Ferrari, C. K. B., Torres, E. A. F. S. (2012). Oxidation of Cholesterol in Foods and Its Importance for Human Health. *Food Reviews International*, 28(1), 47–70.
- Volden, J., Bjelanovic, M., Vogt, G., Slinde, E., Skaugen, M., Nordvi, B., Egelanddal, B. (2011). Oxidation progress in an emulsion made from

metmyoglobin and different triacylglycerols. *Food Chemistry*, 128(4), 854–863.

Wampler, T. P., (2002). Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques, in: *Flavor, fragrance and odor analysis*. CRC: New York.

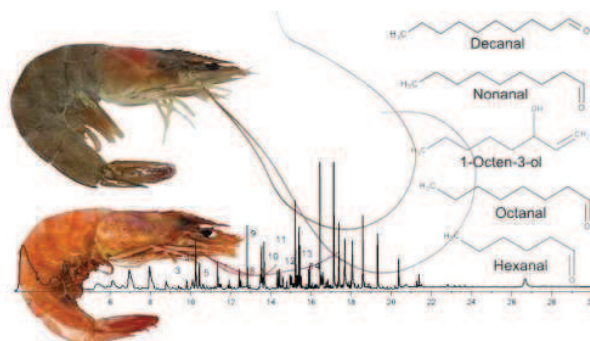
Wercinski, S. A. S., Pawliszyn, J., 1999. Solid phase microextraction theory, in: *Solid phase microextraction: a practical guide*, CRC Press: New York.

Wrolstad, R.E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D., Sporns, P. (2005). *Lipids*, in: *Handbook of food analytical chemistry*, Wiley-Interscience: Hoboken, pp. 419-646.

CAPÍTULO II

“New method for the extraction of volatile lipid oxidation products from shrimp by headspace–solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry and evaluation of the effect of salting and drying”

Hugo Antonio Lima de Souza, Neura Bragagnolo



"Reprinted with permission from Souza, H. A. L.; Bragagnolo, N. (2014). New method for the extraction of volatile lipid oxidation products from shrimp by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and evaluation of the effect of salting and drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(3), 590–599. Copyright 2014 American Chemical Society."

ABSTRACT: A new method based on headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) and GC-MS was developed, aimed at evaluating the formation of volatile lipid oxidation products (VLOPs) in shrimp during the salting and drying process. Of the four fibers evaluated, the fiber coated with divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) was the most adequate for the quantification of the VLOPs. The best analytical conditions were obtained by homogenization in an ultra-turrax followed by extraction at 40°C for 30 min. The optimized method allowed for the rapid and simple extraction of the VLOPs, with low detection ($\leq 0.15 \text{ ng.g}^{-1}$) and quantification ($\leq 0.50 \text{ ng.g}^{-1}$) limits, and satisfactory precision ($\leq 12.67\%$) and extraction efficiency ($\geq 94.28\%$). The salting and drying negatively affected shrimp quality, reducing the fatty acid content and increasing the VLOPs, especially hexanal.

KEYWORDS: volatile compounds, pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, method validation, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid.

INTRODUCTION

Shrimp represents about 15% of the fisheries commercialized throughout the world, being the most economically important international fishing and aquiculture product¹. However shrimp deteriorates easily, thus it must be submitted to some kind of preservation method to increase its shelf life.² Amongst the preservation methods, salting followed by drying stands out since it allows for storage of the shrimp at room temperature for various days.³

Drying or dehydration is one of the oldest and most important unit operations in the food industry which, by decreasing the water activity, reduces microbial growth and the speed of chemical and enzymatic reactions.⁴ However, the addition of salt and application of heat can accelerate lipid oxidation, with the formation of products with off-flavors and causing the loss of some nutritional properties.⁵

Despite its low lipid content (0.70 – 1.16 g/100g), the lipid fraction of shrimp is rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) such as eicosapentaenoic (EPA - 20:5n-3), docosahexaenoic (DHA - 22:6n-3) and arachidonic (ARA – 20:4n-6) acids, making it highly susceptible to lipid oxidation.⁶⁻⁸

Various compounds are formed during lipid oxidation, and of these, those with the greatest impact on the sensory quality of foods are the short chain volatile products formed from the β -cleavage of hydroperoxides.⁹ In addition, analysis of these secondary lipid oxidation products presented good correlation with the more traditional analyses such as the peroxide index (PI), the 2-thiobarbituric acid reactive substances test (TBARS)^{10,11} and the sensory analysis.¹²

Headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) is widely used in the analysis of volatile compounds in foods¹³ and consists of the use of a fiber with a

very small diameter covered by a stationary phase, which, on being exposed to the headspace of a sample adsorbs the volatile analytes, which are thermally desorbed directly in the gas chromatograph injector (GC).^{14,15} Among the advantages of SPME, short analysis time, absence of solvents and high sensitivity and selectivity stand out, in relation to traditional techniques.¹³

Exhaustive extraction of the analytes does not occur during SPME, but equilibrium is formed between the sample and the stationary phase of the fiber. Various factors can affect this equilibrium, such as the type of stationary phase and the extraction time and temperature, and therefore a careful study is required to establish a SPME method.^{10,16}

Thus the objective of the present work was to establish a HS-SPME-GC-MS method to quantify the volatile lipid oxidation products (VLOPs) in shrimp, and with the aid of this technique, evaluate the effect of processing on the lipid fraction of salted and salted, dried shrimp.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and materials. The alkane series (C5 to C24) used to calculate the retention index were obtained from Polyscience (New Haven, CT, USA). The standards used to identify and quantify the volatile compounds were pentanal, 2-methylpentanal (internal standard - IS), hexanal, 1-penten-3-ol, heptanal, 2-pentylfuran, 1-pentanol, octanal, 1-hexanal, nonanal, 1-octen-3-ol, 1-heptanol, decanal 1-octanol, and 2-octen-1-ol from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The purity of standards varied from 95 to 99%. The fibers Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), Polyacrylate

(PA) and Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB) were acquired from Supelco (Bellefonte, PA, USA). A total of 37 saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid methyl esters standards (C4-C24, SulpecoTM 37 component FAME-Mix, catalogo no. 18919-1) were used to identify and methyl undecanoate and methyl tricosanoate (Sigma Aldrich) quantify the fatty acids. The reagents and solvents used were of analytical (Synth, Diadema, SP, Brazil) or HPLC grade (Fisher, Fair Lawn, NJ, USA) and the water was purified by Millipore Milli-Q system (Billerica, MA, USA).

Samples. The volatile compound extraction method was optimized using salted and dried pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The fresh and whole shrimp (1.0 kg with head and shell) was obtained from the local market in Campinas (SP, Brazil), and was submitted to salting in boiling water (30% NaCl for 10 min) and drying in an air circulating oven at 60 °C for 4 h. A new sample was prepared with fresh shrimp to each step of optimization.

To evaluate the effects of processing on the shrimp lipids, two new batches, each of 1.5 kg fresh shrimp were acquired from the same place with an interval of one week. Again, each batch was separated into three parts (500g each, ~25 shrimps), one fresh, another just salted and the third salted and dried. The shrimp processing was identical to that used in the method optimization step. Moisture content was carried out according to the AOAC method 950.46.²⁵ The moisture content of fresh samples were $75.75 \pm 0.22 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ at batch 1 and $76.41 \pm 0.16 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ at batch 2; of salted shrimp were 63.68 ± 0.11 at batch 1 and $62.34 \pm 0.38 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ at batch 2; and of salted, dried shrimp were 50.84 ± 0.18 at batch 1 and $47.57 \pm 0.15 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ at batch 2.

Optimization of the analysis of the volatiles by HS-SPME-GC-MS. In order to establish the method used to extract the volatile compounds by SPME, three factors that affect the extraction performance were evaluated in sequence: the type of stationary phase used to coat the fiber; the sample preparation method and the extraction time/temperature binomial, using the best condition obtained in the previous step for the subsequent step.

Fibers coated with 4 different materials were tested in order to choose the best fiber for the above purpose: CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB. The fibers were first conditioned according to the manufacturer's instructions. The extraction procedure was carried out in the same way for all the fibers (n=6). The salted, dried shrimp (100 g) was peeled and ground and 1 g of ground sample placed in a vial (20 mL with screw top and PTFE septum - Supelco, Bellefonte, PA, USA). The vial was then incubated for 15 min at 40 °C and then the fiber was exposed for 30 min to HS, followed by desorption directly in the injector for 1 min at 250 °C. After each desorption, the fibers were reconditioned for 10 min at 250 °C in a flow of He. The whole extraction step was carried out using an AOC-5000 auto-injector (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Three sample preparation procedures were tested: in the first, 1 g of shrimp was sealed in a vial; in the second, 3 mL of ultrapure water were added to the shrimp (1 g), which was then sealed and homogenized in a vortex (Phoenix Lufanco, São Paulo, Brazil) for 1 min; and in the third, 30 mL of ultrapure water was added to 10 g of sample in a beaker and homogenized in a high-speed Ultra-Turrax (Jankel & Kunkel GmbH, Staufen, Germany) for 1 min at 12,000 RPM and 4 g of this mixture were placed in a vial and sealed. In the three cases, the volatiles

were extracted in the same condition to that employed in the selection of the fiber (n=3).

In order to evaluate the influence of time and temperature on the extraction of the volatile compounds by HS-SPME, analyses were carried out at 40, 60 and 80 °C for 15, 30, 60 and 120 min in random, independent trials using the fiber and sample preparation mode that gave the best results (n=3).

GC-MS. The chromatographic analysis was carried out in a GC coupled to an Ultra GCMS-QP2010 mass spectrometer (MS) (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a splitless injector at 250 °C; RTX-Wax capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.20 µm thick stationary phase – polyethylene glycol) (Restek, Bellefonte, PA, USA); workstation (GCMSSolution, Shimadzu, Kyoto, Japan); ion source in the electron ionization mode (EI) at 70 eV and 250 °C, cutting the solvent after 1.1 min. The mass/charge (m/z) analyzer was quadrupole, operating in the scanning mode (SCAN = 35-350 m/z) to identify the compounds, and in the selected ion monitoring (SIM) mode for quantification. Helium was used as the carrier gas in the linear flow control mode with a constant column flow of 1.22 mL/min. The oven temperature program started at 30 °C for 5 min, followed by heating at 10 °C/min to 115 °C, maintaining at this temperature for 1 min, and then heating at 30 °C/min to 220 °C and maintaining at this temperature for 12 min, giving a total time of 30 min. The temperature program of the oven was based on Shahidi and Pegg¹⁷, with changes in the initial and final temperatures.

The volatile compounds were identified by comparison of the mass spectra obtained for the samples with the mass spectra of the analytical standards under the same experimental conditions and with those from the mass spectra library

(Wiley 9). In addition, an alkane series (C5-C24) was used to calculate the retention index (RI) for each compound with the RTX-Wax column¹⁸, and compared with those found in the literature for columns with the same polarity.^{19,20} The compounds that presented mass spectra similar to those in the library, but differed from the literature with respect to the RI, were considered to be tentatively identified.²¹

The VLOPs were quantified using analytical curves obtained with the respective standards added to the sample, using 2-methylpentanal as the IS in the SIM mode and the fragments that gave the best signal/noise ratio for each compound (Table 1).

Validation. The optimized method for extracting the VLOPs (DVB/CAR/PDMS, ultra-turrax, at 40 °C for 30 min) was submitted to validation by way of the following criteria: linearity, detection and quantification limits, repeatability and recovery. Samples of salted, dried shrimp prepared on the same day as the analysis, were used for validation.

Table 1 – Standards retention indexes and fragments used to quantify the volatile lipid oxidation products.

Peak	Compound name	RI ^a	Target fragment (m/z)	Reference fragments (m/z)
1	Pentanal	962	58	41; 44
IS ^b	2-Methylpentanal	986	58	41; 43
2	Hexanal	1069	56	41; 57
3	1-Penten-3-ol	1156	57	29; 31
4	Heptanal	1169	70	41; 57
5	2-Pentylfuran	1214	81	82; 138
6	1-Pentanol	1243	42	55; 70
7	Octanal	1270	84	41; 56
8	1-Hexanol	1341	56	42; 55
9	Nonanal	1376	57	41; 56
10	1-Octen-3-ol	1441	57	43; 72
11	1-Heptanol	1447	70	55; 56
12	Decanal	1487	57	55; 82
13	1-Octanol	1551	56	55; 70
14	2-Octen-1-ol	1606	57	43; 55

^a RI – retention index; ^b IS – internal standard.

The analytical curve was elaborated by addition of external standards to the sample in the concentration range from 1 to 80 ng.g⁻¹ with the addition of 100 ng.g⁻¹ of 2-methylpentanal as the IS. The detection and quantification limits were calculated based on the signal to noise ratio (S/N) with S/N=3 and 10, respectively. Repeatability was expressed as the relative relative standard deviation (% RSD; n=6). In order to calculate the recovery, samples were fortified with standards in two levels (5 ng.g⁻¹ and 20 ng.g⁻¹) and the response was subtracted from the mean result of not fortified samples (n=6).

Fatty acid composition of the shrimp lipids. For the three samples of the two batches, the lipids were obtained according to Folch et al.²², the analyses being carried out in triplicate (n=3). After extraction, the lipids (25±1 mg) were converted

into FAME according to Joseph and Ackman²³ and injected into the GC using the hot needle technique for 5 s. The chromatograph used was the GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a split injector (1/50) at 250 °C; fused silica CP-SIL 88 capillary column (100 m × 0.25 mm i.d., 0.20 µm thick stationary phase – cyanopropyl) (Chromopack, Middleburg, The Netherlands); flame ionization detector at 260 °C and workstation (GCSolution, Shimadzu, Kyoto, Japan). The temperature was programmed according to Sancho et al.²⁴, with H₂ as the carrier gas at a linear velocity of 34 cm/s, and N₂ as the make-up gas at 30 mL/min. The fatty acids were identified by comparison of the retention times with those of the standards. Quantification was done by internal standardization (11:0 and 23:0). The fatty acid concentrations were calculated according to the AOAC method²⁵ and the results expressed in mg of fatty acid per g of lipid.

Statistical analysis. The results were compared using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test in the case of significant differences ($p < 0.05$). The ANOVA and the fit of the analytical curves were carried out with the aid of the Statistica 5.0 software (Statsoft, Tulsa, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of HS-SPME method. A total of 123 volatile compounds were found in the salted, dried shrimp (65 with the CAR/PDMS fiber, 64 with DVB/CAR/PDMS, 67 with PA and 81 with PDMS/DVB, Table S1 in the Supporting Information). Of those compounds, 14 (7 alcohols, 6 aldehydes and 1 furan) could be classified as VLOPs (Table 1 and Figure 1).²⁶⁻²⁸ Hexanal, heptanal and 1-octen-3-ol were also found in cooked lobsters.^{29,30} Dried shrimp of the species *Acetes chinensis*

presented 1-penten-3-ol, 1-pentanol, 1-hexanol and 1-octen-3-ol among their volatiles.³¹

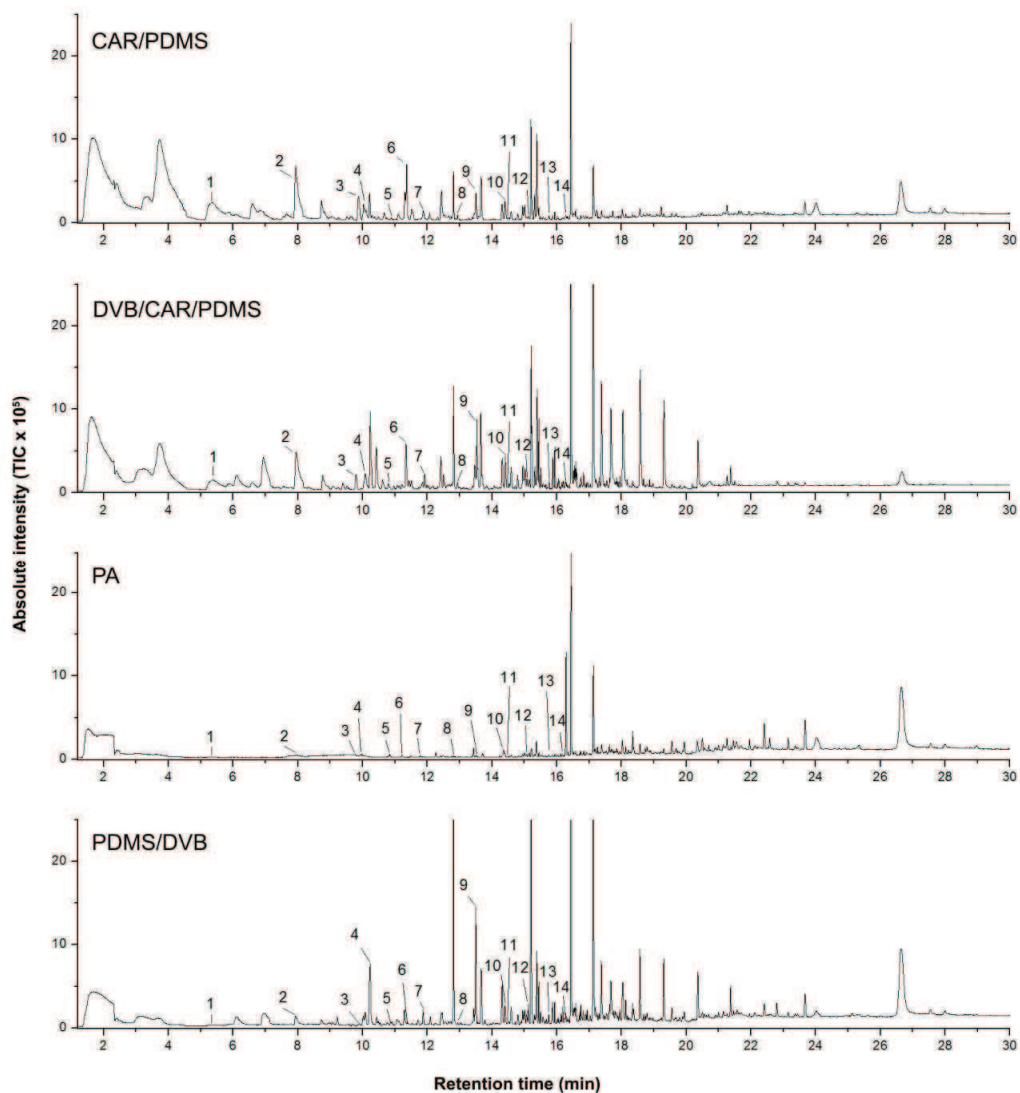


Figure 1 – Chromatograms of the volatile compounds obtained from salted, dried shrimp by HS-SPME-GC-MS (Scan – 35-350 m/z) according to the fiber used. Compounds numbered according to Table 1.

The fiber coated with CAR/PDMS showed the best results for the VLOPs with the lowest RI values (Figure 2), whereas the fiber coated with PDMS/DVB presented

the best results for the compounds with higher RI values, and the fiber coated with PA presented smaller areas for all the compounds. However the fiber coated with DVB/CAR/PDMS presented good results in a broader range of RI than the other fibers. Similar results were reported by Garcia-Esteban et al.³², where the CAR/PDMS fiber gave the best results for compounds with RI values below 980 and the DVB/CAR/PDMS fiber was better for compounds with higher RI values.

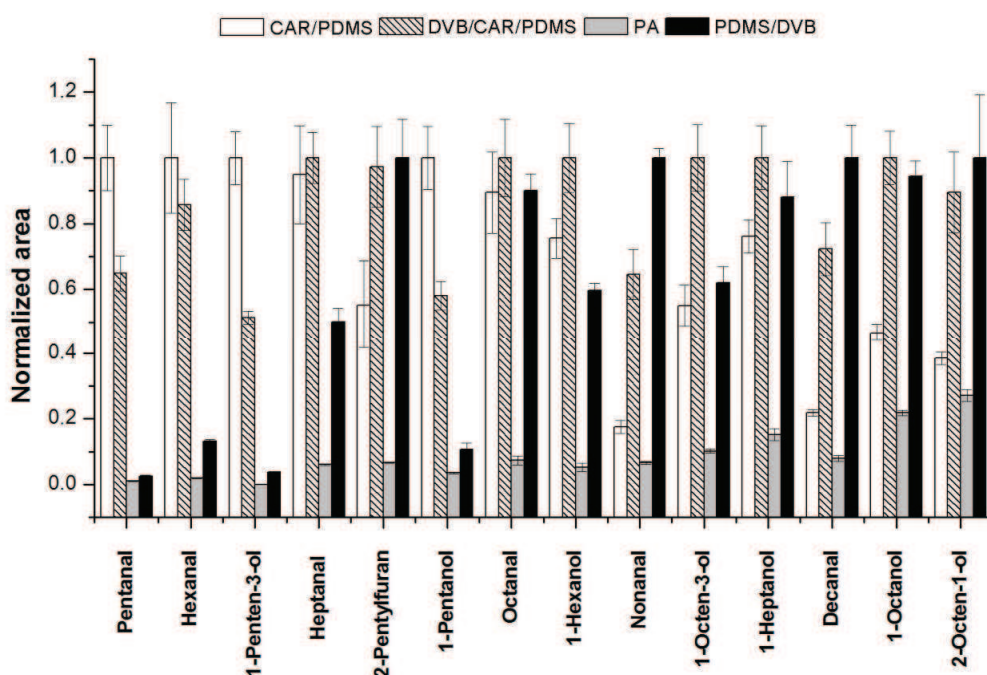


Figure 2 – Effect of fiber coating in the extraction of volatile lipid oxidation products from salted, dried shrimp (obtained in the SIM mode; n=6). Compounds placed in order of increasing RI from left to right.

Thus the DVB/CAR/PDMS fiber was considered to be the most adequate for the extraction of VLOPs from salted, dried shrimp. A total of 50 compounds were identified and 14 were tentatively identified with this fiber, which are listed with their respective RI values in table 2.

Table 2 – Volatile compounds obtained from salted, dried shrimp by HS-SPME-GC-MS using the fiber DVB/CAR/PDMS

Compound	RT ^a (min)	RI ^b	Identification method
Acids			
3-Methylbutanoic acid	16.63	1659	MS+RI ^c
Stearic acid	26.63	> 2400	MS ^d
Pentadecanoic acid	28.97	> 2400	MS
Alcohols			
1-Butanol	9.47	1140	MS+ RI
1-Penten-3-ol ^f	9.77	1156	Standard ^e
1-Pentanol ^f	11.34	1243	Standard
Cyclopentanol	12.31	1302	MS+ RI
1-Hexanol ^f	12.89	1341	Standard
2,6-Dimethyl-1,7-octadiene-3,6-diol	14.05	1419	MS
1-Octen-3-ol ^f	14.39	1441	Standard
1-Heptanol ^f	14.48	1447	Standard
2,6-Dimethyl-7-octen-2-ol	14.71	1463	MS+ RI
1,5-Octadien-3-ol	14.94	1478	MS+ RI
2-Ethyl-1-hexanol	15.00	1482	MS+ RI
2,6-Dimethyl-2,7-octadien-6-ol	15.65	1540	MS+ RI
1-Octanol ^f	15.75	1551	Standard
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	16.27	1608	MS+RI
2-Octen-1-ol ^f	16.34	1618	Standard
2-Cycloocten-1-ol	16.74	1675	MS
1-Octadecanol	23.67	> 2400	MS
Aldehydes			
2-methylbutanal	3.72	844	MS+RI
Pentanal ^f	5.35	962	Standard
Hexanal ^f	7.93	1069	Standard
Heptanal ^f	10.02	1169	Standard
4-Heptenal	11.11	1230	MS+RI
Octanal ^f	11.78	1270	Standard
Nonanal ^f	13.42	1376	Standard
Decanal ^f	15.07	1487	Standard
Benzaldehyde	13.37	1511	MS+RI
Palmitaldehyde	19.55	2132	MS+RI
Heptadecanal	21.26	2302	MS
Cyclic hydrocarbons			
Ethylbenzene	8.73	1101	MS+RI
1,4 Dimethylbenzene	9.04	1117	MS+RI
Cyclododecane	11.05	1226	MS+RI

Table 2. Continuation

Styrene	11.29	1241	MS+RI
1-Methylnaphthalene	17.78	1779	MS
Esters			
Vinyl hexanoate	12.46	1312	MS+RI
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol isobutyrate	di- 17.89	1788	MS
Di-isobutyl phthalate	23.15	> 2400	MS+RI
Heterocyclic compounds			
1-Vinylaziridine	5.87	979	MS
2-Pentylfuran ^f	10.84	1214	Standard
2-Methylpyrazine	11.50	1253	MS
2,5-Dimethylpyrazine	12.40	1308	MS+RI
2-Acetyl-1-pyrroline	12.66	1325	MS+RI
2-Ethyl-6-methylpyrazine	13.38	1374	MS+RI
2,3,5-Trimethylpyrazine	13.65	1392	MS+RI
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	14.31	1436	MS+RI
2,6-Diethylpyrazine	14.59	1454	MS+RI
2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	14.79	1468	MS+RI
3,5-Diethyl-2-methylpyrazine	15.07	1486	MS+RI
Pyrrole	15.31	1505	MS+RI
4-Octadecylmorpholine	19.94	2177	MS
Aliphatic hydrocarbons			
Decane	6.10	997	MS+RI
Dodecane	10.60	1200	MS+RI
(3E)-3-Tetradecene	11.21	1236	MS
5-Methylenetridecane	13.77	1400	MS
1-Pentadecene	15.69	1544	MS+RI
Ketones			
1-Hydroxyacetone	12.14	1291	MS+RI
2-Nonanone	13.43	1377	MS+RI
2-Undecanone	16.11	1589	MS+RI
2-Pentadecanone	18.73	2018	MS+RI
o-Aminoacetophenone	20.30	2216	MS+RI
Others			
Trimethylamine	1.62	616	MS+RI
Methyl N-hydroxybenzenecarboximidate	17.13	1719	MS

^aRT – retention time; ^bRI – retention index; ^cMS+RI – identified by comparison of the fragment with the library (Wiley9) and by the retention index as compared with the literature; ^dMS – tentatively identified compound; ^eStandard – identity confirmed with the standard; ^fcompounds identified as volatile lipid oxidation products.

Sample preparation before SPME also influences the extraction yield of VLOP (Figure 3). Vortex homogenization with water resulted in the smallest area values and the highest RSD values (19.22% in average).

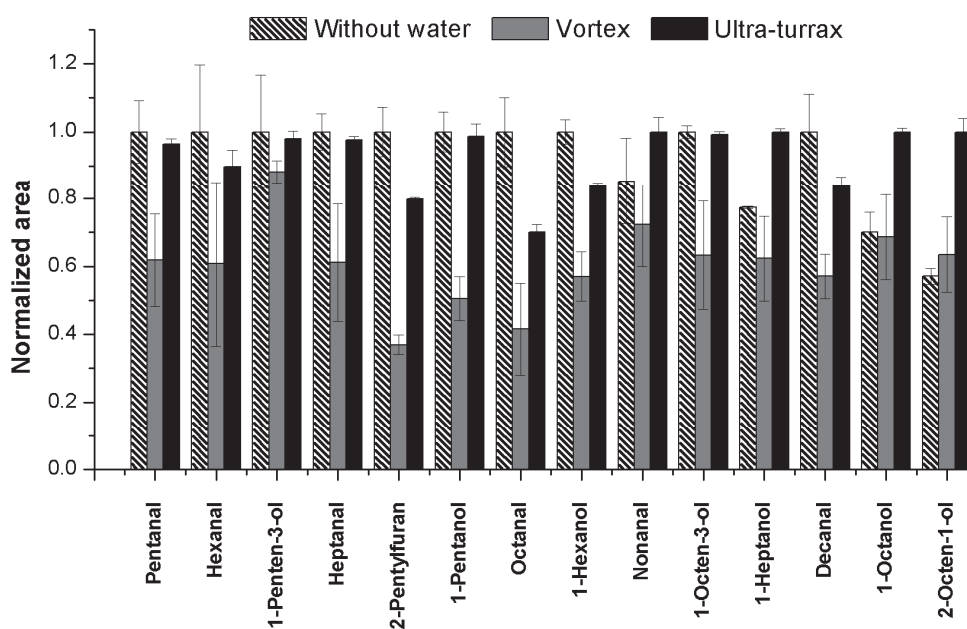


Figure 3 – Effect of sample preparation on the extraction of volatile lipid oxidation products from salted, dried shrimp with the fiber DVB/CAR/PDMS (n=3)

The shrimp without water addition presented the largest areas for 2-pentylfuran, octanal and 1-hexanol, whereas the shrimp homogenized with water in the ultra-turrax showed the largest areas for 1-heptanol, 1-octanol and 2-octen-1-ol. In these cases, no difference was observed for the areas between the other VLOPs. Nevertheless the sample without water addition presented a mean RSD higher (8.47%) than that of the sample homogenized with water in the ultra-turrax (2.34%). The difference in the results of the sample homogenized in the vortex and the ultra-turrax can be attributed to the fact that after a few minutes, the sample

homogenized with vortex separated in two layers (liquid phase at the top and solid phase at the bottom). Probably, the liquid phase containing water hampered the volatile compounds to migrate to the headspace leading to lower extraction; however, a homogeneous slurry was formed when the ultra-turrax was used.

Both the temperature and the exposition time of the fiber in the HS of the sample significantly influenced the quantity of volatiles extracted. With the exception of, All the VLOPs showed similar behavior to hexanal with the exception of pentanal, 1-penten-3-ol and 1-pentanol. The increase in temperature and extraction time provoked an increase in the area (Figure 4A). The 5 carbon VLOPs (pentanal, 1-penten-3-ol and 1-pentanol) probably did not interact with the fiber coating in the same way as the compounds with higher molecular masses, although their extraction was also affected by time and temperature (Figure S2 in the Supporting Information). The extraction time was not sufficient to reach equilibrium, which could take more than 5 h for the fiber used (DVB/CAR/PDMS)., Moreover long extraction times could cause the formation of high amount of VLOPs such as hexanal and nonanal³³, while shorter extraction times make the analysis more acceptable for practical ends.³²

After 30 min of extraction (Figure 4B) the RSD was lower, principally for the extractions at 40 and 80 °C, and no improvement in repeatability was achieved after this extraction time. Although the use of higher temperatures allowed for greater extraction of the volatile compounds, lower temperatures avoided the formation of VLOPs during extraction.^{34,35} The use of lower temperatures (< 50°C) also allowed for better correlation with the sensory profile.⁹

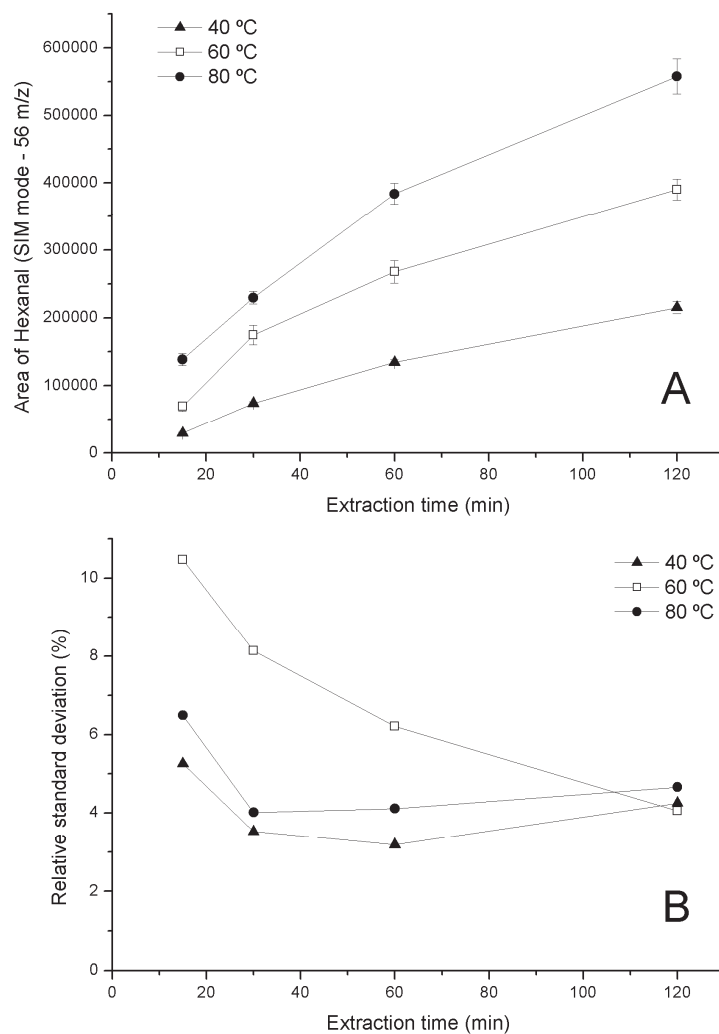


Figure 4 – Effect of time and temperature on (A) extraction of hexanal and (B) the mean repeatability of the volatile compounds from salted, dried shrimp with the fiber DVB/CAR/PDMS (n=3)

Validation. The method (using DVB/CAR/PDMS fiber, homogenization with water using ultra-turrax and extraction at 40 °C for 30 min) showed good linearity for all the VLOPs (the coefficient of determination varied from 0.9637 to 0.9978, Table 3). The detection limits varied from 0.03 to 0.15 ng.g⁻¹ and the quantification limits varied from 0.11 to 0.50 ng.g⁻¹. The method showed satisfactory precision (RSD ≤

12.67%) and efficiency (recovery \geq 94.28%). The analytical curve was developed with low initial values (1 ng.g⁻¹), because the VLOPs found in the salted, dried shrimp, according to Buttery et al.,³⁶ have low thresholds (0.7 – 15 ng.g⁻¹), but a great impact on the sensory characteristics, especially the aldehydes.

Table 3 – Data of the analytical curve, linearity, detection and quantification limits, precision and recovery of the optimized method

VLOPs ^a	Slope	Intercept	R ^{2b}	Linear range (ng.g ⁻¹)	LOD ^c ng.g ⁻¹	LOQ ^d ng.g ⁻¹	Repeatability (% RSD ^e)	Recovery 5 ng (%)	Recovery 20 ng (%)
Pentanal	0.0067	0.0025	0.9882	1-80	0.04 ± 0.01	0.15 ± 0.04	1.10	98.80 ± 3.40	100.52 ± 4.47
Hexanal	0.0078	0.0155	0.9922	1-80	0.04 ± 0.01	0.13 ± 0.03	3.85	98.43 ± 3.82	99.85 ± 3.72
1-Penten-3-ol	0.0145	-0.0243	0.9637	1-80	0.03 ± 0.01	0.11 ± 0.02	3.11	97.89 ± 2.10	101.77 ± 3.65
Heptanal	0.0035	0.0010	0.9924	1-80	0.06 ± 0.01	0.21 ± 0.04	4.98	103.76 ± 2.58	97.41 ± 1.07
2-Pentylfuran	0.0085	-0.0122	0.9898	1-80	0.06 ± 0.01	0.21 ± 0.05	5.24	101.77 ± 5.78	98.89 ± 6.82
1-Pentanol	0.0051	-0.0036	0.9842	1-80	0.15 ± 0.01	0.50 ± 0.04	1.10	94.28 ± 2.49	103.00 ± 1.73
Octanal	0.0019	-0.0014	0.9924	1-80	0.11 ± 0.03	0.36 ± 0.10	4.43	105.60 ± 9.29	98.39 ± 4.13
1-Hexanol	0.0097	-0.0121	0.9964	1-80	0.03 ± 0.01	0.11 ± 0.02	4.23	99.23 ± 4.78	96.87 ± 6.28
Nonanal	0.0038	0.0130	0.9787	1-80	0.04 ± 0.01	0.15 ± 0.03	4.49	102.38 ± 6.00	96.29 ± 4.56
1-Octen-3-ol	0.0228	-0.0053	0.9978	1-80	0.05 ± 0.00	0.16 ± 0.01	2.60	97.36 ± 7.53	96.84 ± 5.03
1-Heptanol	0.0051	-0.0085	0.9952	1-80	0.09 ± 0.02	0.29 ± 0.05	1.03	96.93 ± 3.83	96.11 ± 0.03
Decanal	0.0015	-0.0009	0.9849	1-80	0.08 ± 0.03	0.26 ± 0.09	12.67	102.41 ± 4.75	99.14 ± 13.72
1-Octanol	0.0039	-0.0051	0.9924	1-80	0.04 ± 0.01	0.14 ± 0.04	3.15	103.66 ± 7.28	97.33 ± 9.86
2-Octen-1-ol	0.0034	-0.0104	0.9876	1-80	0.05 ± 0.01	0.16 ± 0.04	1.84	95.84 ± 5.13	98.85 ± 1.87

^aVLOP – volatile lipid oxidation product; ^bR² – coefficient of determination; ^cLOD – limit of detection; ^dLOQ – limit of quantification; ^eRSD – relative standard deviation.

Effect of processing on the shrimp fatty acids. The n-3 fatty acids represented the majority among the PUFAs of fresh shrimp (Table 4) and the fatty acids profiles were similar in both batches with little differences in the eicosadienoic (20:2n-6) and behenic (22:0) acids. The predominant fatty acids in the shrimp lipids were palmitic acid (16:0), oleic acid (18:1n-9), stearic acid (18:0), linoleic acid (18:2n-6), DHA and EPA.

Table 4 – Fatty acid composition of the lipids of fresh and processed shrimps

Fatty acids (mg.g ⁻¹ of oil)	Fresh		Salted		Salted, dried	
	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
14:0	1.36 ± 0.06 ^{ab}	1.28 ± 0.04 ^b	1.24 ± 0.10 ^b	1.54 ± 0.09 ^{ac}	1.67 ± 0.05 ^c	1.53 ± 0.01 ^{ac}
15:0	8.89 ± 0.79 ^a	9.40 ± 0.13 ^a	8.39 ± 0.72 ^{ab}	8.79 ± 0.29 ^a	7.29 ± 0.27 ^b	7.21 ± 0.41 ^b
16:0	97.06 ± 3.90 ^a	90.17 ± 3.90 ^{ab}	81.41 ± 2.73 ^b	90.48 ± 3.45 ^{ab}	80.61 ± 5.14 ^b	85.90 ± 5.40 ^{ab}
16:1n-9	5.39 ± 0.43 ^a	6.00 ± 0.51 ^{ab}	6.36 ± 0.19 ^{ab}	7.06 ± 0.27 ^b	6.14 ± 0.64 ^{ab}	7.11 ± 0.50 ^b
17:0	16.17 ± 1.66 ^a	14.90 ± 0.02 ^{ab}	13.34 ± 1.00 ^{bd}	13.06 ± 0.50 ^{bcd}	11.01 ± 0.20 ^c	11.67 ± 0.46 ^{cd}
17:1n-6	0.70 ± 0.04 ^a	0.84 ± 0.04 ^{ab}	1.35 ± 0.07 ^c	0.83 ± 0.02 ^{ab}	0.79 ± 0.04 ^{ab}	0.85 ± 0.01 ^b
18:0	60.33 ± 2.99 ^a	55.17 ± 1.52 ^{ab}	51.48 ± 1.60 ^{bd}	51.02 ± 1.41 ^{bcd}	44.87 ± 3.13 ^c	46.83 ± 2.56 ^{cd}
18:1n-9	84.58 ± 5.11 ^{ab}	79.75 ± 3.01 ^{ab}	78.16 ± 2.04 ^{ab}	86.52 ± 2.31 ^a	76.34 ± 4.56 ^b	87.02 ± 3.55 ^a
19:0	1.37 ± 0.02 ^a	1.28 ± 0.05 ^a	1.21 ± 0.09 ^a	1.15 ± 0.07 ^a	1.11 ± 0.04 ^a	1.17 ± 0.16 ^a
18:2n-6	52.46 ± 2.74 ^{ab}	52.87 ± 1.52 ^{ab}	49.79 ± 1.47 ^a	56.18 ± 1.69 ^b	48.81 ± 3.45 ^a	54.29 ± 1.74 ^{ab}
20:0	1.28 ± 0.06 ^{ab}	1.45 ± 0.07 ^a	1.34 ± 0.07 ^{ab}	1.25 ± 0.03 ^{bc}	1.29 ± 0.04 ^{ab}	1.07 ± 0.08 ^c
20:1n-9	2.04 ± 0.08 ^{abc}	1.82 ± 0.07 ^a	1.92 ± 0.14 ^{ab}	2.10 ± 0.02 ^{bc}	1.29 ± 0.13 ^{ab}	2.29 ± 0.07 ^c
18:3n-3	2.25 ± 0.12 ^a	2.28 ± 0.13 ^a	2.21 ± 0.08 ^a	2.53 ± 0.06 ^a	2.40 ± 0.11 ^a	2.51 ± 0.25 ^a
20:2n-6	5.49 ± 0.28 ^a	4.93 ± 0.13 ^{ab}	4.71 ± 0.14 ^{bc}	4.80 ± 0.11 ^{bc}	4.30 ± 0.08 ^c	5.22 ± 0.35 ^{ab}
22:0	1.42 ± 0.03 ^{ab}	1.73 ± 0.09 ^c	1.53 ± 0.05 ^{ac}	1.30 ± 0.05 ^b	1.46 ± 0.07 ^{ab}	1.41 ± 0.12 ^{ab}
20:4n-6	26.43 ± 1.41 ^a	25.06 ± 0.80 ^{ab}	22.52 ± 0.42 ^{bc}	21.55 ± 0.30 ^{cd}	18.68 ± 1.05 ^e	19.72 ± 1.27 ^{de}
20:5n-3	42.42 ± 2.28 ^a	41.17 ± 1.28 ^{ab}	39.98 ± 0.84 ^{abd}	37.45 ± 0.51 ^{bd}	32.58 ± 1.97 ^c	36.21 ± 1.68 ^{cd}
24:1n-9	2.43 ± 0.19 ^a	2.41 ± 0.08 ^a	2.17 ± 0.09 ^a	2.12 ± 0.05 ^a	2.15 ± 0.17 ^a	3.57 ± 1.74 ^a
22:6n-3	50.46 ± 1.59 ^{ab}	51.17 ± 1.45 ^a	47.15 ± 0.99 ^{bc}	44.07 ± 0.41 ^{cd}	42.31 ± 2.30 ^d	43.62 ± 0.80 ^{cd}
SFA	187.88 ± 9.50 ^a	175.38 ± 5.83 ^a	159.93 ± 6.36 ^a	168.59 ± 5.88 ^a	149.30 ± 8.92 ^a	156 ± 9.20 ^a
MUFA	95.14 ± 5.86 ^a	90.82 ± 3.71 ^a	89.97 ± 2.53 ^a	98.63 ± 2.67 ^a	87.34 ± 5.55 ^a	100 ± 5.87 ^a
PUFA	179.51 ± 8.42 ^a	177.48 ± 5.32 ^a	166.37 ± 3.93 ^a	166.58 ± 3.08 ^a	149.09 ± 8.95 ^a	131.58 ± 6.09 ^a

Table 4. Continuation

Σn-3	95.13 ± 3.99 ^{ab}	94.62 ± 2.86 ^a	89.35 ± 1.91 ^{bc}	84.05 ± 0.98 ^c	77.30 ± 4.38 ^c	82.34 ± 2.73 ^{bc}
Σn-6	84.38 ± 4.43 ^a	82.86 ± 2.46 ^a	77.02 ± 2.02 ^a	82.53 ± 2.10 ^a	71.79 ± 4.57 ^a	79.24 ± 3.36 ^a
Total	462.53 ± 23.77 ^a	443.69 ± 14.86 ^b	416.28 ± 12.82 ^c	433.79 ± 11.63 ^d	385.73 ± 23.42 ^e	419 ± 21.17 ^f

Values expressed as the mean ± standard deviation (n=3). Different letters in the same line indicate significant difference between the values (P < 0.05). SFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids; Σn-3 = PUFA n-3; Σn-6 = PUFA n-6.

Salting caused a reduction in 5 fatty acids in batch 1, whereas only 4 fatty acids were reduced in batch 2, but only the contents of ARA and DHA were reduced in both batches. After drying, the reduction in pentadecanoic acid (15:0), margaric acid (17:0), stearic acid (18:0) and EPA became significant for both batches in comparison with the fresh shrimp. In addition, processing reduced the total fatty acid content of the lipid fraction. A reduction in the fatty acid content after cooking was also observed in fish^{24,37} and crab.³⁸

According to Maulvault et al.³⁸, the reduction in PUFAs during heat processing occurs due to their great susceptibility to oxidation at high temperatures. Although less frequent, a decrease in the SFA content can also occur during cooking.²⁴ The loss of PUFAs occurs mainly due to lipid oxidation and can be accelerated both by an increase in temperature and by the addition of salt (NaCl).³⁹ The main contribution of the increase in temperature to fatty acid oxidation is due to the increase in reaction rate⁴⁰. The pro-oxidant effect of NaCl is attributed to an increase in the non-heme iron content in meats after cooking⁴¹, although this increase is due mainly to the liquid retention capacity of the NaCl, since when cooked without salt, the non-heme iron is carried out due to liquid loss.⁴² Another pro-oxidant mechanism of the NaCl is due to the reduction in activity of the antioxidant enzymes.⁴³

ARA, EPA and DHA are fatty acids of great importance to human health and can be generated metabolically from essential fatty acids (linoleic and linolenic), although the conversion rate is very low, indicating the need for exogenous sources of these lipids.^{44,45} Thus the processing of shrimp negatively affected the nutritional value since it reduced the contents of these fatty acids in up to 29% for ARA, 23% for EPA and 16% for DHA.

Comparing the lipids of salted shrimp with those of salted, dried shrimp, there was no difference between them for any fatty acid simultaneously in both batches, indicating that the drying process did not significantly affected the lipids. In general these results are in agreement with those of Ortiz et al.⁴⁶, who observed that drying at 60 °C had little influence on the fish lipid profile generating low oxidation indices.

Effect of processing on shrimp VLOPs. The two batches of fresh shrimp showed the same VLOP composition (Table 5), differing only with respect to 2-octen-1-ol. The only aldehydes with quantifiable contents in the fresh shrimp were nonanal and decanal. The main VLOP produced during processing was hexanal, as also verified by Shahidi and Pegg¹⁷. The salting process caused an increase in all the aldehydes as compared to the fresh shrimp, in addition to a reduction in 1-octanol and 2-octen-1-ol in both batches as well as the contents of 1-pentanol and 2-pentylfuran in batch 1, but not in batch 2.

Drying caused an increase in hexanal and 1-penten-3-ol in both batches, plus an increase in 2-octen-1-ol just in batch 1. The formation of volatiles presented a behavior similar to the degradation of the fatty acids, where the salting process presented a greater oxidative effect than the drying process.

Table 5 – Volatile lipid oxidation products from fresh and processed shrimp obtained by HS-SPME-GC-MS

VLOP (ng.g ⁻¹)	Fresh		Salted		Salted, dried	
	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
Pentanal	ND*	ND*	7.07 ± 0.15 ^a	6.58 ± 0.40 ^a	7.37 ± 1.93 ^a	6.96 ± 0.38 ^a
Hexanal	< 0.13**	< 0.13**	10.66 ± 1.50 ^a	13.58 ± 0.60 ^{ab}	15.00 ± 0.58 ^b	19.09 ± 0.98 ^c
1-Penten-3-ol	5.45 ± 0.16 ^a	5.32 ± 0.45 ^a	4.97 ± 0.10 ^a	4.68 ± 0.16 ^a	7.03 ± 0.27 ^b	9.06 ± 0.27 ^c
Heptanal	< 0.21**	< 0.21**	3.73 ± 0.10 ^a	5.49 ± 0.13 ^b	3.82 ± 0.27 ^a	5.36 ± 0.26 ^b
2-Pentylfuran	1.45 ± 0.09 ^a	1.27 ± 0.01 ^a	1.91 ± 0.10 ^b	1.66 ± 0.08 ^{ab}	1.93 ± 0.15 ^b	2.07 ± 0.03 ^b
1-Pentanol	3.89 ± 0.01 ^a	4.46 ± 0.09 ^a	12.23 ± 0.08 ^b	8.12 ± 0.49 ^{ab}	9.32 ± 2.39 ^b	10.38 ± 1.16 ^{ab}
Octanal	< 0.36**	< 0.36**	3.65 ± 0.13 ^a	5.01 ± 0.24 ^b	3.63 ± 0.16 ^a	4.47 ± 0.16 ^b
1-Hexanol	3.98 ± 0.07 ^a	3.69 ± 0.02 ^a	3.80 ± 0.01 ^a	4.40 ± 0.20 ^{bc}	3.24 ± 0.09 ^c	3.88 ± 0.07 ^a
Nonanal	2.15 ± 0.11 ^a	1.97 ± 0.24 ^a	11.52 ± 0.07 ^b	16.57 ± 0.46 ^c	10.36 ± 0.49 ^b	17.02 ± 0.59 ^c
1-Octen-3-ol	3.55 ± 0.11 ^a	4.40 ± 0.21 ^{ab}	5.46 ± 0.08 ^{cd}	4.60 ± 0.35 ^{bc}	5.36 ± 0.48 ^{cd}	6.21 ± 0.04 ^d
1-Heptanol	2.01 ± 0.13 ^a	1.72 ± 0.03 ^{ab}	1.59 ± 0.01 ^b	1.87 ± 0.15 ^{ab}	1.16 ± 0.05 ^c	1.62 ± 0.04 ^b
Decanal	1.81 ± 0.08 ^a	1.57 ± 0.12 ^a	5.58 ± 0.15 ^b	7.77 ± 0.42 ^c	5.48 ± 0.11 ^b	8.73 ± 0.14 ^c
1-Octanol	6.42 ± 0.53 ^a	6.47 ± 0.32 ^a	2.56 ± 0.09 ^{bc}	3.17 ± 0.11 ^b	2.09 ± 0.13	2.71 ± 0.05 ^{bc}
2-Octen-1-ol	1.83 ± 0.08 ^a	2.34 ± 0.09 ^b	1.29 ± 0.01 ^c	1.27 ± 0.03 ^c	1.30 ± 0.01 ^c	1.59 ± 0.03 ^d

Values expressed as the mean ± standard deviation (n=3). Different letters in the same line indicate significant difference between the values (P < 0.05). *ND – not detected (below the detection limits, 0.04 ng.g⁻¹); **below the quantification limit.

Of the VLOPs found in shrimp, only 1-penten-3-ol originated from the oxidation of n-3 fatty acids, pentanal, hexanal, 1-pentanol, 2-pentylfuran, 1-hexanol, 1-octen-3-ol and 2-octen-1-ol being formed as from n-6 fatty acids. Heptanal can be formed from both n-6 and n-9 fatty acids and the other VLOPs are formed from n-9 fatty acids.²⁶⁻²⁸

Despite a significant increase, 1-penten-3-ol was below its threshold, and hence the oxidation of n-3 fatty acids, despite forming VLOPs, was not sufficient to alter the sensory properties of the shrimp. However, the formation of hexanal, 1-octen-3-ol, octanal, nonanal and decanal could have a negative impact on the aroma of the final product, since the contents of these compounds were above their respective thresholds.³⁶ Thus the oxidation of n-6 fatty acids showed a greater influence on the sensory quality of the shrimp than the oxidation of n-3 fatty acids.

In conclusion the type of fiber, sample preparation mode and the time/ temperature binomial during extraction all presented an influence on the extraction by HS-SPME. The best conditions to extract VLOPs from shrimp by HS-SPME consisted of homogenizing 1 g of sample in 3 mL of water using an ultra-turrax, and extracting the volatiles at 40 °C for 30 min with the fiber DVB/CAR/PDMS. This method was quick and practical and showed good repeatability, sensitivity and efficiency. Heat processing, and mainly the salting process, caused a reduction in the content of fatty acids of the shrimp, especially in ARA, DHA and EPA, as well as forming some VLOPs above their threshold values, showing an impact on the nutritional and sensory characteristics of the final product.

AUTHOR INFORMATION

Funding

This research was supported by FAPESP (State of São Paulo Research Foundation – Grant # 09/54119-3) and to CNPq (Brazilian National research Council).

Notes

The authors declare no competing financial.

REFERENCES

- (1) FAO - Food and Agriculture Organization of The United Nations. Overview: major trends and issues. Fisheries and Aquaculture Department. ftp://ftp/fao.org/FI/STAT/summary/YB_Overview.pdf (29 mar 2013).
- (2) Chandrasekaran, M., Methods for preprocessing and freezing of shrimps - a critical-evaluation. *J. Food Sci. Tech. Mys.* **1994**, *31*, 441-452.
- (3) Kraemer, F. B.; Stussi, J. S. P.; Santos, N. N.; Sgarbi, D. B. D. G.; Clemente, S. C. D. S., Chemical-physical control in dried-salted shrimp

comercialized in Rio de Janeiro State. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* **2001**, 8, 3.

(4) Barbosa-Canovas, G.; Ibarz, A., *Unit operation in food engineering*. CRC Press: Boca Raton, 2002; p 572-623.

(5) Akoh, C. C.; Min, D. B., *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. Dekker: New York, 2002.

(6) Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D. B., Total lipid, cholesterol, and fatty acids of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and wild marine shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). *J. Food Compos. Anal.* **2001**, 14, 359-369.

(7) Luzia, L. A.; Sampaio, G. R.; Castellucci, C. M. N.; Torres, E. A. F. S., The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chem.* **2003**, 83, 93-97.

(8) Simon, S. J. G. B.; Sancho, R. A. S.; Lima, F. A.; Cabral, C. C. V. Q.; Souza, T. M.; Bragagnolo, N.; Lira, G. M., Interaction between soybean oil and the lipid fraction of fried pitu prawn. *Lwt-Food Sci. Technol.* **2012**, 48, 120-126.

(9) Kamal-Eldin, A.; Pokorný, J., Lipid oxidation products and methods used for their analysis. In *Analysis of Lipid Oxidation*, Kamal-Eldin, A.; Pokorný, J., Eds. AOCS Press: Champaign, 2005; pp 7-14.

(10) Iglesias, J.; Medina, I., Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1192, 9-16.

(11) Mariutti, L. R. B.; Nogueira, G. C.; Bragagnolo, N., Solid phase microextraction - gas chromatography for the evaluation of secondary lipid oxidation products in chicken patties during long-term storage. *J. Brazil. Chem. Soc.* **2009**, 20, 1849-1855.

(12) Wu, T. C.; Sheldon, B. W., Flavor components and factors associated with the development of off-flavors in cooked turkey rolls. *J. Food Sci.* **1988**, 53, 49-54.

(13) Wardencki, W.; Michulec, M.; Curylo, J., A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2004**, 39, 703-717.

(14) Arthur, C. L.; Pawliszyn, J., Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145-2148.

- (15) Roberts, D. D.; Pollien, P.; Milo, C., Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *J Agr Food Chem* **2000**, *48*, 2430-2437.
- (16) Zhang, Z. Y.; Pawliszyn, J., Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1843-1852.
- (17) Shahidi, F.; Pegg, R. B., Hexanal as an indicator of the flavor deterioration of meat and meat-products. *Acs Sym. Ser.* **1994**, *558*, 256-279.
- (18) Vandendool, H.; Kratz, P. D., A Generalization of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **1963**, *11*, 463-&.
- (19) Acree, H.; Arn, T. Cornell University, USA, Flavornet and human odor space. <http://www.flavornet.org> (24 aug 2013),
- (20) El-Sayed, A. M. The pherobase: database of insect pheromones and semiochemicals. <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php> (24 aug 2013),
- (21) Garruti, D. S.; Franco, M. R. B.; Aparecida, M.; da Silva, A. P.; Janzantti, N. S.; Alves, G. L., Assessment of aroma impact compounds in a cashew apple-based alcoholic beverage by GGMS and GC-olfactometry. *Lwt-Food Sci. Technol.* **2006**, *39*, 373-378.
- (22) Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. H. S., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497-509.
- (23) Joseph, J. D.; Ackman, R. G., Capillary column gas-chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl-esters - collaborative study. *J. AOAC Int.* **1992**, *75*, 488-506.
- (24) Sancho, R. A. S.; de Lima, F. A.; Costa, G. G.; Mariutti, L. R. B.; Bragagnolo, N., Effect of annatto seed and coriander leaves as natural antioxidants in fish meatballs during frozen storage. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C838-C845.
- (25) AOAC, *Offical methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemistry: Washington, 1997.
- (26) Genot, C.; Meynier, A.; Riaublanc, A., Lipid oxidation in emulsions. In *Lipid Oxidation*, Kamal-Eldin, A., Ed. AOCS Press: Champaign, 2003; pp 190-244.
- (27) Choe, E.; Min, D. B., Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **2006**, *5*, 169-186.

- (28) Volden, J.; Bjelanovic, M.; Vogt, G.; Slinde, E.; Skaugen, M.; Nordvi, B.; Egelanddal, B., Oxidation progress in an emulsion made from metmyoglobin and different triacylglycerols. *Food Chem.* **2011**, *128*, 854-863.
- (29) Whitfield, F. B.; Freeman, D. J.; Last, J. H.; Bannister, P. A.; Kennett, B. H., Oct-1-en-3-ol and (5z)-octa-1,5-dien-3-ol, compounds important in the flavor of prawns and sand-lobsters. *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 373-383.
- (30) Cadwallader, K. R.; Tan, Q.; Chen, F.; Meyers, S. P., Evaluation of the aroma of cooked spiny lobster tail meat by aroma extract dilution analysis. *J. Agr. Food Chem.* **1995**, *43*, 2432-2437.
- (31) Lu, F.; Zhang, J. Y.; Liu, S. L.; Wang, Y.; Ding, Y. T., Chemical, microbiological and sensory changes of dried *Acetes chinensis* during accelerated storage. *Food Chem.* **2011**, *127*, 159-168.
- (32) Garcia-Esteban, M.; Ansorena, D.; Astiasarán, I.; Ruiz, J., Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta* **2004**, *64*, 458-466.
- (33) Gianelli, M. P.; Flores, M.; Toldrá, F., Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham. *J. Sci. Food Agr.* **2002**, *82*, 1703-1709.
- (34) Ruiz, J.; Cava, R.; Ventanas, J.; Jensen, M. T., Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: Dry-cured Iberian ham. *J. Agr. Food Chem.* **1998**, *46*, 4688-4694.
- (35) Fratini, G.; Lois, S.; Pazos, M.; Parisi, G.; Medina, I., Volatile profile of Atlantic shellfish species by HS-SPME GC/MS. *Food Res. Int.* **2012**, *48*, 856-865.
- (36) Buttery, R. G.; Turnbaugh, J. G.; Ling, L. C., Contribution of volatiles to rice aroma. *J. Agr. Food Chem.* **1988**, *36*, 1006-1009.
- (37) Yagiz, Y.; Kristinsson, H. G.; Balaban, M. O.; Welt, B. A.; Ralat, M.; Marshall, M. R., Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. *Food Chem.* **2009**, *116*, 828-835.
- (38) Maulvault, A. L.; Anacleto, P.; Lourenço, H. M.; Carvalho, M. L.; Nunes, M. L.; Marques, A., Nutritional quality and safety of cooked edible crab (*Cancer pagurus*). *Food Chem.* **2012**, *133*, 277-283.

- (39) Jin, G. F.; He, L. C.; Zhang, J. H.; Yu, X.; Wang, J. M.; Huang, F., Effects of temperature and NaCl percentage on lipid oxidation in pork muscle and exploration of the controlling method using response surface methodology (RSM). *Food Chem.* **2012**, *131*, 817-825.
- (40) Tan, C. P.; Man, Y. B. C.; Selamat, J.; Yusoff, M. S. A., Application of arrhenius kinetics to evaluate oxidative stability in vegetable oils by isothermal differential scanning calorimetry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, *78*, 1133-1138.
- (41) Ahn, D. U.; Wolfe, F. H.; Sim, J. S., 3 methods for determining nonheme iron in turkey meat. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 288-291.
- (42) Kristensen, L.; Purslow, P. P., The effect of processing temperature and addition of mono- and di-valent salts on the heme- nonheme-iron ratio in meat. *Food Chem.* **2001**, *73*, 433-439.
- (43) Lee, S. K.; Mei, L.; Decker, E. A., Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. *Meat Sci.* **1997**, *46*, 349-355.
- (44) Salem, N.; Pawlosky, R.; Wegher, B.; Hibbeln, J., In vivo conversion of linoleic acid to arachidonic acid in human adults. *Prostag. Leukotr. Ess.* **1999**, *60*, 407-410.
- (45) Brenna, J. T.; Salem, N.; Sinclair, A. J.; Cunnane, S. C.; Issfal, Alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostag. Leukotr. Ess.* **2009**, *80*, 85-91.
- (46) Ortiz, J.; Lemus-Mondaca, R.; Vega-Gálvez, A.; Ah-Hen, K.; Puente-Diaz, L.; Zura-Bravo, L.; Aubourg, S., Influence of air-drying temperature on drying kinetics, colour, firmness and biochemical characteristics of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. *Food Chem.* **2013**, *139*, 162-169.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1 – Compounds obtained from salted, dried shrimp by HS-SPME-GC-MS using four fibers.

Compound	RT ^a (min)	RI ^b	Identification method	Fiber
Trimethylamine	1.61	616	MS + RI ^c	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA
Ethyl acetate	3.31	778	MS ^d	CAR/PDMS
2-methylbutanal	3.72	844	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS
Pentanal	5.35	962	Standard ^e	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
1-Vinylaziridine	5.87	986	MS	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS
Decane	6.10	997	MS + RI	DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
Toluene	6.82	1026	MS + RI	CAR/PDMS
2,3-Pentanedione	7.55	1054	MS + RI	CAR/PDMS
1,2-Dimethyldisulfane	7.65	1058	MS + RI	CAR/PDMS
Hexanal	7.93	1069	Standard	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Ethylbenzene	8.73	1101	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
2-Ethyl-1-decanol	8.95	1113	MS	PDMS/DVB
1,4 Dimethylbenzene	9.04	1117	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
4-Methyl-2-propyl-1-pentanol	9.21	1126	MS	PDMS/DVB
2,5-Dimethyl-2-undecene	9.42	1137	MS	PDMS/DVB
1-butanol	9.47	1140	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS
1-Penten-3-ol	9.77	1156	Standard	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Heptanal	10.02	1169	Standard	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
4-Isopropenyl-1-methylcyclohexene	10.10	1173	MS + RI	CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
5-Methyleneundecane	10.42	1190	MS	PDMS/DVB
Dodecane	10.61	1200	MS + RI	DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
3-methyl-1-butanol	10.62	1200	MS + RI	CAR/PDMS
Methanesulfonyl chloride	10.71	1206	MS	PA
2-Pentylfuran	10.84	1214	Standard	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Cyclododecane	11.05	1226	MS + RI	DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
4-heptenal	11.11	1230	MS + RI	DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
(3E)-3-Tetradecene	11.21	1236	MS	DVB/CAR/PDMS
Thiazole	11.23	1237	MS + RI	CAR/PDMS
Styrene	11.29	1241	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
1-Pentanol	11.34	1243	Standard	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2-Methylpyrazine	11.50	1253	MS	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS
1,2,3-Trimethylbenzene	11.65	1262	MS + RI	PDMS/DVB
Isobutylcyclohexane	11.70	1265	MS	PDMS/DVB
Octanal	11.78	1270	Standard	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
3-hydroxybutan-2-one	11.81	1272	MS + RI	CAR/PDMS; PDMS/DVB
1-Hydroxyacetone	12.14	1291	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB

Table S1. Continuation

2-Methyl-1-decanol	12.24	1298	MS	PDMS/DVB
Cyclopentanol	12.31	1302	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2,5-Dimethylpyrazine	12.40	1308	MS + RI	PDMS/DVB
Vinyl hexanoate	12.46	1312	MS + RI	DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
2,6-Dimethylpyrazine	12.51	1315	MS + RI	CAR/PDMS; PDMS/DVB
2-Acetyl-1-pyrroline	12.66	1325	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
1-Hexanol	12.89	1341	Standard	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
2-Hexyl-1-decanol	13.02	1350	MS	PDMS/DVB
1,2,4,5-Tetramethylbenzene	13.09	1354	MS	PDMS/DVB
1,3-Dimethyltrisulfane	13.28	1367	MS + RI	CAR/PDMS
2-ethyl-6-methylpyrazine	13.38	1374	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Nonanal	13.42	1376	Standard	PDMS/DVB
2-Nonanone	13.43	1377	MS + RI	DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
Tetradecane	13.54	1384	MS + RI	PA CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2,3,5-Trimethylpyrazine	13.65	1392	MS + RI	PDMS/DVB
5-Methylenetriodecane	13.77	1400	MS	DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
2,6-Dimethyl-1,7-octadiene-3,6-diol	14.05	1419	MS	DVB/CAR/PDMS
Tetradecane	14.24	1431	MS + RI	PA
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	14.31	1436	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB
Acetic acid	14.33	1437	MS + RI	PA CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
1-Octen-3-ol	14.39	1441	Standard	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
1-Heptanol	14.48	1447	Standard	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2,6-Diethylpyrazine	14.59	1454	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2,6-Dimethyl-7-octen-2-ol	14.71	1463	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	14.79	1468	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
1,5-Octadien-3-ol	14.94	1478	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2-Ethyl-1-hexanol	15.00	1482	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
3,5-Diethyl-2-methylpyrazine	15.07	1486	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Decanal	15.07	1487	Standard	PDMS/DVB
Pentadecane	15.14	1491	MS + RI	PA
Pyrrrole	15.31	1505	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Benzaldehyde	15.37	1511	MS + RI	PDMS/DVB
2-Allyl-3-methylpyrazine	15.58	1532	MS	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2,6-Dimethyl-2,7-octadien-6-ol	15.65	1540	MS + RI	PDMS/DVB
1-Pentadecene	15.69	1544	MS + RI	DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
1-Octanol	15.75	1551	Standard	PDMS/DVB
3,5-Octadien-2-one	15.86	1562	MS + RI	PA
2-Undecanone	16.11	1589	MS + RI	DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Undecanal	16.19	1597	MS + RI	PDMS/DVB

Table S1. Continuation

2-Octen-1-ol	16.26	1606	Standard	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	16.27	1608	MS + RI	PDMS/DVB
Dihydro-2(3H)-furanone	16.34	1618	MS + RI	CAR/PDMS; PA
1-Phenylethanone	16.53	1645	MS + RI	PA CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
3-Methylbutanoic acid	16.63	1659	MS + RI	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2-Cycloocten-1-ol	16.74	1675	MS	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
4-Butoxy-1-butanol	16.83	1688	MS	PA
Pentanoic acid	16.90	1698	MS + RI	CAR/PDMS; PDMS/DVB
Dodecanal	16.94	1703	MS + RI	PA; PDMS/DVB
1,1'-Bi(cyclopentyl)-1-ol	17.03	1710	MS	PDMS/DVB
Methyl N-hydroxybenzenecarboximidate	17.13	1719	MS	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
1,2-Cyclopentanedione	17.25	1730	MS	PA; PDMS/DVB
Tridecanedial	17.53	1757	MS	PA
3-Dodecyne	17.62	1765	MS	PA
6,10-Dimethyl-5,9-undecadien-2-one	17.75	1776	MS	CAR/PDMS; PDMS/DVB
1-Methylnaphthalene	17.78	1779	MS	DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Phenylmethanol	17.85	1785	MS	CAR/PDMS
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	17.89	1788	MS	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS
1,4-Butanediol	18.03	1901	MS	CAR/PDMS; PA
2-Acetyl-1H-pyrrole	18.40	1966	MS	CAR/PDMS
2-Pentadecanone	18.73	2018	MS + RI	DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Cyclododecanol	18.79	2027	MS	PA
2-Tetradecyloxirane	18.79	2027	MS	PDMS/DVB CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Palmitaldehyde	19.55	2132	MS + RI	PDMS/DVB
Nonanoic acid	19.69	2148	MS + RI	PA
1-Tetradecanol	19.79	2160	MS + RI	PA
2-Methyl-3-hexanol	19.89	2172	MS	PDMS/DVB
4-Octadecylmorpholine	19.94	2177	MS	DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
o-Aminoacetophenone	20.30	2216	MS + RI	DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2-Heptadecyloxirane	20.45	2230	MS	CAR/PDMS
1,1-Dibutoxybutane	20.70	2253	MS	PA; PDMS/DVB
(6Z,9Z)-6,9-Pentadecadien-1-ol	20.91	2272	MS	PA; PDMS/DVB
4-Hydroxybutyl acrylate	21.14	2293	MS	PA CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
Heptadecanal	21.26	2302	MS	PDMS/DVB
1-Pentadecanol	21.46	2317	MS	PDMS/DVB
5-Formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonitrile	21.58	2325	MS	PA; PDMS/DVB
1,1'-(1,2-Cyclobutanediyl)dibenzene	21.85	2344	MS	PDMS/DVB
1,1'-(3,3-Dimethyl-1-butene-1,1-diyl)dibenzene	21.96	2351	MS	PA
Methyl 2-hydroxypentanoate	22.41	2382	MS	PA; PDMS/DVB

Table S1. Continuation

Benzophenone	22.58	2393	MS	PA
Ethyl-9,12-octadecadienoate	23.05	> 2400	MS	PA
Diisobutyl phthalate	23.15	> 2400	MS	DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
1-Octadecanol	23.67	> 2400	MS	PA; PDMS/DVB CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
2-Methyl-3-hexanol	24.02	> 2400	MS	PDMS/DVB
Stearic acid	26.63	> 2400	MS	PA
4-Octadecylmorpholine	28.00	> 2400	MS	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB
1,4-Dibutoxybutane	28.21	> 2400	MS	PA
Pentadecanoic acid	28.97	> 2400	MS	CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS; PA; PDMS/DVB

^aRT – retention time; ^bRI – retention index; ^cMS+RI – identified by comparison of the fragment with the library (Wiley9) and by the retention index as compared with the literature; ^dMS – tentatively identified compound; ^eStandard – identity confirmed with the standard.

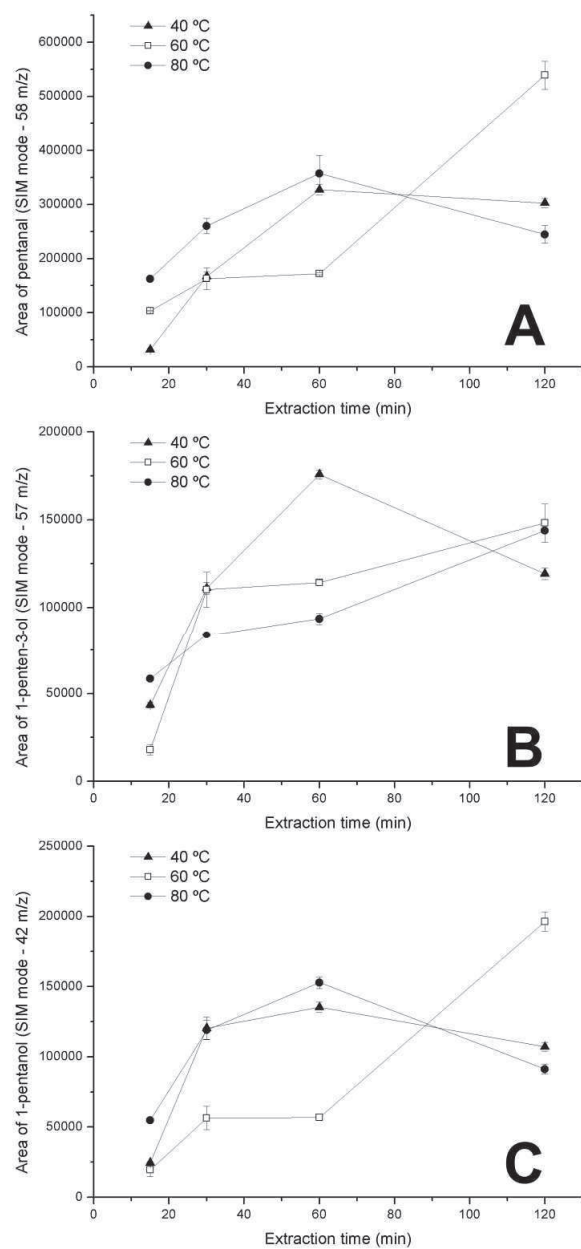


Figure S2: Effect of time and temperature on (A) extraction of pentanal, (B) 1-penten-3-ol and (C) 1-pentanol from salted, dried shrimp with the fiber DVB/CAR/PDMS. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

CAPÍTULO III

SAPONIFICAÇÃO DIRETA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL

Hugo A. L. Souza, Lilian R. B. Mariutti, Neura Bragagnolo*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 13083-862, São Paulo, Brasil

*A quem a correspondência deve ser endereçada. Telefone: +55-19-3521-2162. Fax: +55-19-3521-2153. E-mail: neurabragagnolo@gmail.com.

Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido pela primeira vez um método de saponificação direta assistida por micro-ondas (DMAS) para a extração simultânea de colesterol e óxidos de colesterol e quantificação por GC-MS. Através de um planejamento experimental foram determinadas como condições ótimas de DMAS: 500 mg de amostra, 20 mL de solução etanólica de KOH (1 mol/L), temperatura a 45 °C, por 16 min, com potência máxima fixada em 200 W e agitação magnética de 120 rpm. O método desenvolvido possibilitou maior extração de óxidos de colesterol, além de uma acentuada redução no tempo de saponificação em relação ao método convencional (75 vezes), com baixos limites de detecção ($\leq 0,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e de quantificação ($\leq 1,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$), boa precisão ($\leq 10,50\%$ intradia e $\leq 8,56\%$ interdia) e boa eficiência de extração ($\geq 87,67\%$). O método foi aplicado com sucesso em 3 tipos de amostra, com diferentes teores de umidade (camarão fresco, salgado e salgado e seco). Após a salga se observou um aumento significativo nos óxidos de colesterol, os quais sofreram redução após a etapa de secagem.

Palavras-chave: óxidos de colesterol, saponificação direta, camarão cinza, *Litopenaeus vannamei*.

INTRODUÇÃO

O colesterol é um lipídio da classe dos esteróis de grande importância para o metabolismo animal, uma vez que é precursor de ácidos biliares, hormônios e da pró-vitamina D, além de ser responsável pela fluidez das membranas celulares (Nelson e Cox, 2005). No entanto, quando o colesterol é exposto a radiação, calor ou espécies reativas de oxigênio pode se oxidar formando os produtos de oxidação do colesterol (COPs) (Osada et al., 1993; Lercker e Rodriguez-Estrada, 2002; Bragagnolo, 2009).

Vários estudos indicam que os COPs apresentam atividade citotóxica, aterogênica, mutagênica e carcinogênica. Além disso, sabe-se que até 90% dos COPs ingeridos podem ser absorvidos, podendo acumular-se nos tecidos animais, porém, ainda não foram definidos níveis seguros para ingestão destes compostos (Bascoul et al., 1986; Guardiola et al. 1996; Otaegui-Arrazola et al., 2010; Vicente et al., 2012). Geralmente, baixos níveis de COPs são encontrados em alimentos frescos, contudo, o armazenamento e o processamento dos alimentos podem elevar os níveis de COPs chegando até 23% em relação ao teor de colesterol total (Soto-Rodríguez et al., 2008; Bartosz e Kolakowzka, 2011). O teor de COPs formados em um alimento durante o processamento varia de acordo com a composição deste, sendo maior nos alimentos de origem marinha processados devido ao seu alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) (Osada et al., 1993; Ansorena et al., 2013).

O camarão é um alimento que apresenta alto teor de colesterol (114 – 139 mg/100g, Bragagnolo e Rodriguez-Amaya, 2001) e PUFAs (39 – 40 mg/g de óleo, Souza e Bragagnolo, 2014), assim, altos níveis de COPs podem ser encontrados no camarão salgado e seco (Sampaio et al., 2006; Soto-Rodríguez et al., 2008). Durante o processo de obtenção deste produto, principalmente na etapa de salga, ocorre a oxidação dos PUFAs (Souza e Bragagnolo, 2014). Os radicais formados durante a oxidação dos PUFAs podem acelerar a oxidação do colesterol (COPs) (Osada et al, 1993). O teor de COPs encontrados em camarão salgado e seco pode variar de níveis não detectáveis a 254 µg/g (Sampaio et al., 2006; Soto-Rodríguez et al., 2008).

Para a determinação de colesterol e COPs em alimentos é necessário saponificar a fração destes compostos que se encontra na forma de ésteres. As análises de colesterol e COPs podem ser realizadas de duas maneiras: na primeira, os lipídios são extraídos da amostra com uma mistura de solventes, saponificados e em seguida a matéria insaponificável é extraída com solventes orgânicos; na segunda, os lipídios são saponificados diretamente na amostra e, então, a matéria insaponificável é extraída com solventes orgânicos. Estudos têm mostrado que a saponificação direta apresenta maior eficiência, melhor precisão e menor formação de artefatos (Ulberth e Buchgraber, 2002; Bragagnolo, 2009).

Técnicas modernas de extração são utilizadas visando reduzir o tempo de análise, economia de solvente e maior rendimento de extração, entre elas pode-se destacar o uso das micro-ondas, por sua alta eficiência de transferência de energia (Hayes, 2002; Chan et al., 2011; Leonelli et al., 2013). Um método de saponificação direta assistida por micro-ondas (DMAS) para a determinação de colesterol foi desenvolvido por Piñeiro-Avila et al. (1995) com boa recuperação (

98,7 %) e boa repetibilidade (3,5 % de desvio médio relativo interdia). No entanto, neste método utiliza-se um micro-ondas doméstico trabalhando em potência elevada (~350 W), que sem o controle da temperatura, pode levar a formação de COPs como artefatos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método rápido de DMAS para a extração simultânea de colesterol e COPs e avaliar a aplicação deste método em amostras de camarão com diferentes teores de umidade (camarão fresco, salgado e sagado e seco).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os padrões utilizados para identificar e quantificar colesterol e COPs foram colesterol, 5 α -colestano (padrão interno), 5,6 α -epoxicolesterol (α -EP), 5,6 β -epoxicolesterol (β -EP), 7-cetocolesterol (7-ceto), 20 α -hidroxicolesterol (20 α -OH), 25-hidroxicolesterol (25-OH), colestanoetriol (triol) da Sigma Aldrich (St. Louis, MO) e 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH) e 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OH) da Steraloids (Newport, R.I., U.S.A.) Para a validação do método, além dos padrões supracitados, foram utilizados oleato de colesterol (C-oleato) e colesterol-2,2,3,4,4,6-D₆ (Colesterol-D₆) da Sigma (Pureza - 95 a 99%).

A série de alcanos (C₁₀-C₄₀ – de cadeia par) utilizada para o cálculo do índice de retenção foi obtida da Fluka (Darmstadt, Alemanha).

A reação de silanização do colesterol e COPs foi realizada com uma mistura de N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida e trimetilclorosilano (BSTFA e TMCS) na proporção de 99:1 e piridina anidra (99,8 %, Sigma).

Foram utilizados reagentes e solventes de grau analítico (Synth, Diadema, Brasil) e grau HPLC (Fisher, Fair Lawn, NJ).

Amostras

Camarões frescos e inteiros (com cabeça e casca) da espécie *Litopenaeus vannamei* (camarão cinza) foram adquiridos no mercado local do município de Campinas (São Paulo, Brasil).

Os camarões frescos (1 kg) foram submetidos a salga em salmoura fervente (30% NaCl por 10 min) e secos em estufa com circulação de ar a 60 °C por 4 h. Em seguida, o camarão salgado e seco foi descascado e triturado. Para cada etapa da otimização um novo lote foi adquirido e processado. Todos os ensaios do planejamento experimental foram realizados com o mesmo lote, o qual foi armazenado em ultra freezer (-80 °C) até o momento das análises.

Métodos

Otimização da saponificação direta assistida por micro-ondas

O desenvolvimento do método foi realizado através de um planejamento experimental com delineamento composto central rotacional seguido por uma cinética de saponificação na melhor condição obtida no planejamento. A saponificação foi realizada em 500 mg de amostra em um extrator por micro-ondas Milestone (Start-E, Sorisole, Itália) utilizando tubo de teflon de 50 mL, com agitação magnética a 120 rpm. O aquecimento da amostra ocorreu através de uma rampa de 1 min com potência máxima de 200 W até a temperatura desejada, a qual foi mantida por 16 minutos (1 min para a rampa de aquecimento e 15 min de temperatura constante). Em seguida, o tubo foi resfriado em banho de gelo por 30 segundos.

Planejamento experimental

A otimização da DMAS foi realizada através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) com 2 níveis e 3 fatores (2^3) (Tabela 1), constituído por 8 ensaios fatoriais, 3 ensaios no ponto central e 6 ensaios axiais, totalizando 17 ensaios. Os ensaios foram aleatorizados e independentes e as variáveis resposta foram o teor de colesterol e COPs.

Tabela 1 – Variáveis independentes reais e codificadas e seus respectivos níveis.

Variáveis independentes		Níveis				
Real	Codificada	-1,68	-1	0	1	1,68
Concentração de KOH (mol/L) ^a	X ₁	0,5	0,7	1,0	1,3	1,5
Volume da solução de KOH (mL) ^a	X ₂	10	14	20	26	30
Temperatura (°C)	X ₃	35	39	45	51	55

^a Solução etanólica.

Cinética de saponificação

As condições ótimas obtidas através do DCCR foram utilizadas para realização da cinética de saponificação em triplicata nos tempos 6, 16, 31 e 61 min, tendo como controle os resultados obtidos utilizando o método de saponificação direta a frio (método convencional) descrito por Mariutti et al. (2008). Uma amostra não saponificada também foi extraída e analisada.

Extração, derivatização e análise do colesterol e COPs por GC-MS

Após a saponificação, o extrato foi transferido para um tubo de ensaio com auxílio de 15 mL de água destilada sendo o colesterol e os COPs extraídos com

10 mL de hexano por 4 vezes. Os extratos foram combinados, lavados uma vez com uma solução aquosa de KOH (0,5 mol/L) e duas vezes com água destilada, então filtrados em sulfato de sódio anidro e evaporados em rota-evaporador a 40 °C, conforme descrito por Mariutti et al. (2008).

O extrato seco foi ressuspendido em 400 µL de piridina anidra e 400 µL de solução de derivatização (BSTFA e TMCS) e aquecidas a 60 °C por 1 h em bloco aquecedor (Dry Block, Marconi, Piracicaba, Brasil) para derivatização de acordo com Ubhayasekera et al. (2004). Após a reação, o extrato foi seco sob fluxo de N₂ e ressuspendido em hexano, filtrado em membrana de 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA, USA) e 1 µL de extrato foi injetado no cromatógrafo gasoso.

A análise cromatográfica foi realizada em um GC-MS (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com injetor splitless a 250°C, coluna capilar (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura de fase estacionária – 5% fenil; 95% metilsiloxano) modelo RTX-5ms (Restek, Bellefonte, PA, USA); workstation (GCMSSolution, Shimadzu, Kyoto, Japan); fonte de íons de ionização por elétrons (EI) em 70 eV a 250 °C, com corte de solvente em 2 min. O analisador de massa/carga (*m/z*) foi um quadruplo operando em modo SCAN (50-600 *m/z*) para a identificação dos compostos e em modo SIM para quantificação. O He foi utilizado como gás de arraste no modo de controle de fluxo linear com fluxo da coluna constante a 1,3 mL/min. A programação de temperatura foi realizada de acordo com Ubhayasekera et al. (2004). A identificação do colesterol e COPs foi realizada através de comparação do tempo de retenção, índice de retenção e do espectro de massas com os de padrões analíticos silanizados. O índice de retenção foi calculado de acordo com Vandendool e Kratz (1963). A quantificação foi realizada através de curvas analíticas dos respectivos padrões, utilizando o 5 α -colestano

como padrão interno, no modo SIM utilizando os fragmentos que apresentaram melhor relação sinal/ruído para cada composto (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros dos padrões utilizados para quantificação do colesterol e COPs.

Pico	Composto	TR ^a (min)	IR ^b	Fragmento alvo (m/z)	Íons de referência (m/z)
PI ^c	5 α -colestano	11,27	2947	357	372; 217
1	7 α -hidroxicolesterol	14,23	3172	456	546; 233
2	Colesterol	14,93	3214	129	458; 329
3	7 β -hidroxicolesterol	16,45	3293	456	546; 233
4	5,6 β -epoxicolesterol	17,27	3330	474	384; 96
5	5,6 α -epoxicolesterol	17,68	3348	474	384; 96
6	20 α -hidroxicolesterol	18,47	3382	201	461; 117
7	Colestanotriol	19,66	3431	403	546; 456
8	25-hidroxicolesterol	20,88	3478	131	456; 271
9	7-cetocolesterol	21,13	3488	472	367; 129

^aTR = tempo de retenção. ^bIR = índice de retenção. ^cPI = padrão interno.

Validação

O método otimizado de DMAS foi submetido à validação pelos seguintes critérios: limites de detecção e quantificação, recuperação, repetibilidade intra-dia e inter-dia e formação de artefatos.

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos de acordo com as recomendações do ICH (2005).

A recuperação foi avaliada através da adição de padrões em dois níveis na amostra de camarão salgado e seco. Para o colesterol foi realizada a adição de Coleato nas concentrações de 1,68 e 3,37mg (equivalente a 1 e 2 mg de colesterol, respectivamente) e a para os óxidos foram adicionadas as concentrações de 5 e

25 µg. O resultado da recuperação foi subtraído da concentração média (n=3) dos respectivos compostos na amostra de camarão salgado e seco sem adição de padrão.

A repetibilidade foi avaliada através do desvio padrão relativo (% RSD) para análises no mesmo dia (repetibilidade intra-dia, n=3) e análises em 3 dias diferentes (repetibilidade inter-dia, n=9).

Para avaliar a formação de artefatos na etapa de saponificação foram sintetizados COPs a partir da oxidação do colesterol-D6 a 140 °C por 1h sob fluxo de oxigênio, de acordo com Nogueira et al. (2010), para identificar a fragmentação e as características cromatográficas dos óxidos de colesterol-D6 (material suplementar). A avaliação da formação de artefatos no método foi realizada por meio da adição de 1 mg de colesterol-D6 à 500 mg de amostra, após a etapa de pesagem. Foram avaliadas amostras saponificadas pelo método convencional e pelo método DMAS, em triplicata para cada método.

Efeito do processamento na formação de COPs

Para verificar os efeitos das etapas de salga e secagem foram adquiridos dois lotes de 1,5 kg de camarões frescos e inteiros, provenientes do mesmo fornecedor, com intervalo de uma semana. Cada lote foi separado em três partes (500g cada, ≈ 25 camarões), uma parte foi mantida fresca, outra foi somente salgada e a terceira foi salgada e seca. Os camarões frescos, salgados e salgado e secos foram descascados e triturados antes das análises. O teor de umidade (Tabela 3) foi realizado de acordo com o método 950.46 da AOAC (1997) e o teor de sal de acordo com o método 28/IV do Instituto Adolfo Lutz (2005).

Tabela 3 – Teores de umidade e cloreto de sódio das amostras de camarão em g/100g.

Amostra	Umidade		Cloreto de sódio	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
Fresco	79,13 ± 0,13	79,13 ± 0,15	0,28 ± 0,01	0,24 ± 0,01
Salgado	62,98 ± 0,16	62,30 ± 0,04	7,41 ± 0,06	7,51 ± 0,11
Salgado e seco	41,18 ± 0,25	45,98 ± 0,09	10,00 ± 0,03	10,64 ± 0,32

Análise estatística

A análise do planejamento experimental foi realizada com auxílio do software Statistica 12 ($p < 0,10$) (Statsoft, Tulsa, USA). A comparação das médias foi realizada através da análise de variância (ANOVA de um fator), com análise complementar de Tukey quando apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Otimização da saponificação direta assistida por micro-ondas

O método cromatográfico permitiu a separação simultânea do colesterol e dos 8 COPs identificados no camarão salgado e seco (Figura 1), entretanto, pelo fato dos teores diferirem mais de 3 unidades de grandeza (10^3), a quantificação do colesterol foi realizada através de uma segunda diluição do extrato utilizado para a análise dos COPs.

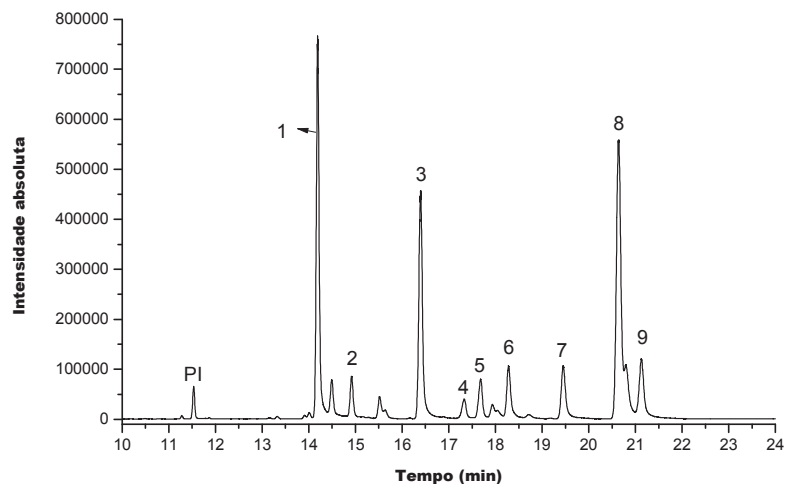


Figura 1 – Cromatograma dos padrões de trimetilsilil (TMS) colesterol e TMS-COPs por GC-MS. Os compostos foram numerados de acordo com a Tabela 2. PI = padrão interno.

Planejamento experimental

Através do planejamento experimental observou-se que a concentração e o volume da solução de KOH influenciaram de forma quadrática o teor de óxidos obtidos, e a temperatura não apresentou efeito significativo ($p > 0,10$). Todas as variáveis avaliadas influenciaram a extração de colesterol, embora o volume da solução de KOH só tenha sido significativo através da interação com a concentração da solução e com a temperatura. No entanto, não foi possível modelar o comportamento da extração de colesterol e COPs, usando modelos de primeira e de segunda ordem ($p < 0,10$). O ensaio 2 do planejamento (Tabela 4) apresentou maior extração de colesterol, enquanto o ponto central (pontos 9 a 11) apresentou maior extração de COPs totais.

Tabela 4 – Resultado do planejamento experimental.

Ensaio	Concentração de KOH (mol/L) ^a	Volume de KOH (mL) ^a	Temperatura (°C)	Colesterol (mg/g)	COPs totais (µg/g)
1	0,7	14	39	1,60	36,52
2	1,3	14	39	3,98	59,41
3	0,7	26	39	2,11	34,72
4	1,3	26	39	2,56	61,51
5	0,7	14	51	1,50	54,54
6	1,3	14	51	2,79	71,90
7	0,7	26	51	3,35	73,82
8	1,3	26	51	3,29	51,39
9	1,0	20	45	3,53	73,26
10	1,0	20	45	3,49	76,17
11	1,0	20	45	3,51	74,43
12	0,5	20	45	2,66	31,92
13	1,5	20	45	2,49	25,23
14	1,0	10	45	2,97	40,84
15	1,0	30	45	2,39	23,50
16	1,0	20	35	2,67	42,36
17	1,0	20	55	2,06	61,59

^a solução etanólica de KOH.

Como o ponto 2 não possui replicatas, não foi possível fazer a comparação direta com o ponto central, desta forma, as duas condições foram analisadas em um novo lote de camarões, em triplicata. Não houve diferença significativa entre as duas condições, porém o ponto central apresentou menor coeficiente de variação (2,05 % para o colesterol e 8,90 % para os COPs totais) que o ponto 2 (12,15 % para o colesterol e 9,60 % para os COPs totais). Assim, as condições do ponto central foram selecionadas para a realização da cinética.

Cinética de saponificação

O teor de colesterol obtido na amostra não saponificada (tempo 0, Figura 2a) foi 26,72 % menor que o obtido após a saponificação pelo método convencional e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o método convencional e o método DMAS.

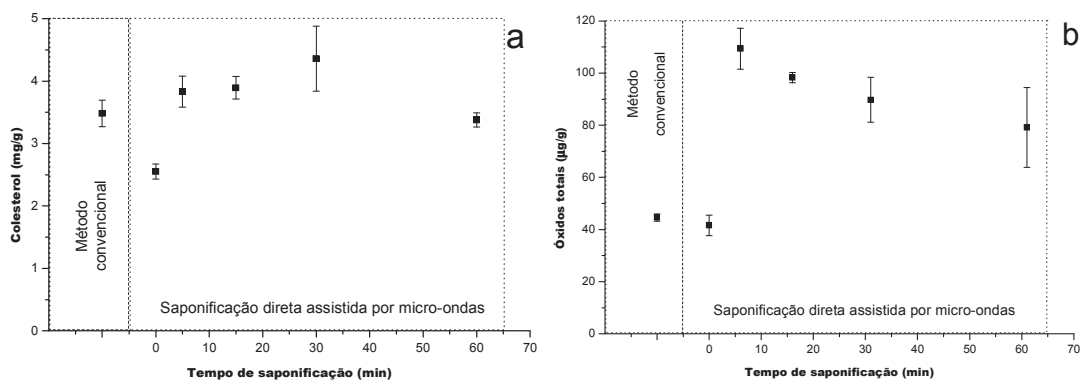


Figura 2 – Saponificação pelo método convencional e cinética de saponificação direta assistida por micro-ondas para (a) colesterol e (b) óxidos de colesterol totais. Tempo 0 = Amostra não saponificada.

O uso das DMAS aumentou significativamente a extração de COPs, em comparação à amostra não saponificada e à amostra analisada pelo método convencional (Figura 2b). Após 16 minutos de saponificação, observa-se o menor coeficiente de variação para a análise de óxidos de colesterol (2,02 %), enquanto o coeficiente de variação do colesterol se mantém baixo (4,61 %). Assim, a fim de obter-se um método com maior extração e maior precisão para a extração simultânea de colesterol e óxidos de colesterol optou-se pelo uso de 16 minutos de saponificação. O que representa uma redução de tempo de 75 vezes, quando comparado com o método convencional de Mariutti et al. (2008).

Há uma ligeira tendência, embora não significativa ($p > 0,05$), que pode indicar a redução no teor de óxidos ao longo do tempo de exposição às micro-ondas, essa tendência também foi reportada por Young (1995) e Piñeiro-Avila et al. (1998) para a extração de ergosterol e colesterol, respectivamente. Desta forma, deve-se evitar o uso das micro-ondas por longos períodos para a análise de colesterol e óxidos de colesterol.

Assim, as condições ótimas para o método de DMAS consistiu no uso de 20 mL de solução etanólica de KOH a 1,0 mol/L por 16 min (1 min para a rampa de aquecimento e 15 min de temperatura constante) a 45 °C para 500 mg de amostra.

Validação

O método otimizado de DMAS apresentou sensibilidade adequada (Tabela 5), com limites de detecção e quantificação compatíveis com os obtidos por Mariutti et al. (2008) para o método convencional, utilizando um cromatógrafo líquido com detector de ultravioleta ($\leq 0,32 \mu\text{g/g}$). Por outro lado, como esperado os limites de detecção e quantificação dos epoxicolesteróis foram menores que aqueles encontrados com o detector de índice de refração ($\leq 10,62 \mu\text{g/g}$).

Tabela 5 – Limites de detecção, quantificação, precisão e recuperação do método otimizado.

Composto	LD ($\mu\text{g/mL}$) ^a	LQ ($\mu\text{g/mL}$) ^b	Repetibilidade intra-dia (%) ^c	Repetibilidade inter-dia (%) ^d	Recuperação nível 1 (%) ^e	Recuperação nível 2 (%) ^f
Colesterol	0,45	1,35	3,69	3,99	99,18 \pm 1,73	98,65 \pm 0,90
7 α -hidroxicoolesterol	0,02	0,05	2,40	3,54	97,31 \pm 6,37	97,78 \pm 5,23
7 β -hidroxicoolesterol	0,01	0,04	3,03	2,48	97,46 \pm 1,48	92,32 \pm 5,57
5,6 β -epoxicolesterol	0,57	1,73	5,71	4,78	96,24 \pm 4,78	96,01 \pm 1,42
5,6 α -epoxicolesterol	0,08	0,23	3,48	5,52	103,46 \pm 5,30	100,29 \pm 4,20
20 α -hidroxicoolesterol	0,04	0,11	10,50	8,56	97,31 \pm 3,36	98,08 \pm 3,56
Colestanotriol	0,05	0,15	7,30	5,99	88,97 \pm 4,75	87,67 \pm 4,04
25-hidroxicoolesterol	0,02	0,06	4,33	6,10	94,57 \pm 3,47	94,77 \pm 8,32
7-cetocolesterol	0,08	0,25	2,07	3,78	98,15 \pm 2,44	97,17 \pm 3,66

^aLD = limite de detecção. ^bLQ = limite de quantificação. ^c% de desvio padrão relativo de amostras analisadas no mesmo dia. ^d% de desvio padrão relativo de amostras analisadas em 3 dias diferentes. ^eNível 1 = adição de 1,68mg de oleato de colesterol e 5 μg de cada óxido de colesterol. ^fNível 2 = adição de 3,37 mg de oleato de colesterol e 25 μg de cada óxido de colesterol.

É possível diluir o extrato seco para pequenos volumes de hexano tornando a técnica mais sensível, no entanto, em amostras com alto teor de colesterol, pequenos volumes podem não ser suficientes para solubilizar o colesterol, além de dificultar a separação dos óxidos e causar contaminação no sistema de injeção do cromatógrafo. Essa limitação pode ser contornada através da purificação dos COPS utilizando uma etapa de extração em fase sólida (SPE), que pode, no entanto, resultar na formação de artefatos (Rose-Sallin et al., 1995) e na redução da precisão (Narváez-Rivas et al., 2014), por isso optou-se pela análise sem o uso de SPE.

O método otimizado também apresentou boa repetibilidade para a análise de colesterol ($\leq 3,99\%$) e COPs ($\leq 10,50\%$), além de boa recuperação nos dois níveis estudados (87,67 a 103,46 %, respectivamente). Valores similares foram obtidos para a recuperação de colesterol e ergosterol por saponificação assistida por micro-ondas (Young, 1995; Piñeiro-Avila et al., 1998; Zhang et al., 2008) e para a extração de COPs pelo método convencional (Rose-Sallin et al., 1995; Dionisi et al., 1998; Mariutti et al. 2008). O colestanoetriol foi o COP que apresentou a menor recuperação ($\geq 87,67\%$), isso se deve ao fato deste óxido apresentar maior polaridade dentre os óxidos estudados. Resultados similares foram reportados por Dionisi et al. (1998) e Cardenia et al. (2012).

Somente foram encontrados artefatos formados a partir da cadeia principal do colesterol (Tabela 6) e os principais artefatos formados foram os 7-hidroxicolesterol (nas formas α e β), Rose-Sallin et al. (1995) encontraram como principais artefatos o 7-cetocolesterol e o 25-hidroxicolesterol que, de acordo com os autores, podem ter sido formado durante a etapa de limpeza por SPE.

Tabela 6 - Formação de artefatos nos diferentes métodos

Composto	Saponificação direta a frio - método convencional ($\mu\text{g/g}$) ^a	Saponificação direta assistida por micro-ondas ($\mu\text{g/g}$) ^a
7 α -hidroxicolesterol	0,89 \pm 0,03 ^a	0,31 \pm 0,05 ^b
7 β -hidroxicolesterol	0,91 \pm 0,02 ^a	0,38 \pm 0,08 ^b
5,6 β -epoxicolesterol	0,51 \pm 0,01 ^a	0,13 \pm 0,01 ^b
5,6 α -epoxicolesterol	0,26 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^b
7-cetocolesterol	0,20 \pm 0,01 ^a	0,15 \pm 0,03 ^a
óxidos totais	2,77 \pm 0,03 ^a	1,02 \pm 0,17 ^b

^aResultados são expressos em $\mu\text{g/g}$ de amostra adicionada de 2 mg de colesterol-6D/g. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre os valores ($p < 0,05$).

O teor de artefatos encontrado tanto para o DMAS, quanto para o método convencional apresentou menor formação de artefatos do que o observado por Rose-Sallin et al. (1995), quando considerada a mesma massa de padrão. No entanto, o método de DMAS apresentou menor formação de artefatos que o método convencional, indicando que durante a saponificação por micro-ondas o maior teor de óxidos encontrados (Figura 2b) se deve a maior extração desses compostos e não a formação de artefatos de oxidação do colesterol durante a saponificação, corroborando com os resultados dos trabalhos que têm demonstrado maior rendimento de extração de diversos compostos em diferentes matrizes por métodos de extração assistida por micro-ondas em comparação com os métodos convencionais (Zhang et al., 2005; Chen et al., 2007; Yan et al., 2010; Garofulic et al., 2013).

Efeito do processamento na formação de óxidos de colesterol

O método foi aplicado em camarão fresco, salgado e salgado e seco, em dois lotes diferentes (Tabela 7) com boa repetibilidade ($\text{CRV} \leq 10,87\%$). O teor de colesterol no camarão fresco não diferiu entre os lotes e foi similar ao encontrado na literatura para a mesma espécie (121- 253 mg/100g em base úmida, Abreu et al., 2010; Forster et al., 2010).

Tabela 7 – Teor de colesterol e óxidos de colesterol do camarão fresco e processado

Composto	Fresco		Salgado		Salgado e seco	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
Colesterol	7,43 ± 0,20 ^a	7,32 ± 0,32 ^a	7,42 ± 0,16 ^a	7,39 ± 0,17 ^a	7,16 ± 0,22 ^a	7,37 ± 0,35 ^a
7α-hidroxicolesterol	2,16 ± 0,09 ^a	2,10 ± 0,10 ^a	3,55 ± 0,15 ^b	2,02 ± 0,08 ^a	1,73 ± 0,05 ^c	1,98 ± 0,04 ^a
7β-hidroxicolesterol	0,88 ± 0,04 ^a	0,43 ± 0,10 ^b	0,75 ± 0,02 ^{ac}	2,63 ± 0,15 ^d	0,57 ± 0,02 ^{bc}	0,59 ± 0,01 ^{bc}
5,6β-epoxicolesterol	50,95 ± 3,33 ^a	45,21 ± 1,72 ^b	65,17 ± 1,90 ^c	40,18 ± 0,94 ^d	43,86 ± 0,80 ^{bc}	37,07 ± 0,21 ^d
5,6α-epoxicolesterol	17,33 ± 1,05 ^a	9,54 ± 0,29 ^b	14,37 ± 0,47 ^c	13,66 ± 0,78 ^c	9,64 ± 0,26 ^b	11,23 ± 0,64 ^b
20α-hidroxicolesterol	2,22 ± 0,21 ^a	1,35 ± 0,11 ^b	2,14 ± 0,14 ^a	1,66 ± 0,14 ^{bc}	1,46 ± 0,08 ^{bc}	1,74 ± 0,02 ^c
Colestanotriol	2,06 ± 0,15 ^a	0,96 ± 0,09 ^b	0,85 ± 0,03 ^{bc}	1,81 ± 0,13 ^a	0,56 ± 0,06 ^d	0,69 ± 0,02 ^{cd}
25-hidroxicolesterol	0,56 ± 0,04 ^a	0,36 ± 0,02 ^b	0,72 ± 0,04 ^c	0,36 ± 0,02 ^b	0,47 ± 0,03 ^d	0,34 ± 0,01 ^b
7-cetocolesterol	9,29 ± 0,34 ^a	4,10 ± 0,22 ^b	7,61 ± 0,23 ^c	8,02 ± 0,13 ^c	4,88 ± 0,15 ^d	7,78 ± 0,46 ^c
Óxidos totais	85,46 ± 5,08 ^a	64,05 ± 1,65 ^{bc}	95,16 ± 1,39 ^d	70,35 ± 1,08 ^b	63,16 ± 0,62 ^c	61,42 ± 0,88 ^c

Os valores são expressos como média desvio padrão (n=3) em matéria seca sem cloreto de sódio em mg/g para o colesterol e em μ g/g para os COPs. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre os valores ($p < 0,05$).

Os processos de salga e secagem não afetaram significativamente o teor de colesterol das amostras em nenhum dos lotes. Porém o processo de salga provocou o aumento do COPs totais em 11,35 e 9,84 %, nos lotes 1 e 2, respectivamente. O mesmo comportamento para o colesterol foi observado por Becerra et al. (2014) após a cocção com sal, contudo, os autores não observaram aumento significativo no teor de COPs totais após essa etapa. Após a secagem observou-se uma redução de 33,63 e 12,27% no teor de COPs nos lotes 1 e 2, respectivamente, que pode ser explicada pela possível degradação dos óxidos de colesterol (Nogueira et al., 2010; Ansorena et al., 2013).

O teor de COPs totais foi de menos de 2 % em relação ao colesterol não oxidado, enquanto Soto-Rodrigues et al. (2008) encontraram até 23 %, contudo, o processo de salga e secagem avaliado por estes autores consiste em cocção do camarão em salmoura por 5-10 min e secagem ao sol por até 10 dias, o que pode ocasionar extensa foto-oxidação.

O COP majoritário em todas as amostras foi o 5,6 β -epoxicolesterol, seguido do 5,6 α -epoxicolesterol e do 7-cetocolesterol. De acordo com Lercker e Rodriguez-Estrada (2002) os epóxidos de colesterol são formados pela interação de radicais hidroperóxilas com o colesterol, havendo uma predominância de ocorrência da forma β sobre a forma α . Soto-Rodriguez et al. (2008) avaliaram o teor de COPS em 3 lotes de camarões salgados e secos do México e encontraram o 7-cetocolesterol como COP majoritário nas 3 amostras, seguido pelos 7-hidroxicolesteróis em 2 lotes amostras e pelos epoxicolesteróis em outro lote, de acordo com Becerra et al. (2014) os principais COPs encontrados no camarão após a salga e secagem ao sol são os isômeros α e β do 7-hidroxicolesterol enquanto o 7-cetocolesterol é produzido durante a estocagem.

Embora o processamento do camarão salgado e seco provoque a oxidação dos ácidos graxos das séries n-3 e n-6 (Souza e Bragagnolo, 2014), observou-se uma redução significativa no teor de COPs totais tanto após a etapa de salga quanto após a etapa de secagem. A redução dos teores de óxidos pode ser explicada provavelmente pela degradação dos óxidos de colesterol (Nogueira et al., 2010; Ansorena et al., 2013).

Conclusão

O método desenvolvido no presente trabalho foi o primeiro a realizar a extração e determinação simultânea de colesterol e COPs com o auxílio das micro-ondas. O método mostrou-se sensível, preciso e com boa recuperação, além de ter sido mais rápido, eficiente e apresentar menor formação de artefatos quando comparado ao método convencional

O método foi aplicado com sucesso em camarão fresco, salgado e salgado e seco, apresentando boa repetibilidade, independente do teor de umidade das amostras.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Brasil pelo suporte financeiro.

Referências

Abreu, V. K. G., Pereira, A. L. F., Vidal, T. F., Zapata, J. F. F., Sousa Neto, M. A. de, & Freitas, E. R. De. (2010). Fatty acids, cholesterol, oxidative rancidity, and color of irradiated shrimp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 969–973.

- Ansorena, D., Barriuso, B., Cardenia, V., Astiasarán, I., Lercker, G., & Rodriguez-Estrada, M. T. (2013). Thermo-oxidation of cholesterol: effect of the unsaturation degree of the lipid matrix. *Food Chemistry*, 141(3), 2757–64.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997). *Official Methods of Analysis*; AOAC: Gaithersburg.
- Becerra, J. A. H., Flores, A. A. O., Valerio-Alfaro, G., Soto-Rodriguez, I., Rodríguez-Estrada, M. T., García, H. S. (2014). Cholesterol oxidation and astaxanthin degradation in shrimp during sun drying and storage. *Food Chemistry*, 145, 832–9.
- Bragagnolo, N. (2009). Cholesterol and cholesterol oxides in meat and meat products, in: Nollet, L., Toldra, F. Handbook of muscle foods analysis, CRC Press: Boca Raton, pp. 187-219.
- Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., Baldacci, E., Savioli, S., Lercker, G. (2012). Analysis of cholesterol oxidation products by Fast gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 35(3), 424–30.
- Chen, Y., Xie, M. Y., & Gong, X. F. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 162–170.
- Dionisi, F., Golay, P. a., Aeschlimann, J. M., Fay, L. B. (1998). Determination of Cholesterol Oxidation Products in Milk Powders: Methods Comparison and Validation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2227–2233.
- Forster, I. P., Dominy, W. G., Obaldo, L. G. (2010). Effect of Diet Manipulation on Cholesterol and Docosahexaenoic Acid Levels in Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(2), 240–249.

- Garofulic, I. E., Dragovic-Uzelac, V., Jambrak, A. R., Jukic, M. (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117(4), 437-442.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH, 2005). *ICH Harmonised Tripartite Guideline - Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- Instituto Adolfo Lutz (2005). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Ministério da Saúde/ ANVISA: Brasília.
- Lercker, G., Rodriguez-Estrada, M. T. (2002). Cholesterol oxidation mechanisms, in: Gardiola, F., Dutta, P. C. Codony, R., Savage, G. P. (Eds), *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects*. AOCS Press: Champaign.
- Mariutti, L. R. B., Nogueira, G. C., Bragagnolo, N. (2008). Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides extraction in chicken meat using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 2913–8.
- Narváez-Rivas, M., Pham, A. J., Schilling, M. W., León-Camacho, M. (2014). A new SPE/GC-fid method for the determination of cholesterol oxidation products. Application to subcutaneous fat from Iberian dry-cured ham. *Talanta*, 122, 58–62.

- Nelson, D.L., Cox, M.M. *Lehninger: principles of biochemistry*. 4 ed.: Freeman: Nova Iorque, 2005. 1119p.
- Nogueira, G. C., Costa, B. Z., Crotti, A. E. M., Bragagnolo, N. (2010). Synthesis of 7-hydroperoxycholesterol and its separation, identification, and quantification in cholesterol heated model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10226–30.
- Piñeiro-Avila, G., Salvador, A., Guardia, M. (1998). Microwave-assisted saponification of animal greases for cholesterol determination. *Analytica Chimica Acta*, 371, 297–303.
- Rose-Sallin, C., Huggett, A. C., Bosset, J. O., Tabacchi, R., Fay, L. B. (1995). Quantification of Cholesterol Oxidation Products in Milk Powders Using [2H7]Cholesterol To Monitor Cholesterol Autoxidation Artifacts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(4), 935–941.
- Souza, H. A. L., Bragagnolo, N. (2014). New Method for the Extraction of Volatile Lipid Oxidation Products from Shrimp by Headspace-Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Evaluation of the Effect of Salting and Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(3), 590–599.
- Ubhayasekera, S. J. K. A., Verleyen, T., Dutta, P. C. (2004). Evaluation of GC and GC–MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chemistry*, 84(1), 149–157.
- Vandendool, H., Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11(3), 463–471.

- Yan, M. M., Liu, W., Fu, Y. J., Zu, Y. G., Chen, C. Y., Luo, M. (2010). Optimisation of the microwave-assisted extraction process for four main astragalosides in Radix Astragali. *Food Chemistry*, 119(4), 1663–1670.
- Young, J. (1995). Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2904–2910.
- Zhang, F., Chen, B., Xiao, S., Yao, S. (2005). Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. *Separation and Purification Technology*, 42(3), 283–290.
- Zhang, H., Wolf-Hall, C., Hall, C. (2008). Modified microwave-assisted extraction of ergosterol for measuring fungal biomass in grain cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11077–11080.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 - Parâmetros dos padrões utilizados para quantificação dos artefatos formados a partir do colesterol-6D.

Composto	TR ^a (min)	IR ^b	Fragmento alvo (<i>m/z</i>)	Íons de referência (<i>m/z</i>)
7 α -hidroxicolesterol-6D	14,16	3168	462	552; 239
colesterol-6D	14,84	3209	131	464; 333
7 β -hidroxicolesterol-6D	16,31	3285	462	552; 239
5,6 β -epoxicolesterol-6D	17,20	3327	480	390; 101
5,6 α -epoxicolesterol-6D	17,59	3344	480	390; 101
7-cetocolesterol-6D	21,01	3483	478	373; 131

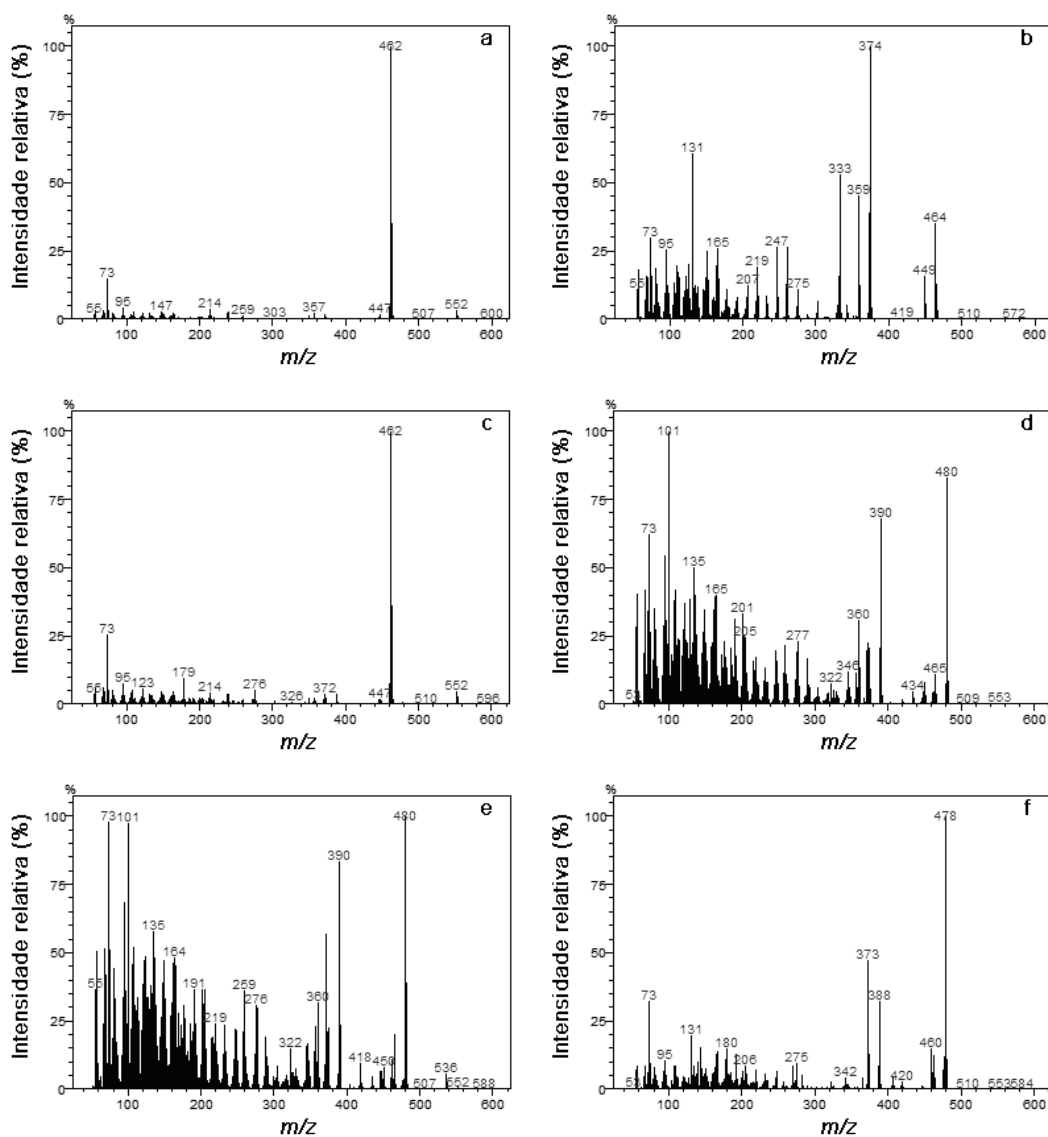


Figura S2 – Espectros de massas do TMS-7 α -hidroxicolesterol-6D (a), TMS-olesterol-6D (b), TMS-7 β -hidroxicolesterol-6D (c), TMS-5,6 β -epoxicolesterol-6D (d), TMS-5,6 α -epoxicolesterol-6D (e) e TMS-7-cetocolesterol-6D (f).

CONCLUSÃO GERAL

O método de HS-SPME desenvolvido para a análise de produtos voláteis de oxidação lipídica mostrou-se rápido e prático e apresentou boa repetibilidade, sensibilidade e eficiência. A extração foi influenciada pelo tipo de fibra, modo de preparo da amostra e pelo binômio tempo e a temperatura de extração. A melhor condição de análise foi obtida através da homogeneização da amostra com água destilada na proporção de 1:3 em turrax e extração utilizando a fibra com recobrimento de divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB.CAR.PDMS) a 40 °C por 30 minutos.

O método de saponificação assistida por micro-ondas para a análise simultânea de colesterol e óxidos de colesterol (COPs) mostrou-se rápido, simples e preciso, possibilitando extração de óxidos de colesterol superior ao método convencional. A saponificação foi influenciada pela temperatura, concentração e volume de solução de KOH. A melhor condição para a análise foi obtida utilizando 20 mL de uma solução etanólica de KOH na concentração de 1 mol/L para 0,5 g de amostra e saponificação por 16 min a 45 °C.

O processamento, principalmente a salga provocaram a redução de ácidos graxos na fração lipídica do camarão, especialmente dos ácidos araquidônico, eicosapentaenóico e docosaexaenóico. Além de provocarem um aumento nos produtos voláteis de oxidação lipídica acima de seus limiares de detecção (*threshold*), indicando que a formação de produtos de oxidação lipídica durante o processamento podem afetar as características sensoriais do produto. A etapa de salga provocou, ainda, aumento do teor de COPs totais no camarão, enquanto a etapa de secagem levou à redução do teor de COPs.