

**FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL
EM HAMBÚRGUER BOVINO EM FUNÇÃO
DO BINÔMIO TEMPO / TEMPERATURA
DE PREPARAÇÃO**

SILVIO JOSÉ VALADÃO VICENTE

Dissertação apresentada à Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo para
obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Profa., Dra. Elizabeth A. F. S. Torres

São Paulo
2003

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação por processos fotocopiadores, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Wicente

Data: 24/10/2003

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Esther Valadão Vicente, pelo apoio e cuidados recebidos, pela confiança constante e paciência nos momentos mais difíceis, sem os quais nada teria valido a pena.

Ao meu pai já ausente, Sylvio dos Santos Vicente, pela mão segura e atenciosa que ajudou a desenhar os caminhos a serem trilhados.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Elizabeth A. F. S. Torres, pela orientação segura e paciente, pelo apoio e disposição sempre presentes e, principalmente, pela amizade que tornou muito mais humano este trabalho de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho e Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas, participantes da banca de avaliação, pelas sugestões de grande valia recebidas durante a elaboração e revisão deste estudo.

Às colegas de pós-graduação Emília Ichimoto, Geni Sampaio e Cláudia Castellucci, pela valiosa convivência e troca de experiências, que muito auxiliaram no andamento e finalização deste projeto científico.

ÍNDICE

Lista de figuras	V
Lista de tabelas	VII
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	IX
Resumo	XI
Summary	XIII
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Colesterol e óxidos de colesterol	03
2.2 Efeitos biológicos dos óxidos de colesterol	06
2.2.1 Citotoxicidade	06
2.2.2 Aterogênese	07
2.2.3 Mutagênese e carcinogênese	10
2.2.4 Estrutura e funcionalidade da membrana celular	12
2.2.5 Inibição de enzimas	14
2.3 Formação dos óxidos de colesterol <i>in vivo</i>	17
2.4 Formação dos óxidos de colesterol nos alimentos	20
2.4.1 Oxigênio e derivados	20
2.4.2 Temperatura	23
2.4.3 Ácidos graxos poliinsaturados	25
2.4.4 Água e pH	26
2.5 Absorção dos óxidos de colesterol dos alimentos	28
2.6 Metabolismo e excreção dos óxidos de colesterol	30
2.7 Extração e quantificação do colesterol e óxidos de colesterol	32
2.7.1 Extração do colesterol e óxidos de colesterol	32
2.7.2 Quantificação do colesterol e óxidos de colesterol	34

3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Materiais	39
4.1.1 Hambúrgueres industrializados	39
4.1.2 Hambúrgueres caseiros	39
4.1.3 Reagentes e solventes	40
4.2 Métodos	41
4.2.1 Processamento térmico dos hambúrgueres	41
4.2.2 Extração do colesterol e óxidos de colesterol	42
4.2.3 Identificação e quantificação do colesterol e óxidos de colesterol	43
4.2.4 Détermination do teor de umidade	44
4.2.5 Détermination dos lipídios totais	44
4.2.6 Détermination do grau de processamento térmico	45
4.2.7 Análise estatística	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Teor de umidade dos hambúrgueres antes e após os processamentos	46
5.2 Teor de lipídios totais antes e após processamento	50
5.3 Validação do método cromatográfico para a quantificação de colesterol e óxidos de colesterol	52
5.3.1 Identificação dos tempos de retenção	52
5.3.2 Curvas dos padrões de colesterol e óxidos de colesterol	54
5.3.3 Testes de recuperação	60
5.3.4 Limites de detecção e quantificação	62
5.4 Teor de colesterol e óxidos de colesterol	64
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE FIGURAS

Fig. 01	Fórmula estrutural do colesterol	03
Fig. 02	Fórmula estrutural dos ésteres de colesterila formados pela esterificação do colesterol com ácidos graxos	04
Fig. 03	Caminhos preferenciais para a formação de derivados oxidados do colesterol	05
Fig. 04	Possíveis mecanismos mutagênicos dos hidroperóxidos de colesterol (CHP) em combinação com espécies ativas do oxigênio	11
Fig. 05	Estrutura geral da membrana celular, composta de lipídios (vermelho) e proteínas (verde)	12
Fig. 06	Deformação da membrana celular pela incorporação de óxidos de colesterol no lugar de colesterol, alterando sua estrutura, permeabilidade e transporte transcelular de nutrientes e resíduos pelas proteínas	13
Fig. 07	Possíveis mecanismos de repressão e ativação da HMG-CoA redutase pelos óxidos de colesterol	15
Fig. 08	Mecanismo de oxidação do colesterol (RH)	21
Fig. 09	Efeito da temperatura e do tempo de aquecimento na oxidação do colesterol	23
Fig. 10	Efeito da temperatura e do tempo de aquecimento na oxidação do colesterol a 7-K	24
Fig. 11	Efeito da presença de água e sais na oxidação do colesterol a 75°C	26
Fig. 12	Óxidos de colesterol presentes no plasma de humanos após refeição rica em óxidos de colesterol	29
Fig. 13	Possíveis rotas de absorção, metabolismo e excreção dos óxidos de colesterol	31
Fig. 14	Espectro de absorção do colesterol e seus derivados oxidados na região do ultravioleta	44
Fig. 15	Sensor para indicação do grau de cozimento de alimentos fabricado pela 3M	45

Fig. 16	Perda de umidade (%) de hambúrgueres tipo regular com massa inicial de 56 gramas, em função do tempo de processamento em chapa a 250°C	48
Fig. 17	Perdas (água e lipídios totais) de hambúrguer regular com massa inicial de 56 gramas, em função do tempo de processamento em chapa a 250°C	51
Fig. 18	Cromatograma obtido utilizando-se a técnica de HPLC em fase intermediária, para colesterol, 25-OH, 7-K, 7 α -OH e 7 β -OH	53
Fig. 19	Curva de calibração para padrões de colesterol analisados por HPLC	55
Fig. 20	Curva de calibração para padrões de 25-OH analisados por HPLC	56
Fig. 21	Curva de calibração para padrões de 7-K analisados por HPLC	57
Fig. 22	Curva de calibração para padrões de 7 α -OH analisados por HPLC	58
Fig. 23	Curva de calibração para padrões de 7 β -OH analisados por HPLC	59
Fig. 24	Representação (“boxplot”) da redução do colesterol (mg / hambúrguer com massa inicial de 56 gramas) em função do tipo de processamento térmico, calculado pelo SPSS® com significância estatística	67

LISTA DE TABELAS

Tab. 01	Óxidos de colesterol presentes no plasma de voluntários saudáveis	17
Tab. 02	Composição percentual de hambúrgueres tipo tradicional produzidos na FSP-USP	39
Tab. 03	Teor de umidade de hambúrgueres não processados (crus) com massa inicial de 56 gramas	46
Tab. 04	Teor de umidade de hambúrgueres tipo regular com massa inicial de 56 gramas, em função do tempo de processamento em chapa a 250°C	47
Tab. 05	Perdas de água e outros em hambúrgueres tipo regular com massa inicial de 56 gramas, em função do tempo de processamento em chapa a 250°C	48
Tab. 06	Perda de umidade de hambúrgueres tipo regular e FSP-USP com massa inicial de 56 gramas, após processamento em chapa, forno ou microondas nas condições definidas como padrão	49
Tab. 07	Teor de lipídios totais de hambúrgueres crus com massa inicial de 56 gramas	50
Tab. 08	Perdas de lipídios totais em hambúrguer regular com massa inicial de 56 gramas, em função do tempo de processamento em chapa a 250°C	50
Tab. 09	Perda lipídica em hambúrgueres com massa inicial de 122,5 gramas, em função do tipo de processamento	51
Tab. 10	Tempos de retenção utilizando-se a técnica de HPLC em fase intermediária para colesterol, 25-OH, 7-K, 7 α -OH e 7 β -OH	54
Tab. 11	Padrões de colesterol analisados por HPLC	55
Tab. 12	Padrões de 25-OH analisados por HPLC	56
Tab. 13	Padrões de 7-K analisados por HPLC	57
Tab. 14	Padrões de 7 α -OH analisados por HPLC	58
Tab. 15	Padrões de 7 β -OH analisados por HPLC	59
Tab. 16	Preparação dos padrões para os testes de recuperação	60
Tab. 17	Massas dos padrões calculadas por HPLC	60
Tab. 18	Índices de recuperação do colesterol e seus óxidos por HPLC	61

Tab. 19	Índices de recuperação de colesterol e seus óxidos em estudos similares	61
Tab. 20	Determinação do ruído do sistema cromatográfico	62
Tab. 21	Comparação dos limites de detecção e de quantificação do método cromatográfico deste estudo e de trabalhos similares	63
Tab. 22	Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres crus com massa inicial de 56 gramas	64
Tab. 23	Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres com massa inicial de 56 gramas, após processamento por 5 minutos em chapa com temperatura inicial de 250°C	65
Tab. 24	Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres com massa inicial de 56 gramas, após processamento por 6 minutos em chapa com temperatura inicial de 250°C	65
Tab. 25	Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres com massa inicial de 56 gramas, após processamento por 7 minutos em forno convencional com temperatura inicial de 250°C	65
Tab. 26	Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres com massa inicial de 56 gramas, após processamento por 8 minutos em forno convencional com temperatura inicial de 250°C	66
Tab. 27	Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres com massa inicial de 56 gramas, após processamento por 2 minutos em microondas seguido de dourador (“grill”) por 5 minutos	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α -CE	α -epoxicolesterol ou $5\alpha,6\alpha$ -epoxi-colestano- 3β -ol
β -CE	β -epoxicolesterol ou $5\beta,6\beta$ -epoxi-colestano- 3β -ol
CT	Colestanotriol ou colestano- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol
7-K	7-cetocolesterol ou colest-5-eno- 3β -ol-7-ona
4β -OH	4β -hidroxicolesterol ou colest-5-eno- $3\beta,4\beta$ -diol
7α -OH	7α -hidroxicolesterol ou colest-5-eno- $3\beta-7\alpha$ -diol
7β -OH	7β -hidroxicolesterol ou colest-5-eno- $3\beta,7\beta$ -diol
20-OH	20-hidroxicolesterol ou colest-5-eno- $3\beta,20$ -diol
22-OH	22-hidroxicolesterol ou colest-5-eno- $3\beta,22$ -diol
24-OH	24-hidroxicolesterol ou colest-5-eno- $3\beta,24$ -diol
25-OH	25-hidroxicolesterol ou colest-5-eno- $3\beta,25$ -diol
26-OH	26-hidroxicolesterol ou colest-5-eno- $3\beta,26$ -diol
27-OH	27-hidroxicolesterol ou colest-5-eno- $3\beta,27$ -diol
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$^3\text{O}_2$	Oxigênio triplete
ACAT	Colesterol acil coenzima A transferase (“acyl CoA: cholesterol acyltransferase”)
CETP	Proteína colesterol acil éster transferase (“cholesterol ester acyltransferase protein”)
CHP	Hidroperóxido de colesterol (“cholesterol hydroperoxide”)
Colesterol	Colest-5-eno- 3β -ol
COP	Produtos de oxidação do colesterol (“cholesterol oxidation products”)
DNA	Ácido desoxiribonucleico (“desoxiribonucleic acid”)
GC-MS	Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrofotômetro de massa (“gas chromatograph-mass spectrophotometer”)
HDL	Lipoproteína de alta densidade (“high density lipoprotein”)

HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase redutase
HPLC	Cromatógrafo líquido de alto desempenho (“high performance liquid chromatograph”)
LCAT	Lecitina colestrol acil transferase (“lecithin: cholesterol acyltransferase”)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (“low density lipoprotein”)
m-RNA	Acido ribonucléico mensageiro (“messenger ribonucleic acid”)
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado (“polyunsaturated fatty acid”)
RNA	Ácido ribonucléico (“ribonucleic acid”)
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (“very low density lipoprotein”)

RESUMO

Vicente SJV. **Formação de óxidos de colesterol em hambúrguer bovino em função do binômio tempo / temperatura de preparação.** São Paulo; 2003. [Dissertação de mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP].

Alimentos de origem animal como hambúrgueres de carne bovina apresentam quantidades variáveis de colesterol em sua composição. Durante o processamento térmico destes hambúrgueres, uma fração do colesterol pode ser oxidada por efeito do calor e do oxigênio do ar, dentre outros fatores, produzindo óxidos de colesterol que são subprodutos nocivos à saúde humana e que podem manifestar efeitos citotóxicos, aterogênicos, mutagênicos e carcinogênicos. Diante destes fatos e do crescente consumo de hambúrgueres, principalmente nos grandes centros populacionais, tornou-se importante pesquisar a possível formação de derivados oxidados do colesterol neste tipo de alimento.

Este estudo avaliou a formação dos óxidos de colesterol em função da temperatura, tempo de preparação e tipo de processamento térmico, em amostras de hambúrgueres obtidas em supermercados ou produzidas no Laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP). As determinações foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da FSP-USP utilizando-se a metodologia de extração proposta em 1957 por Folch et al e modificada em 1976 por Csallany e Ayaz e a técnica de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) descrita em 1994 por Chen e Chen, com alterações propostas pelo autor do presente trabalho.

Os procedimentos de extração e análise visaram a quantificação dos óxidos de colesterol livres, uma vez que estes representam mais de 90% dos óxidos totais, conforme vários autores citados neste trabalho. A determinação dos óxidos de colesterol totais (livres + combinados) exigiria a realização de reações de hidrólise, o que demandaria um grande tempo e certamente afetaria a distribuição dos eventuais óxidos de colesterol por serem estas, substâncias sensíveis ao calor e a meios alcalinos. Todos os testes foram realizados no mínimo em triplicata e os resultados estão relatados como média \pm desvio padrão.

Foi possível concluir que hambúrgueres crus, isentos ou praticamente isentos de óxidos de colesterol, mantiveram estas características após os processamentos térmicos avaliados, não sendo observada formação adicional destes derivados oxidados em concentrações quantificáveis.

Foi ainda comprovada uma redução entre 10 e 26% do teor de colesterol livre das amostras processadas termicamente quando comparadas às respectivas amostras cruas, pela eluição deste composto na gordura liberada do alimento durante o seu processamento térmico.

As conclusões deste estudo estão em concordância com os resultados de outros trabalhos já publicados sobre o processamento térmico de alimentos de origem animal e, em particular, para carnes e hambúrgueres.

Descritores: hambúrguer, colesterol, óxidos de colesterol, oxidação.

SUMMARY

Vicente SJV. **Formation of cholesterol oxides in beef hamburger as a function of cooking time and temperature of its preparation.** São Paulo; 2003. [Dissertation - Faculdade de Saúde Pública of Universidade de São Paulo].

All animal origin food like beef hamburgers presents variable amounts of cholesterol in its composition. During cooking of hamburgers, a fraction of this cholesterol can be oxidized due to heat and air oxygen, among some other factors, producing cholesterol oxides that are by-products harmful to human health and can promote cytotoxic, atherogenic, mutagenic and carcinogenic effects. Considering these facts and the increasing consumption of beef hamburgers, mainly in big cities, became important to study the possible formation of cholesterol oxidized derivatives in this food.

This study aimed to evaluate the formation of these cholesterol oxides as a function of temperature, length of cooking and type of thermal processing, in hamburgers obtained in supermarkets or produced at the Laboratório de Técnica Dietética of Faculdade de Saúde Pública of Universidade de São Paulo (FSP-USP). All determinations were done at the Laboratório de Bromatologia of FSP-USP using extraction methodology proposed by Folch et al in 1957 and improved by Csallany and Ayaz in 1976 and analysis methodology by high performance liquid chromatography (HPLC) described by Chen and Chen in 1994, with modifications proposed by the author of the present paper.

All extraction and analytical procedures aimed to quantify free cholesterol oxides as they represent more than 90% of total cholesterol oxides as stated by several authors named along of this study. The determination of total cholesterol oxides (free + combined) would require hydrolysis reactions, demanding time and certainly affecting the distribution of eventual cholesterol oxides, as these substances are sensitive to heat and alkaline media. All determinations were done at least in triplicate and results are expressed as average \pm standard deviation.

It was possible to conclude that raw hamburgers, free or practically free of cholesterol oxides, kept these characteristics after all selected cooking methods as the

formation of additional cholesterol oxidation products was not observed in detectable quantities.

It was also observed a reduction between 10 and 26% of the level of free cholesterol in samples processed by heat when compared with correspondent raw hamburgers, due to the elution of this component with fat released from the food during its thermal processing.

All conclusions of this study are consonant with results of other papers already published about thermal processing of animal origin food, in particular about meat and hamburgers.

Descriptors: hamburger, cholesterol, cholesterol oxides, oxidation.

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos demonstram, há várias décadas, que as doenças cardiovasculares são a maior causa de mortalidade em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, tanto no ocidente como no oriente. Até recentemente, o colesterol que é uma molécula encontrada exclusivamente nos tecidos de origem animal, era considerado como o maior fator de risco para estes distúrbios, sendo que o controle da ingestão desta substância passou a ser encarado como atitude de fundamental importância nas dietas, para a manutenção da boa saúde.

No campo nutricional, a carne é considerada um alimento altamente complexo e importante fonte de proteínas, lipídios e sais minerais, que se torna mais saboroso e digerível quando processado por calor (cozido, assado, frito, grelhado, etc.). Entretanto, este processamento térmico pode levar a modificações indesejáveis como oxidações lipídicas e alterações das frações protéicas, dentre outras (Rodríguez-Estrada et al, 1997). Além disto, a carne apresenta colesterol em sua composição e estudos mais recentes demonstram que esta molécula pode sofrer reações oxidativas de origem endógena (enzimática ou não) ou exógena (fatores como temperatura, presença de oxigênio, metais pró-oxidantes, ácidos graxos poliinsaturados, radicais livres e radiações, dentre outros), produzindo dezenas de derivados oxidados que apresentam efeitos biológicos indesejados como aterogenicidade, carcinogenicidade, citotoxicidade e mutagenicidade, além de interferir na síntese endógena de várias moléculas e nas funções estruturais das membranas celulares. Dentre os derivados oxidados mais encontrados nos alimentos podem ser destacados o 7-K, α -CE, β -CE, 25-OH, 7α -OH, 7β -OH e CT. Por ser formado rapidamente, em maior quantidade e ser estável, o 7-K tem sido utilizado como indicador de oxidação do colesterol.

Durante o processamento térmico dos hambúrgueres, o efeito combinado do calor e do oxigênio do ar sobre o colesterol, pode gerar quantidades até então pouco estudadas destes derivados oxidados. Dependendo das quantidades e dos tipos de óxidos de colesterol formados, existe a possibilidade de ocorrer danos à saúde dos consumidores, sendo que a extensão destes, certamente não depende apenas dos tipos e das quantidades de óxidos formados mas, também, da biodisponibilidade através da ingestão, absorção e metabolismo.

Trabalhos já publicados sobre derivados lácticos, frutos do mar, ovos e algumas carnes confirmam a formação, a absorção e os efeitos biológicos dos óxidos de colesterol estabelecendo, inclusive, modelos cinéticos para estas reações.

Em função do crescente consumo de hambúrgueres nas populações urbanas, tornou-se importante pesquisar a formação dos óxidos de colesterol neste alimento e, caso esta formação ocorresse em quantidades potencialmente perigosas, determinar as condições de processamento (temperatura e tempo) que propiciassem baixa formação destes derivados oxidados sob o ponto de vista epidemiológico, mas que fossem adequadas para se obter uma boa qualidade gustativa e microbiológica do alimento no momento do seu consumo.

Conforme a tabela “Consumo Alimentar *per capita* Adaptada” da Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas - FIPE 1998/99, consumiu-se em média 0,54 kg de hambúrguer por ano no Estado de São Paulo, o que equivale à cerca de 10 hambúrgueres. Entretanto, este consumo é bem maior nos grandes centros urbanos, podendo chegar a valores muitas vezes superior a esta média. Como comparação, o consumo *per capita* de carne bovina moída no Canadá em 1999, principalmente na forma de hambúrgueres, foi de 32,2 kg por ano, conforme os dados publicados por Poon et al (2001).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Colesterol e óxidos de colesterol

Sabe-se que o colesterol, em níveis adequados, é essencial à saúde humana sendo utilizado no fígado para a síntese do ácido cólico (precursor dos sais biliares que auxiliam na absorção e digestão das gorduras), nos ovários para a síntese do progesterona e do estrogênio, nos testículos para a síntese da testosterona, nas glândulas supra-renais para a síntese dos hormônios córtico-supra-renais e na camada córnea da pele conferindo à mesma resistência a substâncias hidrossolúveis, ácidos e solventes, além de desempenhar função estrutural e funcional na parede celular. Normalmente, a ingestão de colesterol exógeno pouco aumenta o seu teor no sangue, pois a mesma inibe, de modo considerável, a ação da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), reduzindo a produção de colesterol endógeno em um processo de controle intrínseco ou de “feedback” (Guyton e Hall, 2002; Mahan e Escott-Stump, 2002).

O colesterol ou colest-5-eno-3β-ol é um álcool policíclico insaturado da família dos esteróis, com fórmula molecular $C_{27}H_{46}O$, contendo um anel A com 6 carbonos e um grupo OH β-orientado no C₃, um anel B com 6 carbonos exibindo uma dupla ligação na posição 5 - 6 e conjugado ao anel A através dos carbonos C₅ - C₁₀, um anel C com 6 carbonos conjugado ao anel B através dos carbonos C₈ - C₉, um anel D com 5 carbonos conjugado ao anel C através dos carbonos C₁₃ - C₁₄, possuindo ainda uma cadeia lateral ramificada situada no C₁₇ com 8 carbonos sendo dois deles terciários (C₂₀ e C₂₅) e dois grupos metila nas posições 10 e 13, conforme mostrado na figura 1.

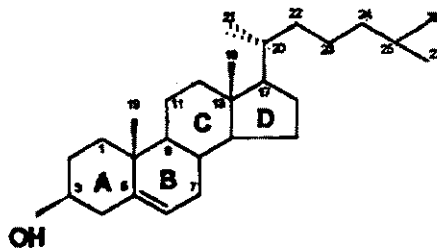


Figura 01: Fórmula estrutural do colesterol

Esta substância pode ser encontrada no corpo humano na forma livre (figura 1) ou em diferentes formas de associação como, por exemplo, através da esterificação do grupo OH com ácidos graxos, formando ésteres de colestera (figura 2), como citado nos trabalhos de Paniangvait et al (1995) e de Maerker (1987).

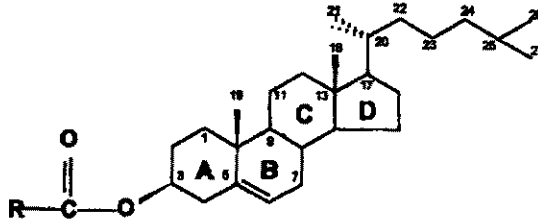


Figura 02: Fórmula estrutural dos ésteres de colestera formados pela esterificação do colesterol com ácidos graxos (Paniangvait et al, 1995; Maerker, 1987)

Por ser uma molécula reativa, o colesterol está sujeito à oxidação que pode ocorrer de maneira endógena (enzimática ou não) ou exógena (promovida por agentes como calor, oxigênio, metais pró-oxidantes como o ferro e o cobre, ácidos graxos poliinsaturados, radicais livres e radiações, dentre outros), possibilitando a formação de derivados oxidados denominados óxidos de colesterol (figura 3) que são biologicamente ativos e apresentam efeitos citotóxicos, aterogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (Smith, 1981; Smith, 1996; Paniangvait et al, 1995; Careri et al, 1998; Lyons e Brown, 1999). Estes produtos de oxidação (COP ou “cholesterol oxidation products”) formam uma família com estrutura similar à do colesterol apresentando, porém, um grupo hidroxila (-OH), cetona (C=O), epóxi (anel C-O-C), ou hidroperóxido (-OOH) adicional, o que ocorre normalmente no anel B ou nos carbonos C₂₀ ou C₂₅ da cadeia lateral, conforme Linseisen e Wolfram (1998a).

Provenientes de processos enzimáticos como a biossíntese dos ácidos biliares e dos hormônios esteróides, os óxidos de colesterol fazem parte do metabolismo humano, sendo encontrados no plasma, nas LDL (lipoproteínas de baixa densidade ou “low density lipoproteins”) e associados com a albumina. Tem sido sugerido que estes ligados à albumina, têm atividades biológicas diferentes daqueles associados as LDL, sendo os primeiros mais facilmente disponibilizados às células alvo (Linseisen e Wolfram, 1998a; Lin e Morel, 1996).

Porém, o excesso destes compostos oxidados gerados por disfunção enzimática ou absorvidos pela ingestão de alimentos nos quais o colesterol foi oxidado exogenicamente é comprovadamente nocivo à saúde das pessoas. Como exemplo, já foi relatado que pacientes hipercolesterolêmicos apresentam o dobro ou mais dos níveis de óxidos de colesterol plasmático quando comparados às pessoas saudáveis (Linseisen e Wolfram, 1998a).

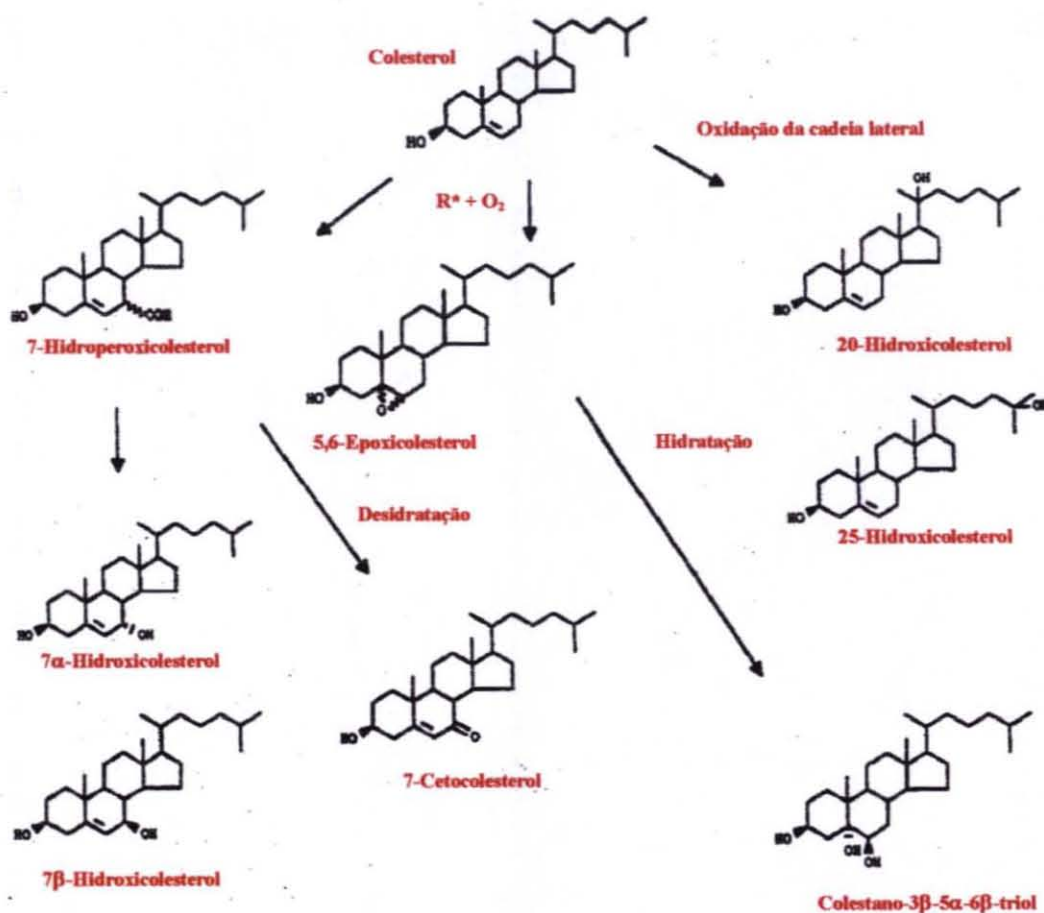


Figura 03: Caminhos preferenciais para a formação de derivados oxidados do colesterol (Maerker, 1987; Guardiola et al, 1995)

Como visto na figura 3, a oxidação do colesterol pode seguir três caminhos preferenciais: ataque no carbono C₇ produzindo compostos estabilizados pelo radical alila na dupla ligação Δ⁵, ataque nos carbonos C₂₀ e C₂₅ estabilizados pelas suas estruturas terciárias e ataque na dupla ligação Δ⁵ formando anel epóxi que pode ser posteriormente hidrolizado (Maerker, 1987; Guardiola et al, 1995).

2.2 Efeitos biológicos dos óxidos de colesterol

O colesterol talvez seja o composto mais importante dos tecidos animais e, desta forma, é difícil imaginá-lo como uma toxina ou exibindo ação perigosa (Guardiola et al, 1996). Apesar de não haver evidências de atividade tóxica para o colesterol, vários efeitos danosos têm sido relatados para os seus óxidos, levando os pesquisadores a lançar hipóteses sobre a relevância destes em diversas doenças.

Dos mais de 70 derivados oxidados já identificados experimentalmente ou apenas previstos teoricamente, o 25-OH e o CT parecem ser os mais tóxicos. Deste modo, a presença de óxidos de colesterol em certos alimentos levanta questões sobre a segurança dos mesmos (Paniangvait et al, 1995). Como já mencionado, os óxidos de colesterol apresentam atividades *in vitro* e *in vivo*, exibindo efeitos biológicos potencialmente significativos que indicam a necessidade de maiores investigações. Dentre os efeitos mais citados na literatura, podemos destacar:

2.2.1 Citotoxicidade

Muito da toxicidade dos óxidos de colesterol é atribuída à sua ação inibidora sobre a HMG-CoA redutase, causando a redução da síntese endógena do colesterol. É também relevante a sua habilidade de substituir moléculas de colesterol nas membranas celulares, perturbando sua permeabilidade e estabilidade, dentre outras propriedades. Estes efeitos citotóxicos têm sido testados principalmente em culturas de células mamárias, mas ainda não podemos extrapolar as conclusões para os seres humanos (Guardiola et al, 1996). Em uma revisão de 1989, Smith e Johnson mencionaram 28 diferentes óxidos de colesterol que apresentam citotoxicidade. Em 1992, Kucuk et al mostraram que alguns óxidos de colesterol inibem a função lítica de células NK (“natural killer”) de ratos *in vitro*, e que os derivados nas posições 5, 6 e 7 são mais potentes que nas posições 20 e 25. Em 1993, Zhou et al observaram que o 25-OH induzia a morte em culturas de células lisas da artéria umbilical humana. Vários estudos *in vivo* já foram realizados, principalmente com microorganismos. Em 1982, Ansari et al relataram o efeito bactericida do 7 α -OH e do 25-OH sobre a *Salmonella typhimurium*. Em 1985, Herian et al demonstraram a inibição do

crescimento da bactéria *Mycoplasma gallisepticum* pelo CT. Em 1983, Rodriguez et al realizaram estudo semelhante com a *Saccharomyces cerevisiae* envolvendo vários óxidos de colesterol. Em 1982, Baranowski et al relataram a ocorrência de necrose e resposta inflamatória aguda por implantação subcutânea de CT e 25-OH em ratos.

Estudos têm sido feitos para tentar capitalizar o efeito citotóxico dos óxidos de colesterol e usar estes compostos como agentes antitumorais, o que já foi demonstrado *in vitro*. O 7 β -OH e o seu dihemisuccinato sódico exibiram resultados *in vivo* (ratos) melhores do que os apresentados por drogas com reconhecida ação antitumoral como o 5-fluoracil, a metotrexato e a ciclofosfamida, contra tumores do tipo Krebs II, sendo altamente tóxico para as células tumorais em alta proliferação. Entretanto, as concentrações efetivas destes compostos para esta aplicação terapêutica (3 – 12 μ M) estão muito acima das normalmente encontradas no plasma, reduzindo, em muito, a sua possibilidade de uso. Recentemente grupos de pesquisa têm tentado desenvolver derivados dos óxidos de colesterol como o 7 β -fosfodiéster e o 7 β -oleato para serem aplicados como drogas antitumorais, porém, há indícios que os óxidos de colesterol e seus derivados poderiam interferir nos mecanismos de sínteses de proteínas e do RNA (Guardiola et al, 1996).

2.2.2 Aterogênese

O processo de aterosclerose normalmente é iniciado pela modificação da função de barreira do endotélio vascular, permitindo a penetração das LDL e das plaquetas. Fatores de crescimento-são-liberados, os quais induzem a proliferação e a migração de células musculares lisas, afetando a área do endotélio. Monócitos invadem a área e se tornam macrófagos, ocorrendo a ingestão e a degradação das LDL, resultando em células espumosas que aglutinam o colesterol liberado destas lipoproteínas. O acúmulo posterior de colesterol e seus ésteres, a proliferação de células musculares lisas, a síntese de colágeno, de elastina e o depósito de cálcio levam à formação das placas fibrosas ateromatosas (Linseisen e Wolfram, 1998a).

Vários fatores químicos e mecânicos incluindo vírus, hipertensão, aumento da LDL plasmática, nicotina, várias toxinas bacteriais, lipases, proteases, quininas, histaminas e lipídios oxidados, incluindo os óxidos de colesterol, podem produzir

lesões no endotélio modificando sua função de barreira e propiciando a aceleração do processo descrito acima (Guardiola et al, 1996). Foi demonstrado por Lyons e Brown (1999) que uma simples injeção intravenosa de colesterol contendo 7-K, 7 α -OH ou 7 β -OH em ratos resulta em deposição intimal de colesterol em menos de 24 horas, que injeções repetidas desta dispersão resultam em lesão aterosclerótica e que o 7-K é o segundo mais abundante óxido de colesterol nas placas ateroscleróticas dos humanos, após o 27-OH que é produzido endogenamente.

Atividades aterogênicas dos óxidos de colesterol que podem estar associadas a efeitos *in vivo* foram estudadas *in vitro* e relatadas em 1991 por Peng et al, como o efeito na permeabilidade vascular, na síntese de prostaglandina, na agregação de plaquetas, a citotoxicidade sobre células musculares lisas, a habilidade de modificar a funcionalidade dos receptores de LDL, o envolvimento no acúmulo de ésteres de colesterila e a formação de células espumosas. Foram avaliados os compostos α -CE, β -CE, 7 α -OH, 7 β -OH, 7-K, CT, 20-OH, 25-OH e 26-OH, dentre outros, sendo que o CT e o 25-OH apresentaram os maiores efeitos.

O endotélio vascular age como uma barreira, mostrando permeabilidade seletiva para diferentes componentes do plasma. Em 1991, Boissonneault et al publicaram um estudo *in vitro* mostrando o aumento da transferência de albumina em presença de óxidos de colesterol em culturas de artéria pulmonar suína, sendo o CT o mais ativo e os epímeros α -CE e β -CE os menos ativos.

Conforme Weksler et al (1977), a prostaciclina ou prostaglandina I₂ (PGI₂) sintetizada nas células endoteliais é essencial para a integridade vascular e sua redução favorece a agregação de plaquetas e a formação de trombos. Relataram também que o CT inibe a biossíntese de prostaglandina em células da musculatura lisa da aorta de coelhos. Em 1990, Hu et al observaram que 10 μ g/mL de 25-OH ou CT em culturas de células do endotélio vascular humano, inibiram em 60% e 46%, respectivamente, a síntese de PGI₂, porém a presença de α -tocoferol ou probucol (antioxidantes) preveniu o aparecimento deste efeito.

Também já é conhecida a formação de LDL oxidadas (oxLDL) que participam ativamente do processo de aterogênese pela liberação de óxidos de colesterol. A oxidação das LDL *in vitro* promove a deposição de ésteres de colesterila nos macrófagos e nas células lisas arteriais, facilitando a aderência dos monócitos ao

endotélio com penetração no espaço sub-endotelial. As oxLDL aumentam a liberação de MCP-1 e a entrada dos monócitos na parede arterial. Após a ingestão das oxLDL por estes, ocorre o acúmulo de lipídios e a formação de células espumosas. Também as HDL (lipoproteínas de alta densidade ou “high density lipoproteins”) contendo óxidos de colesterol ou seus ésteres apresentam comportamento metabólico alterado com reduzida capacidade de mediar o fluxo de colesterol nas células e conseqüente menor proteção contra aterosclerose (Linseisen e Wolfram, 1998a; Lyons et Brown, 1999). Dentre os efeitos *in vitro* observados para os óxidos de colesterol, o mais diretamente relacionado com o processo de aterogênese é a citotoxicidade contra as células da musculatura lisa da aorta, já comprovada para o β -CE, 7-K, CT e 25-OH.

Esta afirmação está em concordância com o fato de que estes compostos são capazes de produzir lesões ateroscleróticas *in vivo*. Em 1993 Guo et al, dentre outros, também demonstraram o envolvimento dos óxidos de colesterol na diminuição da comunicação intracelular em culturas de hepatócitos de ratos, sendo definida a potência inibidora relativa $25\text{-OH} > \text{CT} > 7\text{-K} > \alpha\text{-CE}$.

É sabido que as LDL, após ligar-se a receptores específicos, são incorporadas e degradadas por diferentes células (células musculares lisas, fibroblastos, células linfóides e endoteliais). O decréscimo ou a modificação destes receptores leva a hipercolesterolemia e predisposição para a aterosclerose. Desde a década de 70, tem sido demonstrado que os óxidos de colesterol reduzem a incorporação das LDL e que este efeito é dependente da dose, sendo significativo em concentrações de $1,0 \mu\text{M}$, a qual é muito próxima dos níveis plasmáticos normais ($0,2$ a $0,6 \mu\text{M}$). As moléculas α -CE, β -CE, CT, 7-K, 25-OH e 26-OH mostraram habilidade para modificar os receptores das LDL, alterando o metabolismo do colesterol (Peng et al, 1991). Este mecanismo ainda não foi totalmente estabelecido, mas parece que os óxidos de colesterol se unem a uma proteína citosólica. Também tem sido proposto que os óxidos de colesterol inibem a transcrição do mRNA para certas enzimas envolvidas na biossíntese dos receptores das LDL.

Os óxidos de colesterol também podem modificar o acúmulo de ésteres de colesterila em diferentes células e, conseqüentemente, induzir a formação de células espumosas. Este fato poderia explicar as altas concentrações de ésteres de colesterila em células espumosas derivadas dos macrófagos. Entretanto em 1994, Maor e

Aviram concluíram que, na incubação de macrófagos com oxLDL, o acúmulo celular de colesterol esterificado ocorria como resultado do aprisionamento destes ésteres no compartimento lisosomal dos macrófagos e não pela ativação da hidrólise lisosomal de ésteres de colesterol.

Também já foi comprovado que o 7-K, em altas concentrações, inibe a liberação do NO (óxido nítrico) em células vasculares do endotélio humano. O NO é citotóxico a uma grande variedade de células e induz a apoptose em culturas de células lisas e do endotélio vascular, o que leva a participação indireta do 7-K no desenvolvimento da aterosclerose (Lyons e Brown, 1999).

Estudos já comprovaram que após administração intravenosa de 25-OH, CT, α -CE, β -CE ou 7-K, ocorre a formação de lesões arteriais em coelhos após um breve tempo, enquanto que a injeção de colesterol não as induz (Guardiola et al, 1996). Com o uso de microscopia eletrônica foi demonstrado que, 24 horas após a injeção intravenosa de CT ou 25-OH, aparecem estas alterações, o que corrobora esta teoria apesar de ainda existirem resultados não conclusivos.

Por estes fatos, atualmente aceita-se que os óxidos de colesterol e não o colesterol, são os verdadeiros agentes indutores de lesões ateromatosas (Chisolm et al, 1994; Suarna et al, 1995). Apesar dos resultados obtidos, é importante salientar que nos estudos *in vitro* e *in vivo* com a utilização de vários tipos de animais, geralmente utilizam-se concentrações fisiologicamente elevadas dos óxidos de colesterol dispersos em soluções orgânicas como etanol ou clorofórmio, o que pode influenciar os resultados finais, conforme Lyons e Brown (1999).

2.2.3 Mutagênese e carcinogênese

Diferentes estudos demonstraram que vários óxidos de colesterol apresentam efeitos mutagênicos em microorganismos (Linseisen e Wolfram, 1998a). Mais recentemente, estes efeitos também foram observados em culturas de células de mamíferos, em particular para os hidroperóxidos de colesterol. Entretanto, há evidências que sugerem que os óxidos de colesterol não são os responsáveis diretos por estes efeitos, uma vez que os mesmos podem ser inibidos ou induzidos pelas enzimas catalase e superóxido dismutase (Guardiola et al, 1996).

Este fato gerou a teoria de que alguma espécie de oxigênio ativo é o verdadeiro agente mutagênico. Suspeita-se do íon peróxido (O_2^{2-}) que pode ser gerado a partir do íon superóxido (O_2^-) advindo da reação do O_2 com hidroperóxidos de colesterol. Esta teoria é reforçada pelo fato de que a enzima catalase inibe esta ação e pela observação de que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também apresenta caráter mutagênico a muitas bactérias. Uma outra hipótese sugere que o agente mutagênico possa ser o produto da reação entre os hidroperóxidos de colesterol e o íon peróxido. Estas informações foram sumarizadas por Guardiola et al (1996) conforme a figura 4.

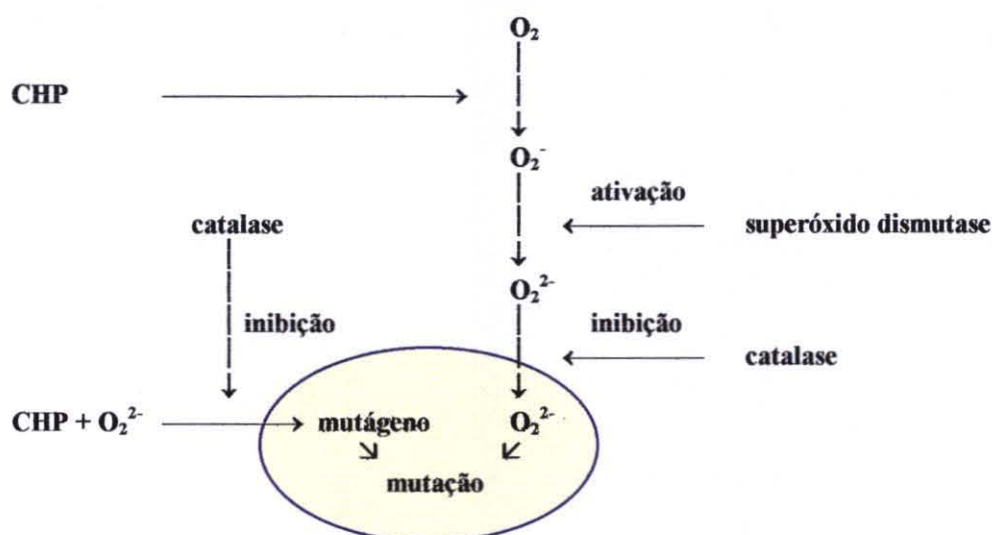


Figura 04: Possíveis mecanismos mutagênicos dos hidroperóxidos de colesterol (CHP) em combinação com espécies ativas do oxigênio (Guardiola et al, 1996)

Alguns óxidos de colesterol ($CT > \beta\text{-CE} > \alpha\text{-CE}$) foram identificados como inibidores da incorporação de timina ao DNA. A inibição da síntese do DNA pelos derivados $7\alpha\text{-OH}$, $7\beta\text{-OH}$, 7-K , 24-OH e 25-OH também foi relatada por Smith e Johnson (1989). Um dos mecanismos sugerido é o aumento do influxo de cálcio através da membrana celular que é determinado pela razão colesterol / fosfolípidios presente na mesma, sendo que a incorporação dos óxidos de colesterol modifica esta razão. Estudos realizados em lipossomas revelaram que esta incorporação modifica a barreira de energia potencial da membrana celular, alterando a condução de íons inorgânicos como o Ca^{2+} através da mesma (Krull et al, 1985).

Das anomalias verificadas pela exposição aos óxidos de colesterol, podemos destacar a formação de sarcomas locais em camundongos após administração subcutânea, os danos cromossômicos nos fibroblastos de pele humana exposta a estes compostos, as transformações em células embrionárias de hamster por efeito da exposição a α -CE e CT e a presença abundante de óxidos de colesterol em secreções e excreções de pessoas com problemas hiperplásicos (Guardiola et al, 1996). Além da associação positiva do α -CE com o câncer de pele induzido por radiação UV em humanos e ratos, outros trabalhos também mencionam a correlação entre o CT e o câncer do cólon e a ação das formas epiméricas α -CE e β -CE nos cânceres da mama e da próstata. Estudos *in vitro* confirmam os efeitos mutagênicos destes derivados oxidados, porém estas investigações ainda estão nos estágios intermediários, não permitindo qualquer conclusão para situações *in vivo*.

2.2.4 Estrutura e funcionalidade da membrana celular

Conforme Alberts et al (1999), a célula é um sistema auto-reprodutivo mantido dentro de um recipiente funcional que é a membrana citoplasmática. Além de conter o citoplasma, a membrana também deve selecionar e admitir os nutrientes e permitir a excreção dos produtos residuais. As membranas celulares são compostas de proteínas e lipídios e apresentam a estrutura vista na figura 5.

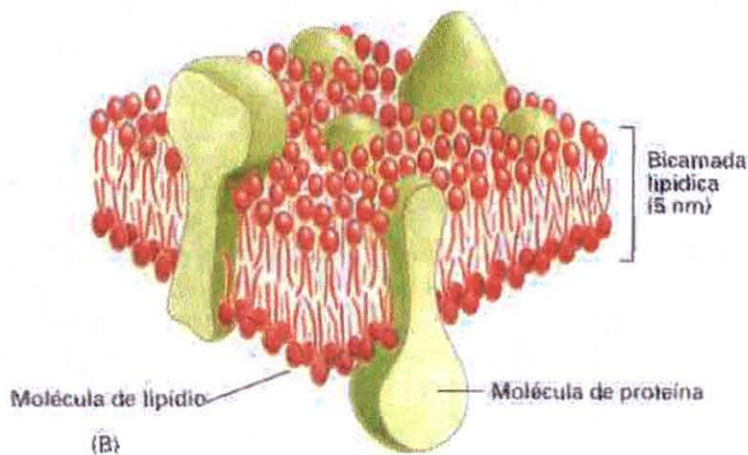


Figura 05: Estrutura da membrana celular, composta de lipídios (vermelho) e proteínas (verde), conforme Alberts et al (1999)

Os lipídios estão dispostos em um arranjo de dupla camada, o qual fornece a estrutura básica e confere parte da permeabilidade da célula. Os mais comuns são os fosfolipídios que apresentam características anfipáticas (hidrofílicas e hidrofóbicas nas extremidades opostas), sendo a fosfatidilcolina a molécula mais frequentemente encontrada. Além dos fosfolipídios, também estão presentes os glicolipídios como a galactocerebrosídeo e o colesterol que é exclusivo das células animais. As proteínas que se encontram distribuídas ao longo da bicamada, mediam a maior parte das outras funções da membrana como os fenômenos de transporte transcelular, conferindo às células suas características individuais, conforme Alberts et al (1999).

Nas células animais, a fluidez da membrana celular é quase totalmente modulada pela presença do colesterol que preenche os espaços entre os fosfolipídios, enrijecendo a bicamada e tornando-a menos fluída e permeável. É essencial que o colesterol seja incorporado à membrana celular, a fim de possibilitar a execução das suas funções normais. Em ensaios *in vitro*, Paulet et al (1988) demonstraram que os óxidos de colesterol, por terem similaridade estrutural com o colesterol apesar de serem mais polares, podem ser erroneamente incorporados à membrana celular substituindo este último com conseqüentes mudanças na sua fluidez, estabilidade e permeabilidade além de distorcer as proteínas presentes, afetando os seus desempenhos na movimentação transcelular de nutrientes e resíduos (figura 6).

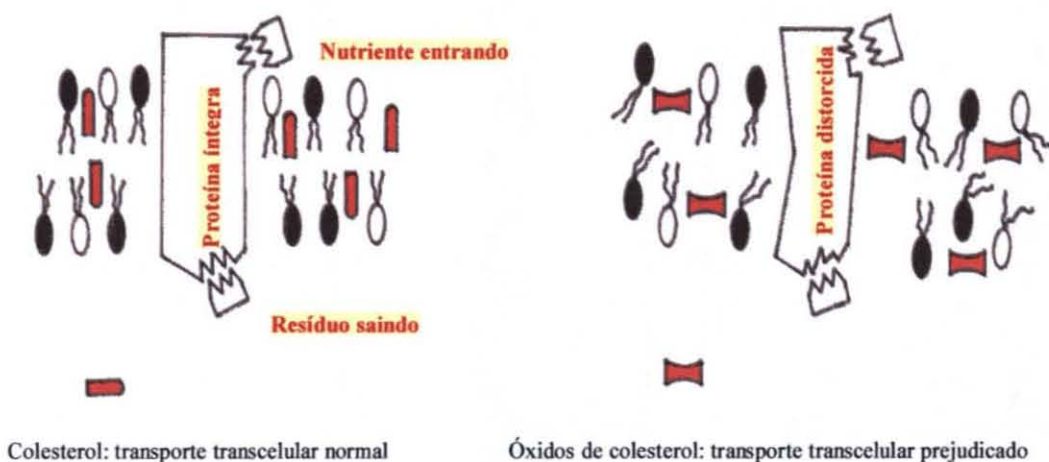


Figura 06: Deformação da membrana celular pela incorporação de óxidos de colesterol no lugar do colesterol, alterando sua estrutura, permeabilidade e transporte transcelular de nutrientes e resíduos pelas proteínas, conforme Paulet et al (1988)

Teoria bastante interessante foi apresentada por Guardiola et al (1995) segundo a qual, os óxidos de colesterol encontrados nas membranas celulares também poderiam ser o resultado da oxidação das moléculas de colesterol, normalmente ali presentes, pela existência de agentes oxidantes extracelulares. Desta forma, o colesterol poderia estar atuando como um antioxidante para estes agentes, função esta que não pode ser executada pelos óxidos de colesterol. A deficiência de colesterol na membrana celular poderia, então, expor o interior das células a estes agentes oxidantes, com conseqüências catastróficas.

A presença dos óxidos de colesterol nas membranas ainda afeta a estrutura das proteínas, dos fosfolípidios e acentua a forma helicoidal das proteínas nos eritrócitos humanos (Smith e Johnson, 1989). Também reduz a habilidade de empacotamento das cadeias de fosfolípidios não polares quando incorporados aos lipossomas, afeta a utilização das hexoses, prejudica a atividade da Na/K adenosina trifosfatase, causa modificações morfológicas nas células de glioma humano conforme demonstrado com o auxílio de microscopia eletrônica e modifica o influxo de cálcio como já citado anteriormente (Linseisen e Wolfram, 1998a; Lyons e Brown, 1999).

2.2.5 Inibição de enzimas

Os óxidos de colesterol podem modificar a atividade de várias enzimas, principalmente aquelas relacionadas com o metabolismo dos esteróis. O efeito mais importante é a inibição da HMG-CoA redutase que é uma enzima chave para a síntese do colesterol endógeno (Linseisen e Wolfram, 1998a; Guyton e Hall, 2002). Esta enzima está associada à transformação do 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A a mevalonato e sua atividade é regulada pela retroalimentação (“feedback”) do fígado para a síntese do colesterol que diminui a atividade da mesma quando o colesterol exógeno aumenta. Vários óxidos de colesterol mostraram-se inibidores desta enzima, com ênfase para aqueles com o grupo OH livre na posição 3, aumentando sua interferência pela adição de outros grupos oxigenados distantes desta posição. Deste modo, os compostos 20-OH, 25-OH, 26-OH e derivados no anel D são os mais ativos (Guardiola et al, 1996). Com base nestes fatos, alguns óxidos de colesterol têm sido testados como drogas que poderiam ser usadas no controle da

hipercolesterolemia. Estudos identificaram que o 3β -hidroxi- 5α -colest-8-eno-15-ona é um excelente inibidor *in vitro* e *in vivo* (ratos e macacos) da HMG-CoA redutase, porém ele também inibe a acetoacetil CoA tiolase, a HMG-CoA sintetase e enzimas cistolíticas (Smith e Johnson, 1989). Em 1992, Pinkerton et al relataram o efeito sinérgico entre este derivado e o 25-OH. Estudo farmacocinético sobre a repressão da HMG-CoA redutase foi realizado e, após administração intragástrica, foi observado um máximo na concentração hepática após 4 horas, declinando ao nível de controle após 8 horas. Conforme Dollis e Schuber (1994), outro alvo potencial para o desenvolvimento de drogas hipocolesterolêmicas são os inibidores de ciclase do 2,3-oxidoesqualeno-lanosterol pois a formação do 24,25-EC reduziria o lanosterol, reprimindo a ação da HMG-CoA redutase nas células hepáticas.

Os possíveis mecanismos para este efeito são controversos e a participação de mais de um deles é provável. Como a atividade de enzimas isoladas *in vitro* não é inibida, sugeriu-se que a integridade celular seria necessária para tal efeito (Smith e Johnson, 1989). Os prováveis mecanismos, conforme Guardiola et al (1996), envolvem a inibição da síntese, a degradação da enzima, a modificação da estrutura ou a ligação com óxidos de colesterol, formando proteínas cistolíticas (figura 7).

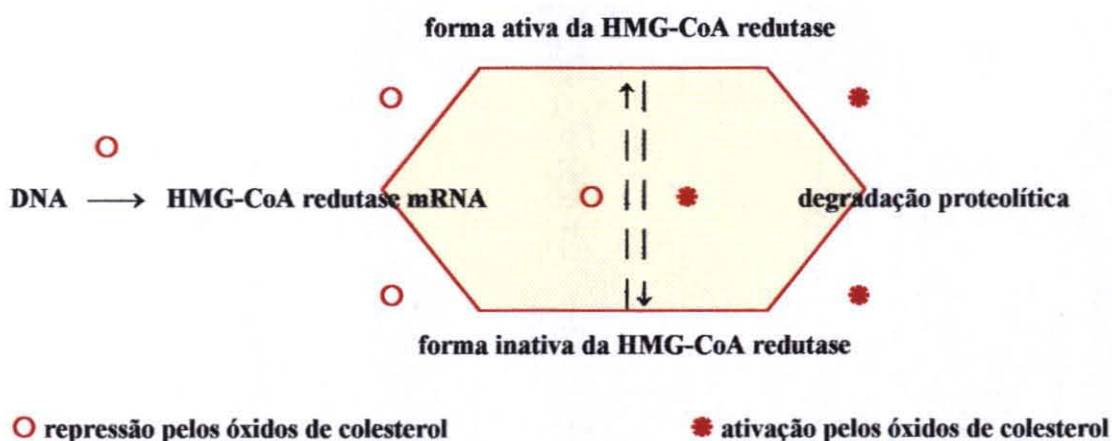


Figura 07: Possíveis mecanismos de repressão e ativação da HMG-CoA redutase pelos óxidos de colesterol, conforme Guardiola et al (1996)

Esta ação é modulada pelo aumento da degradação da HMG-CoA redutase por alterações na membrana do retículo endoplasmático ou pela inibição da síntese da mesma a nível transcripcional ou pós-transcripcional. Como consequência, ocorre a

redução da síntese endógena do colesterol, agravado pelo fato de que os óxidos de colesterol são potentes ativadores da esterificação intracelular do colesterol pelo aumento da ação da ACAT (colesterol acil coenzima A transferase) por mecanismo ainda incerto, reduzindo ainda mais a disponibilidade do colesterol plasmático para as células.

Apesar da inibição da HMG-CoA redutase ser a mais estudada, efeitos sobre outras enzimas envolvidas no metabolismo de esteróis também já foram relatados. Em mais de 20 estudos revisados por Smith e Johnson (1989), além de outros autores listados abaixo, foram identificados e relatados os seguintes efeitos inibidores ou potencializadores:

- Aumento da atividade da ACAT pelo 7-K e pelo 25-OH em diferentes modelos moleculares (Cheng et al, 1995);
- Durante a síntese dos hormônios esteróides, 2 novos grupos OH devem ser introduzidos nos carbonos C₂₀ e C₂₂ do colesterol e a cadeia lateral de 8 carbonos existente no C₁₇ deve ser eliminada. Este sistema enzimático é bastante afetado pela presença de vários óxidos de colesterol como o 7 α -OH, 7 β -OH, 20-OH, 22-OH e 25-OH (Heyl et al, 1986; Smith, 1996);
- A enzima colesterol-7 α -hidrolase está envolvida na biossíntese humana dos ácidos biliares que ocorre nos microsossomos do fígado, sendo inibida pela presença de 7 α -OH, 7 β -OH e 7-K. Porém, conforme relatado por Tamasawa et al (1994), efeito oposto cuja causa ainda não foi explicada, ocorre com os derivados 7-K e 7 β -OH quando administrados a ratos;
- Foi demonstrado em estudo *in vitro* que a enzima colesterol-5,6-epóxi hidrolase que biotransforma as formas epiméricas α e β do CE a CT é fortemente inibida pela presença de 7-K e do próprio CT, dentre outros óxidos de colesterol (Smith e Johnson, 1989);
- As enzimas metilesterol oxidases são a chave para a transformação do lanosterol a colesterol sendo que, conforme vários pesquisadores, as mesmas são inibidas *in vivo* (porquinhos da índia e ratos) por vários óxidos de colesterol como o CT e o 25-OH (Tabacik et al, 1987). Uma das enzimas mais estudadas deste sistema foi a 4-metilesterol oxidase microsossomal.

2.3 Formação dos óxidos de colesterol *in vivo*

Conforme revisão realizada por Smith (1996), os óxidos de colesterol são produzidos em praticamente todos os animais, incluindo os mamíferos e os microorganismos. Considerando-se o metabolismo humano, a presença de diminutas quantidades de óxidos de colesterol produzidos *in vivo* (por via enzimática ou não) é aceita como normal, pois os mesmos são intermediários importantes na produção de vários compostos biologicamente necessários. Em levantamento efetuado por Linseisen e Wolfram (1998a), pessoas saudáveis apresentaram produtos de oxidação do colesterol em quantidades mensuráveis no plasma, como exibido na tabela 1.

Tabela 01: Óxidos de colesterol presentes no plasma de voluntários saudáveis (n = 9), conforme Linseisen e Wolfram (1998a)

Oxido de colesterol	Concentração em mg/L
7 α -OH	2,98 \pm 0,04
7 β -OH	3,54 \pm 0,04
β -CE	0,89 \pm 0,08
α -CE	0,32 \pm 0,02
CT	0,13 \pm 0,01
7-K	4,45 \pm 0,12
25-OH	0,24 \pm 0,04
Total	12,55 \pm 0,24

Basicamente, existem pelo menos três rotas para as oxidações enzimáticas que podem contribuir para o aparecimento destes derivados oxidados nos tecidos dos mamíferos: as monohidroxilações dirigidas principalmente para a biossíntese dos ácidos biliares e dos hormônios esteróides, a oxidação do grupo OH da posição 3 β para formar a cetona correspondente e biossíntese do lanosterol-24,25-epóxi via ciclização do 2,3,22,23-bis-epóxi-esqualeno ou epoxidação do lanosterol formando CE nas suas formas epiméricas α e β . Um dos ensaios que comprovou a formação de óxidos de colesterol *in vivo* foi descrito em 1994 por Johnson et al, no qual a

administração oral de D₂O (água deuterada) a ratos, causou o aparecimento do derivado oxidado 25-OH marcado com deutério.

A oxidação enzimática do colesterol ocorre principalmente pela ação de enzimas do P-450 do fígado. Uma das mais estudadas é a colesterol-7 α -hidroxilase que atua na etapa limitante da conversão do colesterol a ácidos biliares. Fora do fígado, é destacada a ação da colesterol-26-hidroxilase encontrada nos fibroblastos, células vasculares endoteliais, macrófagos e células do cérebro e do rim. A mesma é utilizada na eliminação do excesso de colesterol via oxidação enzimática, formando o 26-OH e o ácido 3 β -hidroxi-5-colestenóico, os quais são transportados para o fígado e convertidos a ácidos biliares. Este é um possível mecanismo de defesa do organismo ao excesso de colesterol.

Conforme Smith (1996), a biossíntese dos hormônios esteróides C₂₁ requer a hidroxilação do colesterol no C₂₀ e no C₂₂, formando 20-OH, 22-OH e CT. A cisão subsequente destas ligações produz a pregnolona. Seqüência semelhante sobre a Δ^4 -3-cetona derivada dos epímeros α e β do CE produz progesterona. O 19-OH, já identificado, pode ser o intermediário na remoção do grupo metila angular, levando a produção dos 19-noresteróides. Outro derivado já comprovado advém da oxidação do colesterol pela 3 β -hidroxi-esterol dehidrogenase produzindo colest-5-eno-3-ona com subsequente isomerização da dupla Δ^5 para Δ^4 . Várias formas monohidroxiladas do colesterol já foram identificadas como o 4 β -OH (de 20 a 600 ng/L no soro), mas tanto sua função como seu mecanismo de formação ainda não foram determinados. Adicionalmente, a produção de óxidos de colesterol por via enzimática também é possível pela ação das enzimas dehidrogenase e deoxigenase, mas a sua significância em humanos ainda não foi claramente documentada.

A biossíntese do 7 α -OH ocorre pela ação da enzima colesterol-7 α -hidroxilase que é encontrada no plasma em concentrações nM, sendo dirigida principalmente para a síntese dos ácidos biliares. Ácidos com orientação 7 β também já foram observados, sugerindo a interconversão entre as formas 7 α e 7 β . Porém, já se comprovou que os monocistomacróforos humanos podem sintetizar o 7 β -OH. A enzima hepática mitocondrial colesterol-25-hidroxilase também está envolvida na síntese dos ácidos biliares através de caminho alternativo que forma o ácido 3 β -hidroxi-25-colest-5-eno-26-óico que é então transformado a estes compostos.

A formação não enzimática *in vivo* de derivados oxidados pode ser induzida por espécies reativas do oxigênio como O_3 , 1O_2 , ROO^* , RO^* , $HOCl$ ou ClO^* , HO^* e NO / NO_2 (Smith, 1996; Johnson et al, 1994). Entretanto, outro importante mecanismo deve ser considerado segundo o qual, ácidos graxos poliinsaturados ou PUFA (“polyunsaturated fatty acids”) inicialmente esterificam o colesterol, formando ésteres poliinsaturados de colesterila. Estes estão sujeitos à oxidação, gerando ésteres contendo grupo hidroperóxido no radical acila, o qual pode ser transferido para o radical colesterila formando ésteres de 7(α ou β)-hidroperóxido de colesterila. As duas espécies podem ser reduzidas gerando 7 α -OH e 7 β -OH ou desidratadas para formar 7-K. Durante o processo, a dupla ligação Δ^5 pode ser envolvida produzindo α -CE e β -CE e, posteriormente, CT. Os carbonos terciários C_{20} e C_{25} também podem ser oxidados gerando os derivados 20-OH e 25-OH (Smith, 1996). Deve ser notado que este caminho é rigorosamente o mesmo apresentado na figura 3. Na oxidação das LDL *in vitro* por íons metálicos pró-oxidantes como o Cu^{2+} e Fe^{3+} ou em células da parede arterial, já foi demonstrado que o processo sempre se inicia na fração poliinsaturada do radical acila podendo, posteriormente, ser transferido para o radical colesterila, produzindo finalmente os óxidos de colesterol por hidrólise destes ésteres (Linseisen e Wolfram, 1998a).

Em 1996, Björkhem et al demonstraram a formação *in vivo* (ratos) dos derivados 7 α -OH, 7 β -OH, 7-K, 24-OH, 25-OH e 27-OH usando técnica de inalação de $^{18}O_2$ e identificando a presença destes compostos marcados com o isótopo ^{18}O . Evidência indireta da formação não enzimática *in vivo* do α -CE, β -CE, CT, 7 α -OH e 7 β -OH também foi demonstrada quando a administração de probucol, um conhecido antioxidante, através da ração de coelhos, causou o decréscimo destes derivados no plasma e no tecido aórtico destes animais. Em outro estudo, a administração de BHT (butil-hidroxi-tolueno) produziu resultados semelhantes (Linseisen et al, 1998).

Estudos indicam que o padrão de formação 7-hidroperóxidos (α e β), 7-diols (forma β predominante), 7-K, 5,6-epóxi (forma β predominante) e CT é obtido pela auto-oxidação do colesterol. O mesmo padrão sem os 7-hidroperóxidos e com a forma α predominante para o 5,6-epóxi sugere mecanismo de reação por radical HO^* . Já a oxidação do colesterol por radical ROO^* produz o padrão 7-diols (α e β), 7-K e 5,6-epóxi (Sander et al, 1989; Nourooz-Zadeh, 1990).

Pesquisas envolvendo as formas reativas $^1\text{O}_2$, O_3 , HOCl e ClO^- indicam a necessidade de estudos complementares. Padrões que incluem os 5α -hidroperóxidos indicam a oxidação do colesterol pela forma singlete $^1\text{O}_2$ e a presença de 3β -hidroxicolest-4-eno-6-hidroperóxido reforça a ocorrência deste modelo (Candide et al, 1988). Exposição a O_3 produz diferentes ozonetos como o 1,2,4-trioxolano e seu produto de degradação, o 3β -hidroxi-5,6-colestane-3,6-diona. Reações com as espécies HOCl e ClO^- produzem esterol-halohidrinás, fato que já foi comprovado *in vivo* em experimentos com os microorganismos *Withania somnifera* e *Xestospongia sp* (Bessalle e Lavie, 1992; Shimura et al, 1994). Este mecanismo, ainda não totalmente esclarecido, produz espécies como o 5-cloro- 5α -colestene- $3\beta,6\beta$ -diol e o 6-cloro- 5α -colestene- $3\beta,5$ -diol, dentre outros.

2.4 Formação dos óxidos de colesterol nos alimentos

Examinando a estrutura química do colesterol, verificamos tratar-se de uma molécula reativa, passível de oxidação não enzimática por diversos agentes como temperatura, disponibilidade de oxigênio, radiações, metais pró-oxidantes e ácidos graxos poliinsaturados, dentre outros. Esta oxidação ocorre principalmente na dupla ligação localizada nos carbonos $\text{C}_5 - \text{C}_6$, no grupo OH β -orientado do carbono C_3 , no C_7 por rearranjo alílico e nos carbonos terciários C_{20} e C_{25} , conforme Caboni et al (1997). O padrão de oxidação e os conseqüentes derivados oxidados produzidos dependem do agente que provoca esta transformação. O resumo destas informações pode ser visto a seguir.

2.4.1 Oxigênio e derivados

Conforme Kubow (1992), o termo auto-oxidação que descreveria a reação direta do oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) com biomoléculas como os lipídios e o colesterol é mal empregado, uma vez que a barreira termodinâmica deste estado fundamental do oxigênio proíbe esta reação. Para que isto ocorra, a ativação para o estado excitado singlete ($^1\text{O}_2$) é necessária, o que pode ocorrer pela adição direta de energia na forma de radiação visível / ultravioleta ou por intermédio de algum catalisador enzimático

ou não. Entretanto, uma vez iniciada, esta reação se torna autocatalítica pois os produtos formados aceleram a mesma, causando incremento na taxa de oxidação à medida que ela se desenvolve.

Antagonicamente, conforme publicado por Beckwith et al (1989), a iniciação deste processo foi estudada por espectroscopia de ressonância de spin eletrônico, demonstrando a formação de radical alílico C₇ com subsequente reação com o oxigênio tripleto ³O₂, conforme estes autores.

Na oxidação do colesterol, a primeira etapa é a abstração de um átomo de hidrogênio, geralmente do C₇ (estabilização pela dupla ligação adjacente e formação de radical alílico) ou dos carbonos C₂₀ e C₂₅ (estabilização pela estrutura terciária). O radical R* formado reage com oxigênio para formar a espécie peroxila ROO*, o que ocorre rapidamente pois a concentração deste último é bem maior que a concentração do radical colesterila na maior parte dos alimentos analisados, conforme descrito por Gordon (2000). A subsequente reação do radical colesterol-peroxila com outra molécula de colesterol gera colesterol-hidroperóxido e um novo radical colesterila. Devido à estabilização por ressonância, pode ocorrer a migração da dupla ligação ou do próprio radical, gerando isômeros em outras posições, conforme Kubow (1992). Outra alternativa já comprovada é o ataque da molécula de colesterol por radical peróxido, incluindo o próprio colesterol-peroxila, gerando um anel epóxi nas posições C₅ – C₆ nas duas formas epiméricas (α e β), as quais, por hidrólise, geram, CT através de mecanismo intermolecular, conforme Smith (1981).

Ainda conforme Kubow (1992), vários outros caminhos alternativos poderiam ser imaginados mas, por uma questão de estabilidade dos intermediários, a oxidação do colesterol deve seguir a rota abaixo:

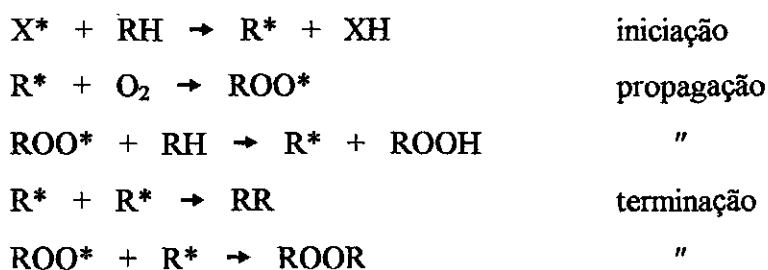


Figura 08: Mecanismo de oxidação do colesterol (RH), conforme Kubow (1992)

Nas carnes e hambúrgueres, certos heme-compostos podem agir como substâncias fotosensibilizadoras, acelerando o processo descrito. Enzimas como a lipoxigenase, peroxidase, cicloxigenases e os citocromos P-450 também podem participar ativamente na iniciação do processo oxidativo, mesmo em condição *postmortem* conforme Rhee (1988).

Como já citado, a exposição a espécies reativas como O_3 , NO / NO_2 , $HClO_e$ ClO^- também pode iniciar o processo oxidativo (Smith, 1996; Johnson et al, 1994). Entretanto, deve ser destacado que estas espécies não são normalmente encontradas em contato com carnes e hambúrgueres, exceto no caso do O_3 que pode ser gerado nas gôndolas dos açougues e supermercados, em função de iluminação inadequada que apresente componente ultravioleta na sua distribuição espectral.

Um caso interessante foi publicado por Caboni et al (1995) no qual, carne fresca embalada em filme plástico transparente foi analisada. O filme utilizado era permeável ao O_2 , favorecendo a oxidação do colesterol devido à presença de fotocatalisadores como a hemoglobina e hematoporfirinas que facilitavam a transição 3O_2 à 1O_2 . Nesta situação, foi determinado que 8 horas de exposição à luz néon da gôndola do supermercado aumentava em 10 vezes o conteúdo de óxidos de colesterol inicialmente presente. Entretanto, a intensidade da oxidação mostrou ser diretamente dependente do espectro da radiação. De fato, carne exposta à luz vermelha por 8 horas, apresentou apenas o dobro da quantidade de óxidos de colesterol inicialmente presente, conforme Tassinari (1998). Deste modo, iluminação com distribuição espectral adequada e embalagem não permeável ao oxigênio devem ser utilizadas para a conservação dos alimentos de origem animal, como as carnes e derivados.

Uma vez que o oxigênio é um dos agentes de fundamental importância no processo oxidativo, é de se esperar que sua ausência reduza a formação dos óxidos de colesterol nos alimentos, aumentando o prazo de validade sob este ponto de vista. De fato, dentre vários trabalhos já publicados, podemos citar o de Shozen et al (1997), no qual, o uso de embalagem a vácuo somada a adição de um seqüestrante de oxigênio, foi a combinação mais efetiva na diminuição da taxa de formação de óxidos de colesterol durante a estocagem de anchovas. Conforme suas conclusões, amostras assim protegidas por 165 dias a $25^\circ C$ apresentaram concentrações de óxidos de colesterol similares a amostras com 14 dias sem esta proteção.

2.4.2 Temperatura

Estudos têm sido conduzidos, comprovando-se a dependência da velocidade de oxidação do colesterol com a temperatura de processamento dos alimentos, como citado nos trabalhos de Chien et al (1998) e Kesava-Rao et al (1996), dentre outros. Conforme Kim e Nawar (1993), o colesterol puro é bastante resistente à oxidação. A 110 e 120°C, menos de 10% do colesterol é oxidado após 80 horas de aquecimento. A 125°C, apenas 10% é oxidado após 20 horas de aquecimento quando o início da fusão se torna visível, o que ocorre abaixo do seu ponto de fusão (148,5°C) devido à presença de impurezas. A partir deste ponto, a oxidação aumenta rapidamente chegando à cerca de 80% após 80 horas. Entre 135 e 180°C, a oxidação é bastante intensa e mais de 80% já se encontra oxidado após 1 hora de aquecimento (figura 9).

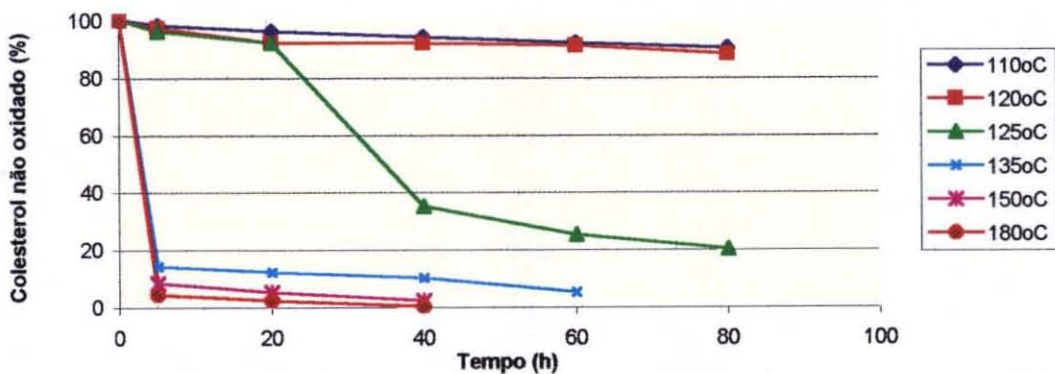


Figura 09: Efeito da temperatura e do tempo de aquecimento na oxidação do colesterol (n = 2), conforme Kim e Nawar (1993)

Os mesmos autores avaliaram a formação do 7-K (derivado mais importante podendo perfazer mais de 50% da fração oxidada) utilizando filmes de 1 mg obtidos pela evaporação de solução de colesterol em clorofórmio. Verificaram que até 120°C, menos de 2% do colesterol era oxidado mesmo após 100 horas de aquecimento. Entretanto a 140°C, mais de 12% do colesterol já havia se transformado a 7-K em poucas horas, como visto na figura 10. Estes dados indicam que na temperatura de cozimento (90 – 100°C), nenhum ou pouco colesterol será oxidado. Já os alimentos assados ou fritos, por serem submetidos a temperaturas mais elevadas (120 – 180°C), apresentam maiores condições para a formação destes derivados oxidados.

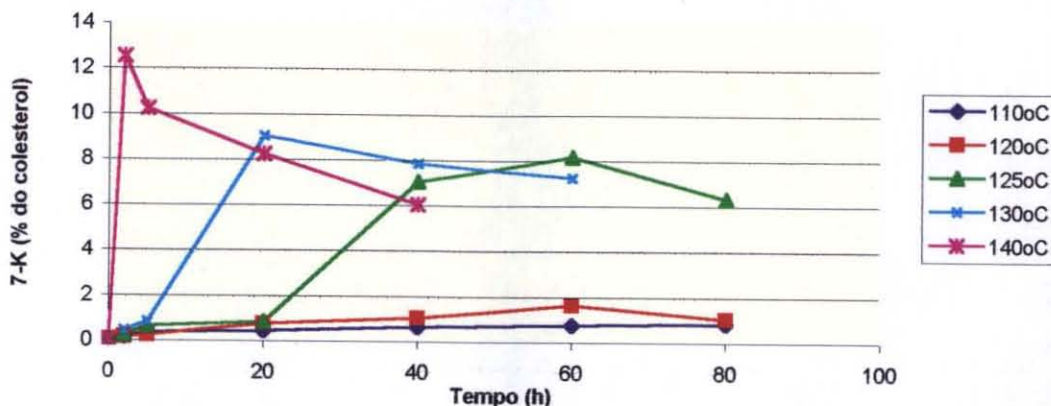


Figura 10: Efeito da temperatura e do tempo de aquecimento na oxidação do colesterol a 7-K ($n = 2$), conforme Kim e Nawar (1993)

Como a formação dos óxidos de colesterol ocorre segundo mecanismo de interconversão, a quantidade e os tipos de produtos oxidados observados depende da temperatura e do tempo de aquecimento. De fato, Chien et al (1998) publicaram que os 7-hidroperóxidos e 7-hidróxidos são detectados logo no início do aquecimento mas suas concentrações atingem um valor constante após este período inicial, provavelmente pela subsequente conversão a 7-K por desidratação e desidrogenação, respectivamente. Já o 7-K e os CE (α e β) apresentam taxa crescente durante todo período de aquecimento por serem moléculas estáveis e terminais no processo oxidativo. Em função desta estabilidade, o 7-K é geralmente utilizado como indicador de oxidação do colesterol (Park e Addis, 1985; Penazzi et al, 1995).

Já foi comprovado que a estocagem de carnes após aquecimento, mesmo por pequenos períodos, propicia a continuidade do processo oxidativo aumentando a quantidade dos óxidos de colesterol e alterando as suas distribuições relativas, o que pode ser justificado por ser este, um processo autocatalítico (De Vore, 1988; Mielche e Bertelsen, 1994; Mielche e Bertelsen, 1995). O mesmo ocorre pelo reaquecimento dos alimentos de origem animal (Keler e Grosch, 1997). Conforme os trabalhos de Kesava-Rao et al (1996) e Pie et al (1991), carnes já processadas, quando estocadas a temperatura de 4°C , apresentaram um aumento significativo nas concentrações de óxidos de colesterol, o mesmo ocorrendo quando estocadas a -10°C . Somente quando armazenadas a -20°C , apresentaram apenas uma discreta alteração nas concentrações destes derivados oxidados, mesmo em períodos longos como 90 dias.

2.4.3 Ácidos graxos poliinsaturados

Vários trabalhos confirmam a estabilidade do colesterol puro ao calor (Osada et al, 1993a; Kim e Nawar, 1993; Park e Addis, 1986). Entretanto, os mesmos autores verificaram que se este fosse aquecido na presença de triglicérides, ocorria oxidação com taxa bastante variável. Quando foram utilizadas gorduras relativamente saturadas como sebo e triestearina, os derivados oxidados só foram observados após longos períodos de aquecimento. Já a utilização de óleos insaturados como soja, linhaça, girassol e trioleína, produziram derivados oxidados muito mais rapidamente e em maior quantidade. Também concluíram que a 120°C, a oxidação já se processa de acordo com taxa discreta mas quantificável, sendo que a máxima taxa ocorre por volta de 150°C. Após esta temperatura, a formação de óxidos de colesterol deve ser suplantada pela sua destruição térmica, visto que as quantidades passam a ser reduzidas até atingir valores não mensuráveis.

Conforme Ohshima et al (1993), o colesterol puro mantido por 104 dias a 25°C, praticamente não apresentou óxidos de colesterol mas, na presença de triglicérides, já exibia estes derivados após apenas 24 dias. Trabalhando com peixes grelhados, Shozen et al (1995) concluíram que espécimes com baixos teores de lipídios apresentaram formação mais lenta de óxidos de colesterol enquanto que aqueles mais gordurosos, apresentaram oxidação mais rápida e abundante.

Quando aquecido com óleos insaturados, em particular com óleo de sardinha, o colesterol apresenta rápida e abundante oxidação em tempo inferior à 1 hora. Os produtos predominantes desta oxidação são o 7-K e os CE nas duas formas (α e β). Quantidades bem pequenas de 7 α -OH, 7 β -OH e CT também podem ser observadas (Osada et al, 1993a; Osada et al, 1993b).

Ficou ainda comprovado que a velocidade e o grau de formação dos óxidos de colesterol varia diretamente com a insaturação dos ácidos graxos, ou seja, quanto mais insaturado for o ácido graxo, maior e mais rápida será a oxidação do colesterol (Li et al, 1994; Nielsen et al, 1996). Esta conclusão advém do fato que os ácidos graxos poliinsaturados apresentam grande facilidade para formar radicais livres e hidroperóxidos os quais, poderiam iniciar a reação de oxidação do colesterol. Vários pesquisadores realizaram experiências com peixes, óleos vegetais, ovos e misturas

sintéticas comparando a oxidação do colesterol puro com amostras contendo diferentes ácidos graxos poliinsaturados, concluindo ser esta associação verdadeira.

Dois caminhos podem ser seguidos na iniciação do processo oxidativo do colesterol. No primeiro, denominado mecanismo intermolecular, o colesterol pode ser atacado por um radical peroxila livre, dando origem a um radical colesterila. No segundo, intitulado mecanismo intramolecular, pode ocorrer a transferência de um átomo de hidrogênio da fração colesterila para a fração acetila, dentro de uma mesma molécula de éster de colesterila (Kim e Nawar, 1991; Li et al, 1994; Smith, 1996).

2.4.4 Água e pH

Conforme estudo de Kim e Nawar (1993), a oxidação do colesterol é acelerada pela presença de água e de sais. Nestes experimentos, tubos contendo 1 mg de colesterol na forma de filme foram aquecidos em estufa a 75°C, sendo analisados colesterol puro, com a adição de 1 mL de água destilada ou com a adição de 1 mL de tampão 10 mM de tri-(hidroxi-metil)-aminometano (Tris). Mesmo após 6 dias de aquecimento, o colesterol puro mostrou baixa formação de óxidos de colesterol com menos de 10% do total sendo oxidado. Nos frascos com água destilada, a reação foi um pouco mais intensa, chegando a 20% no mesmo período. Nas amostras com tampão, o processo oxidativo foi muito mais acentuado, atingindo cerca de 60% de conversão em apenas 1 dia e mantendo este patamar até o sexto dia (figura 11).

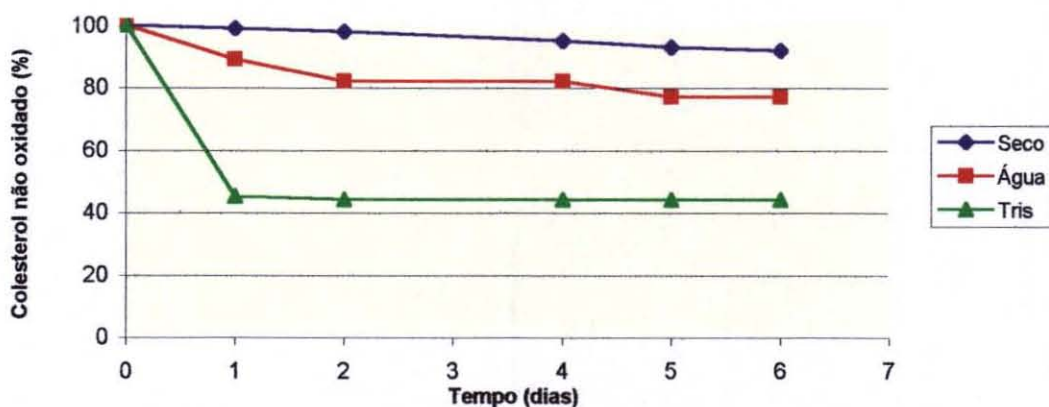


Figura 11: Efeito da presença de água e sais na oxidação do colesterol a 75°C (n = 3), conforme Kim e Nawar (1993)

No trabalho de 1987, Maerker já havia sugerido comportamento semelhante a este para tampões, afirmando que o platô ocorria provavelmente em função de mudanças na estrutura das micelas pela formação dos produtos de oxidação. Entretanto, Kim e Nawar (1993) questionaram esta afirmação pois, como o experimento não utilizava agentes de dispersão, o colesterol não existiria na forma de micelas mas sim como pequenos fragmentos suspensos no meio aquoso. A oxidação ocorreria na superfície destes fragmentos, enquanto que o interior permaneceria intacto, causando o platô observado. Desta forma, tratamentos que tivessem influência na estrutura dos fragmentos, teriam efeito na oxidação do colesterol, desde que utilizado este modelo experimental.

Kim e Nawar (1993) observaram diferenças significativas nos estágios iniciais da oxidação do colesterol, variando o pH na faixa entre 6,0 - 7,4. Porém, após 2 dias de aquecimento à 75°C, a oxidação se estabilizava por volta de 60% do colesterol já oxidado, independente do pH inicial da amostra, exibindo então o mesmo platô já mencionado. Entretanto, a proporção entre os derivados obtidos mostrou-se bastante dependente do pH. Enquanto que para a água destilada o quociente 7-K / 7-OH situou-se próximo a 2, em pH = 6,0 o mesmo subiu para 7 e em pH = 7,4 ocorreu decréscimo para 3. Este comportamento já era esperado pois a desidratação dos dois 7-hidroperóxidos (α e β) a 7-K ocorre mais rapidamente em pH baixo, mas este último é sensível a condições alcalinas, quando é degradado rapidamente. Variando o pH na faixa entre 6,0 - 7,4 os mesmos autores também verificaram que a estereoseletividade para a hidroxilação na posição 7 não foi afetada mas o quociente β -CE / α -CE aumentou de 0,15 para 2,0 após 4 dias de aquecimento.

Maerker e Bunick (1986) encontraram valores bem próximos para o quociente β -CE / α -CE na faixa de pH entre 8 e 12. Entretanto em pH = 5,5 esta razão caiu, em função da maior instabilidade do isômero β . Conforme Kim e Nawar (1993), meios como água destilada, tampão fosfato e tampão TEA (trietanolamina) produziram resultados similares na oxidação do colesterol mas o tampão tri-(hidroxi-metil)-aminometano (Tris) mostrou grande aumento nesta oxidação gerando derivados hidroxilados na cadeia lateral (20-OH e 25-OH) em quantidades detectáveis, o que não foi observado nas outras condições estudadas. O efeito das espécies iônicas neste processo permanece não esclarecido.

2.5 Absorção dos óxidos de colesterol dos alimentos

Em relação à alimentação humana, a ingestão de lipídios oxidados tem aumentado consideravelmente em função dos avanços no processamento dos alimentos, o consumo cada vez maior lanches tipo “fast-food” e a extensão dos prazos de validade (Vine et al, 1997). Em virtude dos problemas potenciais relativos a ingestão de alimentos contendo óxidos de colesterol, percebeu-se a importância de se avaliar a absorção destes compostos pelo organismo humano. Apesar das dificuldades de quantificação destes compostos e da difícil comparação entre os estudos realizados pela não padronização das técnicas analíticas, ultimamente maiores esforços têm sido aplicados neste campo.

Como estes compostos também são gerados endogenamente, a contribuição proveniente dos alimentos em relação ao total dos óxidos de colesterol ainda não está perfeitamente definida e, por este motivo, o aumento do conhecimento da absorção e biodisponibilidade tornou-se uma condição necessária para avaliações toxicológicas. Conforme Hodis et al (1991), a alimentação de ratos com dietas ricas em óxidos de colesterol mostrou aumentar a concentração destes no plasma e no tecido da aorta. Como outro exemplo conclusivo, Jacobson (1987) publicou estudo no qual o alto consumo de “ghee” (manteiga clarificada) por imigrantes indianos residentes em Londres, poderia justificar o alto índice de aterosclerose nesta população.

Vários estudos demonstraram que ratos, coelhos, macacos e humanos absorvem estes derivados oxidados pelo intestino, transferindo-os aos quilomícrons e outras lipoproteínas (Hodis et al, 1991; Osada et al, 1994; Vine et al, 1997). Nas pesquisas com animais, foi administrado colesterol oxidado e nos estudos com humanos, foram utilizados alimentos com ovo em pó (“egg powder”), verificando-se alterações no plasma e nos quilomícrons entre 6 a 10 horas após a administração.

Linseisen e Wolfram (1998b) realizaram interessante pesquisa com voluntários humanos, oferecendo refeição composta de salame e queijo Parmesão, naturalmente ricos em óxidos de colesterol. Nas 9 horas subseqüentes, os óxidos de colesterol totais presentes no plasma e nas lipoproteínas foram quantificados por GC-M^S, encontrando-se o máximo de concentração 5 horas após a refeição para os derivados esterificados (plasma) e 8 horas para os derivados totais, sendo identificados os

compostos 7α -OH, 7β -OH e 7-K. Participaram 5 homens entre 29 e 33 anos, com peso entre 72 e 82 kg, índice de massa corporal entre 22,2 e 25,5 kg/m², livres de doenças e não utilizando medicamentos. Foi oferecida refeição composta de 150 g de salame, 150 g de Parmesão, 135 g de pão branco e café, totalizando 0,84 mg de óxidos de colesterol livres e 2,64 mg de derivados esterificados, mantendo-os em jejum pelo período subsequente de 9 horas. Amostras de sangue foram retiradas antes da refeição e após a mesma, sendo analisadas imediatamente. Em todos os voluntários, os níveis de óxidos de colesterol livre e esterificado aumentaram. Não houve significância estatística para os derivados livres devido a variações metabólicas individuais mas obteve-se excelente concordância para os derivados totais, sendo mais relevante para o 7α -OH, 7β -OH e 7-K. Para os compostos CE, CT e 25-OH, os resultados mostraram aumentos discretos, sem significância estatística. O total de óxidos de colesterol na fração plasmática pode ser visto na figura 12.

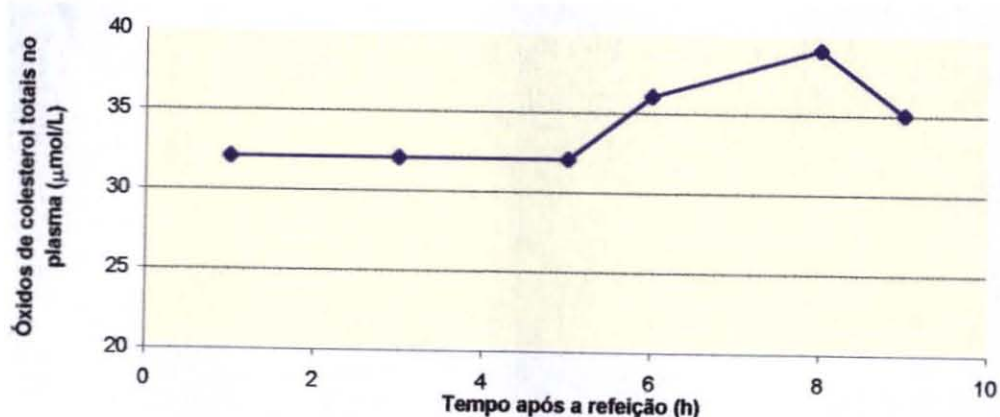


Figura 12: Óxidos de colesterol presentes no plasma de humanos após refeição rica em óxidos de colesterol (n = 5), conforme Linseisen e Wolfram (1998b)

Este estudo demonstrou claramente a absorção, por humanos, dos óxidos de colesterol advindos de alimentos, concluindo que 90% destes derivados foram absorvidos como ésteres de colesterila e apenas 10% na forma livre.

Emanuel et al (1991) demonstraram o aumento de óxidos de colesterol plasmático total da ordem de 200 – 550 μg/dL em mulheres após a ingestão de alimentos com ovo em pó. O máximo de concentração no plasma ocorreu entre 3 e 4 horas após a refeição, tempo inferior ao obtido por Linseisen e Wolfram (1998b).

Nas células da mucosa interna do intestino, o colesterol é esterificado pela ACAT antes da sua incorporação nos quilomícrons (Field et al, 1990; Lin e Morel, 1996). O mesmo ocorre com os seus derivados oxidados, sendo que a absorção destes últimos ocorre, praticamente, com a mesma velocidade que o colesterol.

Nos ratos, o índice de absorção após 24 horas dos compostos 7-K (12%) e CT (15%) mostrou ser bem abaixo do observado para α -CE (28%), 7α -OH (30%), β -CE (32%) e 7β -OH (42%). A maior polaridade dos derivados 7-K e CT poderia explicar a sua baixa absorção mas este argumento não justifica a absorção preferencial do 7β -OH sobre o 7α -OH. Osada et al (1994) sugeriram que o fator predominante nesta absorção seria a solubilidade nas micelas dos sais biliares, mas esta teoria ainda não foi comprovada.

Uma vez ingeridos, os óxidos de colesterol são absorvidos nos quilomícrons principalmente como ésteres de ácidos graxos e transferidos, via sistema linfático, para o fluxo sanguíneo (Osada et al, 1994; Vine et al, 1997). Usando o 25-OH como substrato, Lin e Morel (1996) demonstraram que este composto é prontamente esterificado durante a incubação com soro humano fresco através da ação da LCAT (lecitina colesterol acil transferase). Estudos similares demonstraram que outros derivados oxidados também podem ser substratos da ACAT. A CETP (proteína colesteril éster transferase) mostrou mediar a transferência dos ésteres do 25-OH de modo similar aos do colesterol. Conforme trabalho publicado por Christison et al (1995), a transferência de colesteril linoleato hidroperóxido entre as lipoproteínas HDL e a LDL também é mediada pela mesma proteína.

2.6 Metabolismo e excreção dos óxidos de colesterol

Um dos conceitos fisiológicos mais relevantes sobre os óxidos de colesterol é o seu destino metabólico. Uma das possibilidades é sua excreção na urina (juntamente com as secreções biliares) e nas fezes, afetando muito pouco a saúde do organismo envolvido. Entretanto, estes derivados oxidados podem se distribuir nos tecidos e células, alterando de forma substancial o metabolismo das mesmas, resultando em danos a saúde. Conforme Linseisen e Wolfram (1998a), é possível resumir o mapa metabólico e a excreção dos óxidos de colesterol como visto na figura 13.

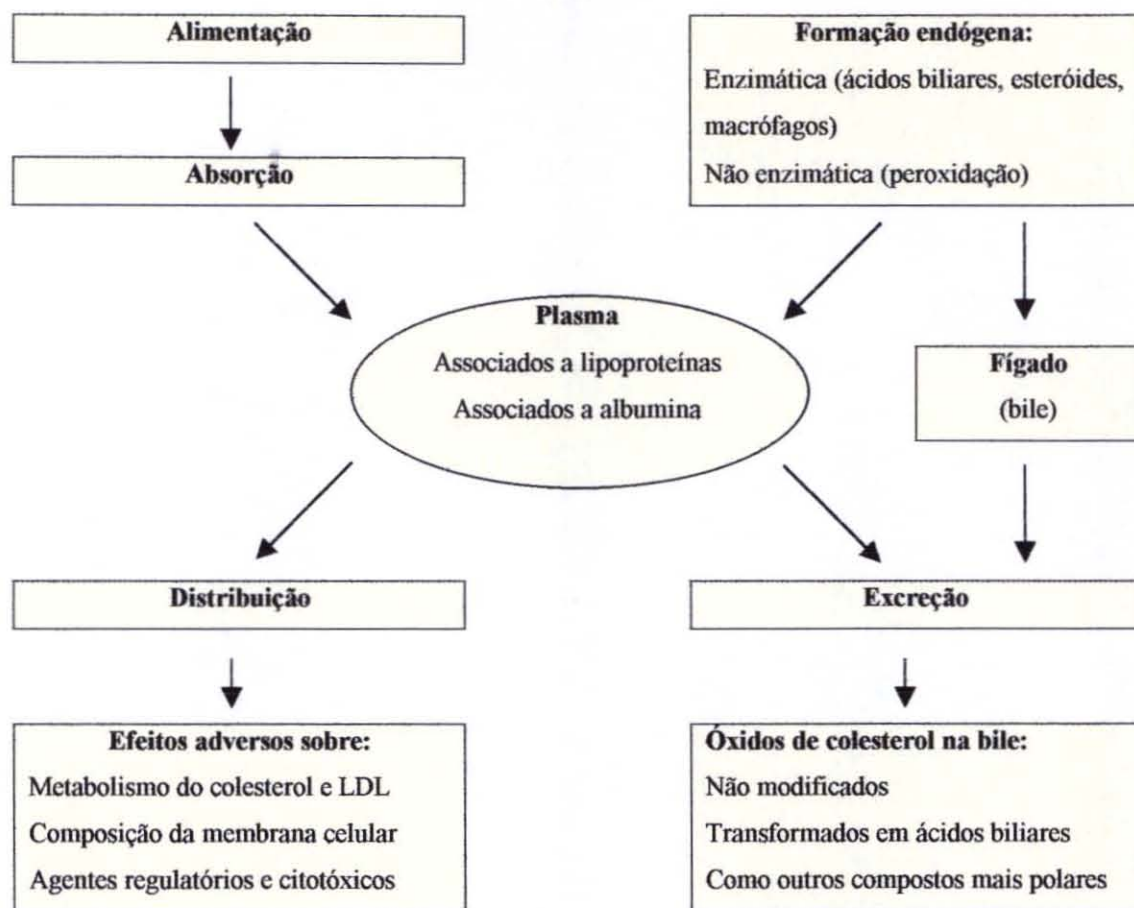


Figura 13: Possíveis rotas de absorção, metabolismo e excreção dos óxidos de colesterol, conforme Linseisen e Wolfram (1998a)

A síntese dos ácidos biliares no fígado ocorre através da 7α -hidroxilização do colesterol assim como a formação dos ácidos cólico e quenodeoxicólico. Acredita-se que os óxidos de colesterol também possam ser eliminados através desta rota.

Células de Kupffer (macrófagos hepáticos) podem agir como mediadores importantes no transporte dos ésteres dos óxidos de colesterol na forma de oxLDL para as células parenquimais do fígado, onde sofrem hidrólise e oxidação para formar 7α -hidroxi-3-oxo- Δ^4 esteróides, conforme Zhang et al (1995).

Após a administração oral de α -CE marcado com ^{13}C e ^3H em ratos, Bascoul et al (1986) demonstraram que este composto era totalmente eliminado do sangue em apenas 48 horas, mas a sua excreção continuava por vários dias, sendo mais rapidamente eliminado nos três primeiros dias e lentamente nos dias seguintes. Neste processo, a meia-vida ($\tau_{1/2}$) foi estipulada em 27 dias.

Conforme Linseisen e Wolfram (1998b), uma vez absorvidos, os óxidos de colesterol livres (ligados à albumina) e esterificados (associados a lipoproteínas) servem como substrato para a LCAT e CETP. Em um intervalo de 9 horas, o aumento da VLDL-COP (“very low density lipoprotein – cholesterol oxidation products”) foi visível enquanto que outras lipoproteínas não foram afetadas. Este fato pode sugerir a ação do fígado para a incorporação do quilomícron-COP nas VLDL. É possível que a eliminação dos óxidos de colesterol ocorra através da transformação a ácidos biliares ou pela secreção direta na bile, sendo este, parte do mecanismo de redução da concentração dos mesmos do plasma.

2.7 Extração e quantificação do colesterol e óxidos de colesterol

Conforme Aizpurúa e Tenutra-Filho (2002), a formação dos óxidos de colesterol nos alimentos não pode ser mais ignorada, até que as quantidades individuais e totais sejam determinadas assim como estabelecida a associação destas com efeitos danosos à saúde. Apesar da publicação, nos últimos anos, de vários trabalhos sobre a ocorrência e a formação de óxidos de colesterol em alimentos de origem animal, a comparação destas informações leva a resultados aparentemente conflitantes. Esta situação está relacionada principalmente com a não padronização da metodologia disponível, tanto para a extração como para a quantificação destes compostos (Paniangvait et al, 1995; Ulberth e Rössler, 1998).

2.7.1 Extração do colesterol e óxidos de colesterol

Várias técnicas já foram desenvolvidas para a extração do colesterol e de seus derivados oxidados, as quais variam em função do substrato e do método quantitativo a ser utilizado. Dentre as mais frequentes, podemos citar:

I) Um dos procedimentos mais utilizado é o desenvolvido por Folch et al (1957) que utiliza clorofórmio:metanol (2:1 v/v) para a extração, lavagem com água destilada para a remoção das substâncias hidrossolúveis, secagem sobre Na_2SO_4 anidro e evaporação do solvente a 40°C sob vácuo. Conforme os autores, esta técnica resulta

em perdas inferiores a 1% dos lipídios totais. Trata-se de um procedimento fácil e não agressivo ao colesterol e seus derivados.

II) Em 1984, Zubilaga e Maerker modificaram o método de coluna seca de Maxwell et al (1980). Uma coluna de vidro foi empacotada com uma mistura homogênea e moída de 10 g de ácido salicílico, 9 g de Celite 545 e 1 g de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A 10 g de carne moída foram adicionados 40 g de Na_2SO_4 granulado e 15 g de Celite 545. A mistura foi triturada e colocada no topo da coluna que foi molhada com 75 mL de hexano:acetato de etila (9:1 v/v) e eluída com 300 mL do mesmo solvente a 2 mL/min sob leve pressão de N_2 . O eluído (colesterol e lipídios neutros) foi descartado e os óxidos de colesterol foram extraídos com 150 mL de acetato de etila a 1 mL/min. A fração com os óxidos de colesterol foi evaporada sob vácuo a 40°C.

III) Em 1994, Chen e Chen compararam os três métodos de extração abaixo, utilizando sebo fundido como substrato. Concluíram que os melhores resultados foram obtidos com o uso do cartucho Sep-Pak® C₁₈.

Saponificação a frio: em 10 mL de KOH metanólico 1 molar foi adicionado 1,0 g de amostra e deixado repousar por 18 horas a temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 10 mL de água destilada e a mistura foi transferida para um funil de separação. A parte não saponificada foi extraída com 3 alíquotas de 10 mL de hexano cada. A fração orgânica foi combinada e lavada com 10 mL de KOH aquoso 1 molar e com 10 mL de água destilada. Após filtração sobre Na_2SO_4 anidro, o filtro foi lavado com 20 mL de hexano puro e o solvente evaporado a 40°C sob vácuo.

Cartucho Sep-Pak® C₁₈ (apolar): o cartucho foi ativado com 10 mL de água deionizada e 10 mL de metanol. 1,0 g de amostra foi diluída com 1 mL de acetato de etila:metanol (1:1 v/v) para reduzir a viscosidade e passada pelo cartucho. O colesterol e os ésteres de glicerila foram eluídos com 1 mL de acetato de etila:metanol (1:1 v/v) e os óxidos de colesterol foram posteriormente eluídos com 10 mL de metanol seguidos de 6 mL de acetato de etila:metanol (1:1 v/v). A fração obtida foi evaporada a 40°C sob vácuo.

Cartucho Sep-Pak[®] sílica (polar): o cartucho foi ativado com 10 mL de hexano. 1,0 g de amostra foi diluída com 1 mL de hexano para reduzir a viscosidade e passada pelo cartucho. O colesterol e os ésteres de glicerila foram eluídos com 10 mL de hexano e os óxidos de colesterol foram posteriormente eluídos com 20 mL de acetona. O solvente obtido foi evaporado a 40°C sob vácuo.

IV) Em 1998, Ulberth e Rössler realizaram estudo semelhante, comparando vários cartuchos para a extração em fase sólida (SPE) dos óxidos de colesterol presentes na gordura do leite. Utilizando cartuchos de C₁₈ (apolar), NH₂ (intermediário) e sílica (polar), concluíram que a combinação de sílica seguida de NH₂ produzia os melhores resultados. Após a adição de cerca de 0,15 ppm de óxidos de colesterol no substrato analisado, obtiveram índices de recuperação iguais ou maiores que 90%, exceto para o CT que apresentou recuperação de apenas 52%.

2.7.2 Quantificação do colesterol e óxidos de colesterol

Várias técnicas para a quantificação do colesterol e seus derivados oxidados já foram desenvolvidas e utilizadas. Conforme Csallany et al (1989), as vantagens e restrições para cada um destes métodos são:

I) Cromatografia de camada delgada (TLC): este método não é recomendado para esta análise uma vez que expõe a amostra a uma grande área superficial durante um longo tempo, possibilitando a ocorrência de reação de oxidação indesejada formando substâncias não pertencentes à amostra (“artifacts”). Apresenta ainda baixa capacidade de carga e sensibilidade insuficiente para os níveis a serem analisados.

II) Cromatografia gasosa capilar (CGC): com o advento das colunas capilares, esta técnica passou a contar com excelente capacidade de separação dos componentes a serem analisados. Entretanto, requer a realização de saponificação alcalina para tornar possível a vaporização da amostra, o que pode promover a oxidação do colesterol além de modificar alguns dos derivados oxidados. O uso de saponificação a frio pode minimizar este problema, mas é muito demorada (18 horas). Além disto,

a passagem da amostra por coluna cromatográfica mantida a alta temperatura, pode alterar a sua composição, sendo necessário converter os óxidos de colesterol a derivados mais estáveis como trimetilsilanos.

III) Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC): com o desenvolvimento de equipamentos de alta resolução e fases estacionárias com partículas menores, é possível separar o colesterol e seus derivados oxidados com pouco tratamento prévio. Utilizando-se o procedimento de extração de Folch et al (1957) modificado por Csallany e Ayaz (1976), é possível injetar o extrato lipídico contendo os óxidos de colesterol diretamente no HPLC, sem a necessidade de etapas adicionais como hidrólises ou silanizações, reduzindo muito a possibilidade de oxidação do colesterol e a degradação ou modificação dos seus derivados oxidados.

Como até o presente não houve a padronização de nenhum destes métodos, a quantificação do colesterol e óxidos de colesterol é realizada conforme a preferência do pesquisador e / ou pela disponibilidade de equipamentos. Da literatura, podem ser citados os seguintes trabalhos:

1) Ansari e Smith (1979): na etapa prévia, utilizaram extração por coluna seca (sílica gel) seguida de TLC preparativa (sílica gel), resultando em tratamento longo, trabalhoso e agressivo à amostra. Para a etapa quantitativa, selecionaram a técnica de HPLC com detector de UV e colunas μ Porasil[®] (fase normal) com 30 x 0,39 cm e μ Bondapak[®] C₁₈ (fase reversa) com 30 x 0,39 cm, ambas com partículas de 10 μ . Várias fases móveis foram utilizadas em condições isocráticas e com gradientes, resultando em tempos de análise de cerca de 60 minutos.

2) De Vore (1988): utilizou extração conforme Folch et al (1957) seguida de limpeza ("clean up") em coluna seca de sílica conforme Park e Addis (1985) e TLC preparativa (sílica), resultando em longos tempos. Para a etapa quantitativa, escolheu a técnica de HPLC conforme Park e Addis (1985) com detector de UV e coluna Econosphere[®] sílica com 15 x 0,46 cm e partículas de 3 μ . A fase móvel utilizada foi hexano:2-propanol (93:7 v/v), não relatando o tempo total de análise.

3) Csallany et al (1989): utilizaram extração conforme Folch et al (1957) otimizada por Csallany e Ayaz (1976) e a técnica de HPLC com detector de UV e coluna de μ Porasil[®] (fase normal) com 30 x 0,39 cm, com partículas de 10 μ . Foi necessário o uso de várias composições para a fase móvel de hexano:2-propanol (de 90:10 a 97:3 v/v) para a determinação de todos os compostos de interesse e o tempo total de corrida foi de 65 minutos, prejudicando muito os últimos compostos (7 α -OH e 7 β -OH) pelo alargamento dos picos e conseqüente perda de precisão.

4) Zubillaga e Maerker (1991): para a extração, utilizaram coluna seca (Maxwell et al, 1980; Zubilaga e Maerker, 1984) e TLC preparativa (sílica). A etapa quantitativa foi desenvolvida por GC-FID com coluna de 5% de fenilsilicone com 0,20 mm x 25 m e espessura de filme de 0,33 μ . Foi utilizado He como gás de arraste, sendo a corrida realizada com gradiente de temperatura no injetor e na coluna, demandando cerca de 52 minutos. A utilização de coluna seca e TLC na etapa preparativa resultou em procedimento demorado e agressivo aos óxidos de colesterol.

5) Hwang e Maerker (1993): realizaram extração conforme Folch et al (1957), seguida de "clean up" em coluna seca (sílica) e TLC preparativa (sílica). A quantificação foi feita por GC-FID utilizando coluna capilar com 5% de fenilsilicone com 0,25 mm x 30 m e espessura de filme de 0,25 μ . A corrida foi desenvolvida com gradiente de temperatura na coluna e no injetor, resultando em tempo total de cerca de 50 minutos. Devido à manipulação extensiva da amostra, a recuperação dos óxidos de colesterol foi de somente 78 – 88%.

6) Chen e Chen (1994): utilizaram as 3 técnicas de extração citadas no item 2.7.1 comparando-as entre si. Selecionaram a técnica de HPLC com detector de UV para a etapa quantitativa, testando as colunas LiChrosphere[®] CN (polaridade intermediária) com 25 x 0,46 cm e Phenomenex[®] C₁₈ (apolar) com 25 x 0,46 cm, ambas com partículas de 5 μ . Para a primeira coluna utilizaram como fase móvel hexano:2-propanol (95:5 v/v) e para a segunda acetonitrila:metanol (55:45 v/v), obtendo tempo total de corrida de 18 minutos para a coluna CN e 60 minutos para a coluna C₁₈, com bons resultados em ambas.

7) Rodriguez-Estrada et al (1997): realizaram a extração conforme Folch et al (1957). Na etapa quantitativa, utilizaram GC-FID com várias colunas diferentes (Mega[®] SE-52, Supelco[®] SP-2340, Chirasil-L-Val[®] e Chirasil-D-Val[®]), todas entre 25 e 30 m. Também utilizaram a técnica de HPLC com detector UV e coluna de Spherisorb[®] S5-C8 com 15 x 0,46 cm e partículas de 5 μ e Spherisorb[®] 3S-TG com 15 x 0,46 cm e partículas de 3 μ . Não relataram os tempos de corrida e somente quantificaram o colesterol e o derivado oxidado 7-K.

8) Caboni et al (1997): utilizaram saponificação a frio para a etapa de extração. Para a quantificação, escolheram HPLC com detectores de UV e espalhamento de luz e colunas Spherisorb[®] S5-CN (polaridade intermediária) com 25 x 0,46 cm e 25 x 0,32 cm, ambas com partículas de 5 μ . A fase móvel foi hexano:etanol (97:3 v/v) com tempo de análise de cerca de 30 minutos. O uso de detector de espalhamento de luz permitiu a determinação dos compostos que não absorvem na região do UV, como as 2 formas epiméricas do CE (α e β) e o CT.

9) Careri et al (1998): utilizaram a extração conforme Folch et al (1957) seguido de saponificação a frio, coluna Sep-Pak[®] sílica e derivatização com BSTFA para formar derivados silanizados estáveis. A quantificação foi feita por GC-FID com coluna de sílica CP-Sil[®] 19-CB com 25 m x 0,25 mm e espessura do filme de 0,2 μ . Foi utilizado He como gás de arraste e a corrida com gradiente de temperatura levou cerca de 20 minutos. A etapa de extração e purificação tornou a análise demorada e com riscos de alteração do perfil dos óxidos de colesterol.

10) Lercker e Rodriguez-Estrada (2000): fizeram a extração conforme Folch et al (1957), optando pelo uso de HPLC com detector de UV e coluna S5-C₆ (fase reversa) com 15 x 0,46 cm e partículas de 5 μ para a etapa quantitativa, conforme Penazzi et al (1995). Utilizando fase móvel acetonitrila:água (4:1 v/v), obtiveram tempo total de corrida de 22 minutos, mas quantificaram apenas o 7-K.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a formação de óxidos de colesterol em hambúrgueres bovinos após o processamento em chapa quente, forno convencional ou microondas com o uso de dourador (“grill”).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Identificar e quantificar o colesterol e os óxidos de colesterol mais importantes (25-OH, 7-K, 7 α -OH e 7 β -OH) existentes em hambúrgueres crus e a formação adicional destes derivados oxidados após processamento térmico, em função da temperatura, tempo e tipo de processamento utilizado;

3.2.2 Estabelecer o binômio tempo / temperatura ideal para atender o compromisso entre a baixa formação de derivados oxidados do colesterol e as características normais para o consumo dos hambúrgueres.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Hambúrgueres industrializados

Várias opções de hambúrgueres bovinos são normalmente comercializadas, sendo mais encontradas as preparações denominadas tradicional, suave (ou “light”) e churrasco. Conforme os fabricantes, o prazo de validade médio é de 120 dias, sendo necessário mantê-los armazenados a -18°C e expostos a -8°C .

Foram utilizados três lotes de cada tipo de hambúrguer, todos adquiridos em supermercado da região com cerca de 30 dias de fabricação, produzidos por fabricantes tradicionais. Cada lote era composto de 12 unidades de 56 g cada, acondicionadas em embalagens plásticas individuais. Todas as amostras foram mantidas em “freezer” a -18°C até o momento da preparação e imediata análise.

4.1.2 Hambúrgueres caseiros

Também foram avaliadas amostras produzidas no Laboratório de Técnica Dietética da FSP-USP, de acordo com receita tradicional indicada por Torres (2000).

Tabela 02: Composição percentual de hambúrgueres tipo tradicional produzidos na FSP-USP, conforme Torres (2000)

Ingredientes	%
Patinho bovino (<i>Vastus lateralis</i>)	70,00
Papada suína	21,50
Sal iodado	2,00
Água	3,00
Cebola (<i>Allium cepa</i> , L)	3,00
Alho (<i>Allium sativum</i> , L)	0,30
Pimenta do reino (<i>Piper nigrum</i> , L)	0,20

Para a produção dos hambúrgueres caseiros, a carne moída e a papada suína recém adquiridas em açougue da região foram homogeneizadas em moedor elétrico com distância entre discos de 5 mm. Os condimentos foram adicionados e a massa foi passada no moedor por mais 3 vezes, para garantir a homogeneidade. Os hambúrgueres prontos apresentaram 100 mm de diâmetro, 7 mm de altura e 56 g de massa. Foram produzidas três unidades em cada lote, sendo embaladas individualmente em filme de PVC e mantidas a -18°C por 4 semanas para simular a condição de compra dos hambúrgueres industrializados, pois mesmo sob esta temperatura, ainda pode haver discreta alteração no conteúdo dos derivados oxidados do colesterol, conforme Kesava-Rao et al (1996) e Pie et al (1991).

4.1.3 Reagentes e solventes

Os padrões de colesterol e dos óxidos de colesterol (25-OH, 7α -OH, 7β -OH e 7-K) foram adquiridos da Steraloids Inc. – USA. Os solventes com grau HPLC usados como fase móvel do cromatógrafo líquido (hexano e 2-propanol) foram adquiridos da Merck KgaA – Germany. Os demais materiais utilizados na extração lipídica (clorofórmio, metanol e Na_2SO_4) apresentaram grau ACS.

Os solventes utilizados nas análises por HPLC foram filtrados antes do uso em membranas Durapore[®] HV-PVDF (47 mm de diâmetro e $0,45\ \mu$ de poro) fabricadas pela Millipore do Brasil. As amostras para os testes de HPLC foram filtradas em membrana Millex[®] HV-PVDF (25 mm de diâmetro e $0,45\ \mu$ de poro) também fabricadas pela Millipore do Brasil.

Por ser higroscópico, o 2-propanol pode apresentar umidade variável, causando variações nos tempos de retenção. Para se assegurar a repetibilidade das análises, este solvente foi seco sobre Na_2SO_4 anidro antes do uso. Para o hexano, Johnson e Stevenson (1978) recomendam a passagem sobre alumina e sílica-gel para garantir a transparência na região do UV (“cut-off”). Este solvente foi analisado antes do uso, sendo que sua pureza mostrou ser desnecessária a etapa de purificação. Para o clorofórmio e o metanol utilizados na extração lipídica, não houve a necessidade de qualquer purificação prévia pois a passagem sobre Na_2SO_4 anidro durante a própria extração, é suficiente para eliminar a água residual.

4.2 Métodos

4.2.1 Processamento térmico dos hambúrgueres

Foi assumido que os hambúrgueres, após o processamento térmico, deveriam apresentar condições adequadas para o consumo, conforme as recomendações dos fabricantes. Ainda conforme estes, não é necessário o descongelamento prévio das amostras antes do seu preparo. As condições de processamento utilizadas estão descritas a seguir:

a) Chapa quente: os hambúrgueres foram processados diretamente na chapa com a adição de 6 gotas de óleo de soja (isento de colesterol e derivados). Cada unidade foi processada individualmente, utilizando-se apenas o centro da chapa, para se evitar variações na temperatura. Os tempos foram entre 5 e 6 minutos e a amostra foi virada a cada minuto para garantir a homogeneidade. Após virar o hambúrguer, foi aplicada pressão de pequena duração com o uso de uma espátula metálica (2 vezes após cada virada). A temperatura inicial da chapa foi mantida em 200 ou 250°C para se avaliar a influência desta variável na formação dos derivados oxidados. Após o processamento de cada hambúrguer, a chapa foi limpa com o uso de espátula metálica e papel absorvente para não ocorrer contaminações entre as amostras, aguardando-se o tempo necessário para o equilíbrio na temperatura desejada. Imediatamente ao final do processamento, foi feita a medição da temperatura no centro do hambúrguer com o uso de termômetro digital.

b) Microondas: para se atingir a aparência e o cozimento desejados, os hambúrgueres foram processados individualmente sobre um prato de vidro, sem o uso de óleo, utilizando-se microondas em potência máxima durante 2 minutos sendo, então, grelhados por 5 minutos. As amostras foram viradas a cada minuto para garantir a homogeneidade. Foi utilizada a posição alta da grelha, como sugerido pelo fabricante do forno de microondas. O prato foi lavado e seco entre as amostras para evitar contaminações. Tal qual no processamento em chapa quente, foi medida a temperatura final no centro do hambúrguer com o uso de termômetro digital.

c) Forno convencional: os hambúrgueres foram assados individualmente em forma de alumínio com 6 gotas de óleo de soja, utilizando-se fogo alto (250°C). O tempo de processamento foi entre 7 e 8 minutos, virando-se os hambúrgueres na metade deste tempo. A forma foi lavada e seca após cada amostra, para evitar contaminações. Após cada amostra, foi aguardado o restabelecimento da temperatura selecionada antes de iniciar novo teste. Como nos casos anteriores, a temperatura final no centro do hambúrguer foi medida com o uso de termômetro digital.

Após o processamento térmico, cada hambúrguer foi desagregado e as amostras para os testes foram retiradas da massa homogênea, para assegurar a representatividade da mesma. Todos os testes foram realizados imediatamente após o processamento para evitar alterações no conteúdo de colesterol e seus derivados oxidados, uma vez que, mesmo a -10°C, a reação de oxidação do colesterol continua (Mielche e Bertelsen, 1994; Mielche e Bertelsen, 1995).

4.2.2 Extração do colesterol e óxidos de colesterol

Como o colesterol pode ser transformado nos seus óxidos por efeito do calor, procuramos selecionar procedimento extrativo que evitasse esta condição. Foi ainda dada preferência a método que não requeresse manipulações extensivas para prevenir a ação do oxigênio presente no ar assim como reações de hidrólise, pois os óxidos de colesterol são instáveis nesta situação. Foi feita a opção pela técnica de Folch et al (1957) modificada por Csallany e Ayaz (1976), por se tratar de processo não agressivo, de simples execução e com altos índices de recuperação. Pequenas modificações foram introduzidas visando-se aumentar a eficiência, como descrito a seguir:

Uma massa representativa e homogênea de $1,000 \pm 0,001$ g de hambúrguer cru ou processado, foi pesada em balança analítica, utilizando-se um Becker de 50 mL. Foram adicionados 20 mL de uma mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v) e processado em homogeneizador a 12.000 rpm por 2 minutos, para assegurar o processo extrativo. A suspensão foi cuidadosamente transferida para um funil de

separação de 250 mL, o Becker foi lavado com 50 mL de água deionizada e a mesma foi transferida para o funil de separação. Após agitação vigorosa por 1 minuto e separação das fases, a fase aquosa (superior) foi retirada com o auxílio de uma pipeta e reservada para posterior continuidade do processo. O Becker foi novamente lavado com 50 mL de água deionizada e a mesma foi transferida para o funil de separação, para a segunda lavagem. Após agitação vigorosa por 1 minuto, a fase orgânica (inferior) foi drenada e reservada para posterior utilização. As duas águas de lavagem foram combinadas no funil de separação, sendo adicionados 25 mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v). Agitou-se vigorosamente por 1 minuto e após separação, a fase orgânica (inferior) foi combinada com a fase orgânica da etapa anterior, sendo seca sobre Na_2SO_4 anidro em um funil e transferida para o balão do evaporador rotativo. O Na_2SO_4 utilizado na filtração foi lavado com 20 mL de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) para evitar perdas, sendo este solvente combinado com o restante da fase orgânica no balão do evaporador rotativo. O solvente foi seco a 40°C sob vácuo de 400 mmHg. Após a secagem final com um pequeno fluxo de N_2 seco, o resíduo obtido foi dissolvido utilizando-se pequenos volumes da fase móvel a ser utilizada no HPLC (hexano:2-propanol 97:3 v/v), transferindo-se o extrato para um frasco volumétrico e completando o volume para exatamente 2,0 mL. Através deste processo, foram extraídos apenas os óxidos de colesterol livres, porém estes totalizam mais de 90% dos derivados oxidados conforme Tu et al (1967), De Vore (1988) e Rodriguez-Estrada et al (1997).

4.2.3 Identificação e quantificação do colesterol e óxidos de colesterol

Objetivando tornar a análise mais rápida e confiável assim como quantificar todos os compostos de interesse em uma única corrida, optou-se pelo método por HPLC descrito por Chen e Chen (1994) com o uso de coluna CN (fase intermediária) e os solventes hexano:2-propanol. Após a realização de vários testes para a otimização das condições analíticas como composição da fase móvel, fluxo e volume da amostra, concluímos ser possível realizar a determinação do colesterol e dos óxidos 25-OH, 7-K, 7α -OH e 7β -OH em uma única corrida isocrática com cerca com 14 minutos de tempo total, conforme descrito a seguir:

O extrato obtido no item 4.2.2 foi utilizado diretamente no HPLC, sem nenhum tratamento adicional. Utilizando-se hexano:2-propanol (97/3 v/v) como fase móvel e fluxo de 1,0 mL/min, foram injetados 20 μ L deste extrato no HPLC configurado com degasificador automático, bomba quaternária, amostrador automático e detector de comprimento de onda variável. A detecção foi realizada em dois canais operando em paralelo, utilizando-se 206 nm para todos os compostos exceto para o 7-K que exibe o máximo de absorção em 233 nm, conforme exibido na figura 14.

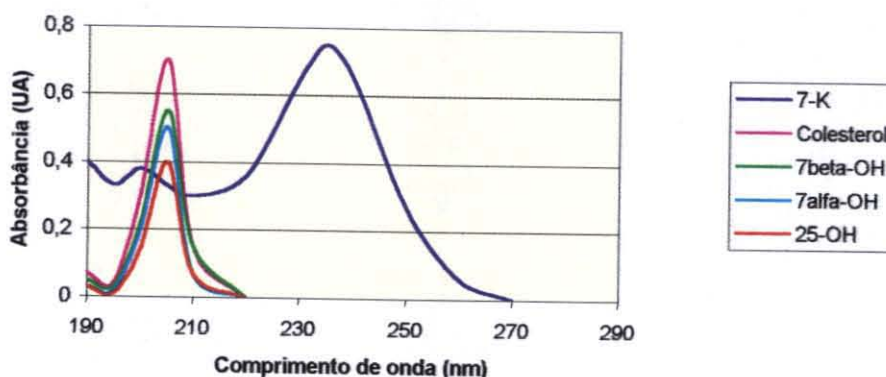


Figura 14: Espectro de absorção do colesterol e seus derivados oxidados na região do ultravioleta (Csallany et al, 1989)

4.2.4 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade das amostras foi realizada por método gravimétrico conforme normalizado em 1985 pelo Instituto Adolfo Lutz que consiste em colocar cerca de 10 g da amostra em uma cápsula de porcelana previamente tarada, secar em estufa a 105°C por 2 a 3 horas, esfriar a cápsula de porcelana em dessecador até temperatura ambiente, pesar e efetuar os cálculos.

4.2.5 Determinação dos lipídios totais

As determinações dos lipídios totais também foram executadas conforme a metodologia de Folch et al (1957). O procedimento é idêntico ao descrito no item 4.2.2 adicionando-se a secagem do balão com o extrato lipídico em estufa a 105°C por 1 hora, seguida de pesagem em balança analítica. Deve ser destacado que os

resultados expressos como teores de lipídios totais na verdade computa todos os materiais solúveis no solvente de extração, incluindo substâncias não lipídicas como esteróis, fosfatídeos, vitaminas lipossolúveis como A e D, carotenóides e óleos essenciais, dependendo do substrato analisado.

4.2.6 Determinação do grau de processamento térmico dos hambúrgueres

A determinação do grau de processamento térmico dos hambúrgueres (mal passado, no ponto e bem passado) foi feita utilizando-se o sensor de cozimento da 3M (figura 15). Este sensor é posicionado no centro do alimento e a cor da ponta, que é composta de 3 estágios, fornece esta informação. O alimento estará cru enquanto o sensor permanecer preto. À medida que os 3 estágios tornam-se sucessivamente vermelhos, temos a informação que o alimento está mal passado, no ponto e muito passado, respectivamente.

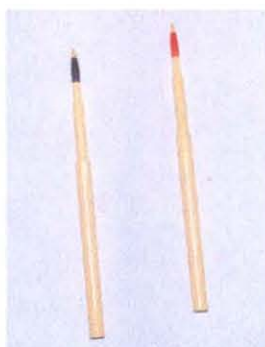


Figura 15: Sensor para indicação do grau de cozimento de alimentos fabricado pela 3M (preto = sensor novo / alimento cru, todo vermelho = alimento muito passado)

4.2.7 Análise estatística

Os cálculos de média, desvio padrão, coeficiente de variação, coeficiente de explicação (R^2) e as equações das curvas pelo método dos quadrados mínimos foram realizados com o uso do programa Microsoft Excel[®] for Windows[®] versão 2000. A análise de variância (teste F e teste de Tukey) foi realizada utilizando-se o programa “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS[®]) for Windows[®] versão 10.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teor de umidade dos hambúrgueres antes e após os processamentos

A determinação do teor de umidade é de grande importância na comparação das quantidades de óxidos de colesterol existentes antes e após o processamento térmico dos hambúrgueres. Em função da significativa redução de massa durante este processamento (até 50% em certos casos), a comparação de amostras cruas com aquelas já processadas não deve ser feita em mg / 100 g de hambúrguer base úmida, pois teremos erros de até 100%, devendo então os resultados ser expressos em mg / 100 g de hambúrguer base seca ou em mg / unidade de hambúrguer.

Os 4 tipos de hambúrgueres selecionados foram inicialmente analisados crus conforme a metodologia recomendada pelo Instituto Adolfo Lutz (1985) descrita no item 4.2.4. Pode ser verificado na tabela 3 que os valores obtidos estão próximos entre si, variando entre $59,13 \pm 0,68\%$ e $62,23 \pm 0,37\%$. Estes resultados estão próximos ao valor de 64% relatado por Torres (2000).

Dentre as 4 amostras, a que apresentou menor variabilidade foi a FSP-USP com $\sigma = 0,37$ ($n = 3$), devido à cuidadosa homogeneização durante sua produção e a que apresentou maior variabilidade foi a churrasco com $\sigma = 0,68$ ($n = 3$).

Tabela 03: Teor de umidade de hambúrgueres não processados (crus) com massa inicial de 56 gramas ($n = 3$)

Amostra	Umidade média (%)	Desvio padrão	Coef. de variação (%)
FSP-USP	62,23	0,37	0,59
Churrasco	59,13	0,68	1,15
Regular	60,52	0,56	0,93
Suave	61,09	0,67	1,10

Como na avaliação da formação dos óxidos de colesterol foram utilizados equipamentos de processamento diferentes (chapa quente, microondas e forno), o uso de tempos iguais para todos eles seria inadequado. Foi então necessário estabelecer um parâmetro comparativo que permitisse realizar processamentos similares, independentemente do equipamento utilizado.

Estipulada como premissa para a definição dos limites de tempo e temperatura que os hambúrgueres apresentassem condições para o consumo, realizamos uma série inicial de testes utilizando chapa à 250°C (processamento térmico mais utilizado) e amostras do tipo regular industrializado, a fim de determinar estes limites. Os testes mostraram que tempos menores ou iguais a 4 minutos, produziram hambúrgueres mal passados, com consistência e aparência inadequada, tempos entre 5 e 6 minutos produziram amostras no ponto e tempos maiores que 7 minutos resultaram em amostras muito passadas. Nestes testes, pudemos determinar que a umidade para o produto já processado deveria estar entre 50 e 55% para produzir alimento no ponto. Os resultados destes testes podem ser vistos na tabela 4 e figura 16. As análises de umidade foram realizadas em triplicata e em condições repetíveis (mesmo laboratório, equipamentos e analista). A determinação do grau de processamento térmico (mal passado, no ponto e bem passado), foi realizada com o uso do sensor de cozimento da 3M.

Tabela 04: Teor de umidade de hambúrgueres tipo regular com massa inicial de 56 gramas, em função do tempo de processamento em chapa a 250°C (n = 3)

Tempo de chapa a 250°C (min)	Umidade média final (%)	Desvio padrão da umidade	Coef. de variação (%)	Condição após o processamento
4	56,49	0,62	1,10	mal passado
5	53,50	0,82	1,53	no ponto
6	50,87	0,71	1,40	no ponto
7	46,15	0,56	1,21	muito passado
8	41,00	0,86	2,10	muito passado

Com os dados desta tabela foi possível obter a figura 16 que demonstra que a perda de umidade depende quase linearmente do tempo de processamento térmico.

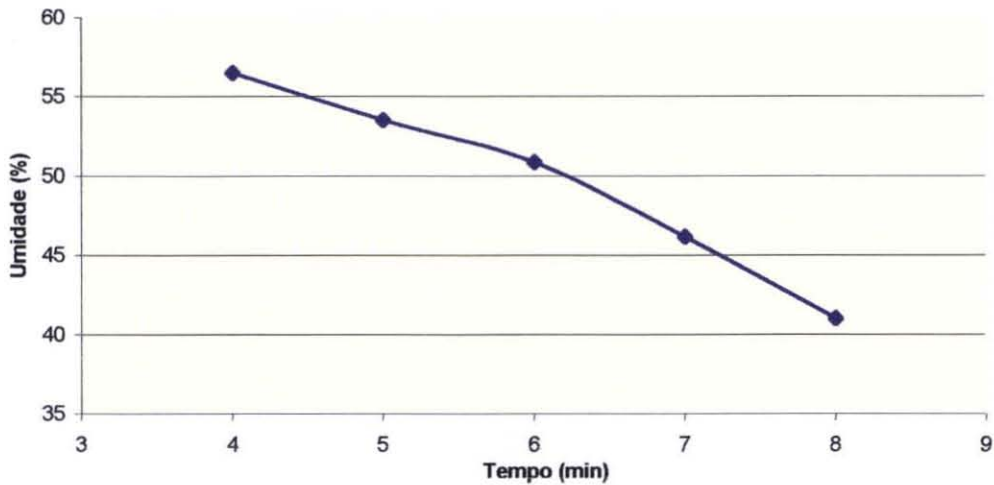


Figura 16: Perda de umidade (%) de hambúrgueres tipo regular com massa inicial de 56 gramas, em função do tempo de processamento em chapa a 250°C (n = 3)

Como os hambúrgueres regular industrializados crus apresentam massa inicial de $56,25 \pm 0,11$ gramas (umidade de $60,52 \pm 0,56\%$), pudemos determinar que eles possuem $33,89 \pm 0,31$ gramas de água por unidade. Os testes iniciais mostraram que perdas iguais ou maiores a $18,52 \pm 0,44$ gramas de água por hambúrguer (cerca de 55% do inicial) geraram produtos muito passados enquanto que perdas iguais ou menores a $10,29 \pm 0,24$ gramas de água (cerca de 30% do inicial), produziram amostras mal passadas. Estes resultados estão na tabela 5. Também, neste caso, as análises foram realizadas em triplicata em condições repetíveis e na avaliação da condição de processamento, foi utilizado o sensor de cozimento da 3M.

Tabela 05: Perdas de água e outros em hambúrgueres tipo regular com massa inicial de 56 gramas, em função do tempo de processamento em chapa a 250°C (n = 3)

Tempo de chapa a 250°C (min)	Perda média total (g)	Perda média de água (g)	Desvio padrão da perda de água	Perda média de outros (g)	Consistência e aparência
4	14,2045	10,2890	0,24	3,9155	mal passado
5	17,1006	13,0876	0,38	4,0130	no ponto
6	19,3543	15,2886	0,31	4,0657	no ponto
7	22,6260	18,5224	0,44	4,1036	muito passado
8	25,8186	21,5758	0,51	4,2428	muito passado

Finalizados estes testes, ficou definido que após o processamento térmico, as amostras deveriam apresentar umidade entre 50 e 55%, independentemente do processamento utilizado.

Na série seguinte, identificamos os tempos e temperaturas para cada tipo de processamento térmico que produziriam amostras prontas com umidade na faixa estipulada. Utilizamos, em paralelo, amostras de hambúrguer tipo regular industrializado e FSP-USP para avaliar as possíveis diferenças de comportamento entre estes hambúrgueres. Concluímos que para se atingir a umidade desejada (entre 50 e 55%), seriam necessários entre 5 e 6 minutos na chapa a 250°C, entre 7 a 8 minutos no forno convencional a 250°C ou 2 minutos no forno de microondas com potência máxima seguidos de 5 minutos de "grill". Todos os testes foram feitos em triplicata e em condições repetíveis sendo que os resultados obtidos podem ser vistos na tabela 6. Estas ficam definidas como as condições padrão para o processamento térmico.

Tabela 06: Perda de umidade de hambúrgueres tipo regular e FSP-USP com massa inicial de 56 gramas, após processamento em chapa, forno ou microondas nas condições definidas como padrão (n = 3)

Amostra	Condição	Umidade média (%)	Desvio padrão	Coef.de variação (%)
FSP-USP	Chapa 250°C (6 min)	52,72	0,83	1,57
FSP-USP	Forno 250°C (8 min)	53,35	1,16	2,17
FSP-USP	Microondas com "grill" (2 + 5 min)	51,39	1,30	2,53
Regular	Chapa 250°C (6 min)	51,37	0,95	1,85
Regular	Forno 250°C (8 min)	52,66	1,27	2,41
Regular	Microondas com "grill" (2 + 5 min)	50,80	1,03	2,03

5.2 Teor de lipídios totais antes e após processamento

Utilizando-se o método descrito no item 4.2.5, foi feita a determinação dos lipídios totais dos 4 tipos de hambúrgueres crus, obtendo-se os valores da tabela 7.

Tabela 07: Teor de lipídios totais de hambúrgueres crus com massa inicial de 56 gramas (n = 3)

Amostra	Massa média inicial (g)	Lipídios totais média (g)	Lipídios totais (%)	Desvio padrão
FSP-USP	56,0144	7,1915	12,84	0,24
Regular	56,3104	7,3336	13,02	0,22
Churrasco	56,2091	7,1665	12,75	0,30
Suave	55,8918	7,2285	12,93	0,25

De acordo com a tabela 05, além de água, os hambúrgueres perdem cerca de 4 gramas de outros materiais durante o processamento térmico. Conforme Rodriguez-Estrada et al (1997), esta perda pode ser atribuída aos lipídios. Para verificarmos esta afirmação, processamos hambúrgueres tipo regular industrializado em chapa a 250°C, obtendo-se os resultados abaixo.

Tabela 08: Perda de lipídios totais em hambúrguer regular com massa inicial de 56 gramas, em função do tempo de processamento em chapa a 250°C (n = 3)

Tempo de chapa a 250°C (min)	Peso médio inicial (g)	Peso médio final (g)	Lipídios (média) por unidade (g)	Perda média de lipídios (g) por unidade	Desvio padrão
0	56,31	56,31 (100%)	7,3336	---	0,22
4	56,09	41,53 (74,04%)	4,8981	2,4355 (33,21%)	0,21
5	56,33	38,88 (69,02%)	4,5352	2,7984 (38,16%)	0,40
6	56,18	36,50 (64,97%)	4,3636	2,9700 (40,50%)	0,26
7	56,23	34,50 (61,36%)	4,1273	3,2063 (43,72%)	0,17
8	56,31	31,61 (56,14%)	3,9040	3,4296 (46,77%)	0,26

A correlação entre a perda de água e de lipídios durante o processamento dos hambúrgueres é bastante evidente (figura 17), porém a perda lipídica não totaliza as 4 gramas citadas. Observa-se que do conteúdo inicial de $7,33 \pm 0,22$ g de lipídios por unidade, a maior perda ocorre nos minutos iniciais do processamento, tendendo a estabilização pela formação da película do alimento. Esta decorre principalmente pela perda de água e desnaturação de proteínas acompanhada de mudança de cor pela oxidação da desoximioglobina (vermelho-púrpura) e da oximioglobina (vermelho vivo) a metamioglobina (marrom escuro), conforme Poon et al (2001).

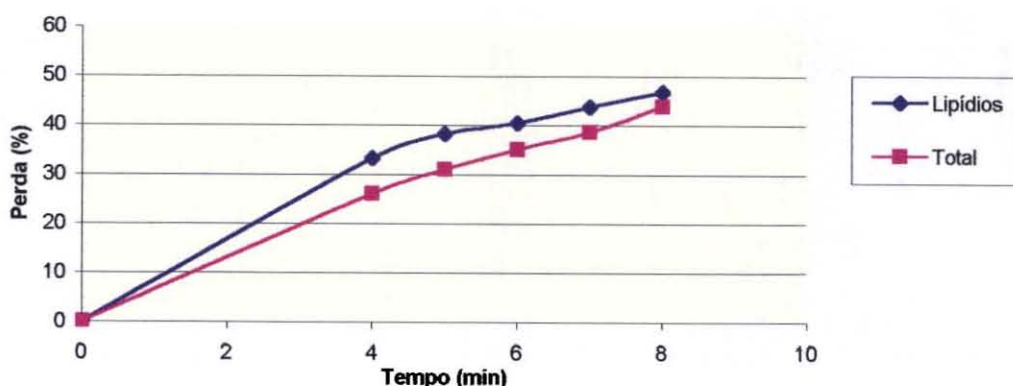


Figura 17: Perdas (água e lipídios totais) de hambúrguer regular com massa inicial de 56 gramas, em função do tempo de processamento em chapa a 250°C (n = 3)

No trabalho de Rodriguez-Estrada et al (1997), foi observado que as perdas lipídicas dependiam também do tipo de processamento térmico (tabela 09).

Tabela 09: Perda lipídica em hambúrgueres com massa inicial de 122,5 gramas, em função do tipo de processamento (n = 3), conforme Rodriguez-Estrada et al (1997)

Processamento	Condições	Perda lipídica (%)
Fritura em panela	15 minutos / 180°C	11,7
Microondas com “grill”	10 minutos / 1000w	16,5
Microondas	6 minutos / 1000w	19,5
Grelha	30 minutos / 225°C	21,7
Cozimento	20 minutos / 100°C	23,0
Chapa de churrasco	18 minutos / 200°C	23,1

Nota-se que os valores relatados por Rodriguez-Estrada et al (1997) estão bem abaixo dos encontrados no presente estudo. Estas diferenças provavelmente estão relacionadas com o fato de que as amostras utilizadas por estes pesquisadores tinham 122,5 gramas (teor de lipídios inicial de 13,8%), o que leva a uma relação superfície / volume mais reduzida, minimizando as perdas.

Resultados semelhantes aos citados por Rodriguez-Estrada et al (1997) também foram obtidos por Poon et al (2001) utilizando amostras com massa inicial de 100 gramas, teor inicial de lipídios de 19,46% e perda máxima de 14,49% (n = 2) e por Lercker e Rodriguez-Estrada (2000) com 13,80% de lipídios e perda máxima de 23,19% (n = 2).

5.3 Validação do método cromatográfico para a quantificação de colesterol e óxidos de colesterol

Foi utilizada a técnica desenvolvida por Folch et al (1957) e modificada por Csallany e Ayaz (1976) para a extração do colesterol e seus derivados oxidados e o método de quantificação por HPLC conforme Chen e Chen (1994). As seguintes etapas foram realizadas para a validação destes métodos.

5.3.1 Identificação dos tempos de retenção

A identificação dos compostos de interesse (colesterol, 25-OH, 7-K, 7 α -OH e 7 β -OH) foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos das amostras com aqueles de padrões certificados, adquiridos junto a Steraloids. Foram preparadas e injetadas individualmente no HPLC soluções destes padrões, para a localização destes picos. Após esta etapa, os padrões foram misturados e injetados novamente para a verificação de possíveis interações entre eles, tendo sido obtidos praticamente os mesmos tempos de retenção. Uma vez que os dados concordaram com o trabalho de Chen e Chen (1994) que confirmaram a natureza dos compostos por espectroscopia de massa (GC-MS), não achamos necessária a realização de testes de identificação absoluta como MS (espectroscopia de massa), IR (infravermelho) ou NMR (ressonância magnética nuclear).

A identidade e o tempo de retenção do 7-K, composto mais importante podendo perfazer mais de 50% do material oxidado (Park e Addis, 1985; Kim e Nawar, 1993; Penazzi et al, 1995), também foi confirmada de outra forma. Conforme o item 4.2.3, os cromatogramas foram registrados em 2 canais simultâneos operando em 206 e 233 nm. Como o 7-K é o único composto que apresenta absorvidade molar mais alta em 233 nm do que em 206 nm (figura 14), o registro gráfico deste composto em 233 nm deveria exibir pico com altura maior do que em 206 nm. Todas as amostras contendo 7-K exibiram cromatogramas com estas características, confirmando a natureza e o tempo de retenção deste derivado oxidado.

Na figura 18 pode ser visto o cromatograma dos compostos de interesse, sendo o traço azul obtido em 206 nm e o vermelho em 233 nm.

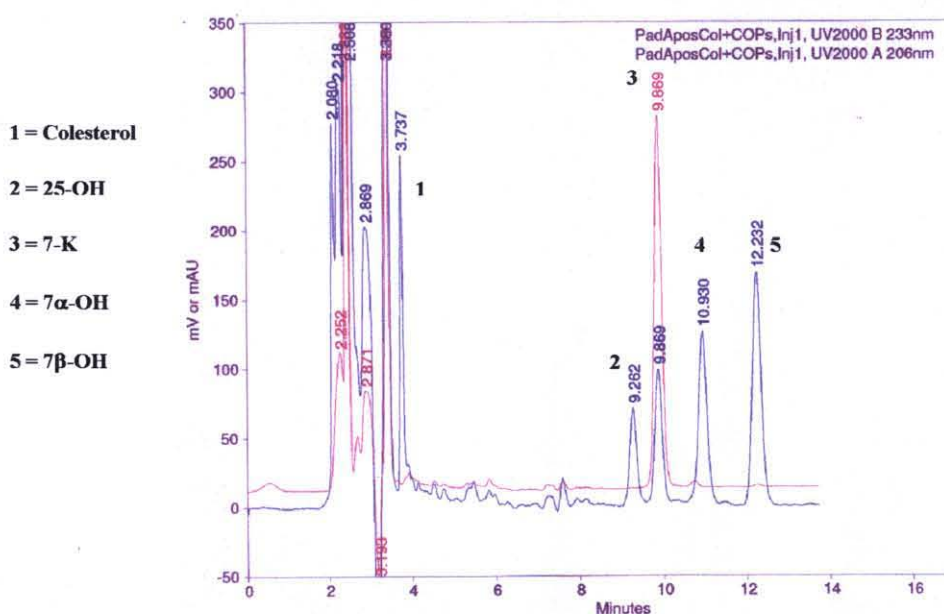


Figura 18: Cromatograma obtido utilizando-se a técnica de HPLC em fase intermediária, para colesterol, 25-OH, 7-K, 7 α -OH e 7 β -OH

Verifica-se, na figura 18, uma ótima resolução para os picos de interesse em corrida isocrática com tempo de 14 minutos. Os picos apresentam boa simetria, o que indica que a escolha das condições analíticas foi adequada. Compostos apolares sem interesse neste estudo, apresentaram eluição antes do colesterol, provando que a escolha do método de extração foi adequada. Após 5 injeções consecutivas, foram determinados os tempos de retenção para os compostos de interesse (tabela 10).

Tabela 10: Tempos de retenção utilizando-se a técnica de HPLC em fase intermediária para colesterol, 25-OH, 7-K, 7 α -OH e 7 β -OH (n = 5)

Análise	Tempos de retenção				
	Colesterol	25-OH	7-K	7 α -OH	7 β -OH
1	3,744	9,300	9,895	10,974	12,282
2	3,737	9,262	9,869	10,930	12,232
3	3,742	9,377	9,750	10,915	12,242
4	3,806	9,320	9,867	11,076	12,417
5	3,787	9,505	9,862	10,919	12,201
Média	3,763	9,353	9,849	10,963	12,275
Desvio padrão	0,031	0,095	0,057	0,068	0,085

Comparando-se estes resultados com os relatados por Chen e Chen (1994), obteve-se uma condição analítica mais eficiente em função do uso de solvente mais apolar, obtendo-se uma melhor resolução, maior simetria dos picos, melhor linha base e a possibilidade de se quantificar todos os compostos em uma única corrida isocrática de 14 minutos, incluindo os derivados 7 α -OH e 7 β -OH.

5.3.2 Curvas dos padrões de colesterol e óxidos de colesterol

Confirmados os tempos de retenção do colesterol e dos derivados oxidados de interesse, foram preparadas 6 soluções com concentrações conhecidas, utilizando-se os padrões certificados. Estas diluições foram injetadas 3 vezes cada, verificando-se excelente reprodutibilidade entre as áreas obtidas, com coeficientes de variação entre 0,2 e 6,9%. As médias destas áreas foram plotadas contra as massas, gerando um gráfico para cada uma das substâncias em estudo. Para todas elas, foram obtidas equações lineares (1^o grau), com R-quadrado maior que 0,999. As equações foram determinadas pelo método dos quadrados mínimos através do programa Excel for Windows[®] da Microsoft[®] versão 2000, sendo incluídas em cada gráfico. As tabelas com os dados obtidos e os respectivos gráficos estão a seguir.

Tabela 11: Padrões de colesterol analisados por HPLC (n = 3)

Massa (μg)	12,40	6,20	3,10	1,55	0,78	0,39
Injeção 1	10788720	5601188	2782531	1403262	692015	358770
Injeção 2	10793699	5575252	2773975	1358070	701942	335661
Injeção 3	10988643	5629935	2778330	1391997	681212	343498
Área média	10857021	5602125	2778279	1384443	691723	345976
Desvio padrão	114015	27354	4278	23524	10368	11752
Coef. de variação (%)	1,1	0,5	0,2	1,7	1,5	3,4

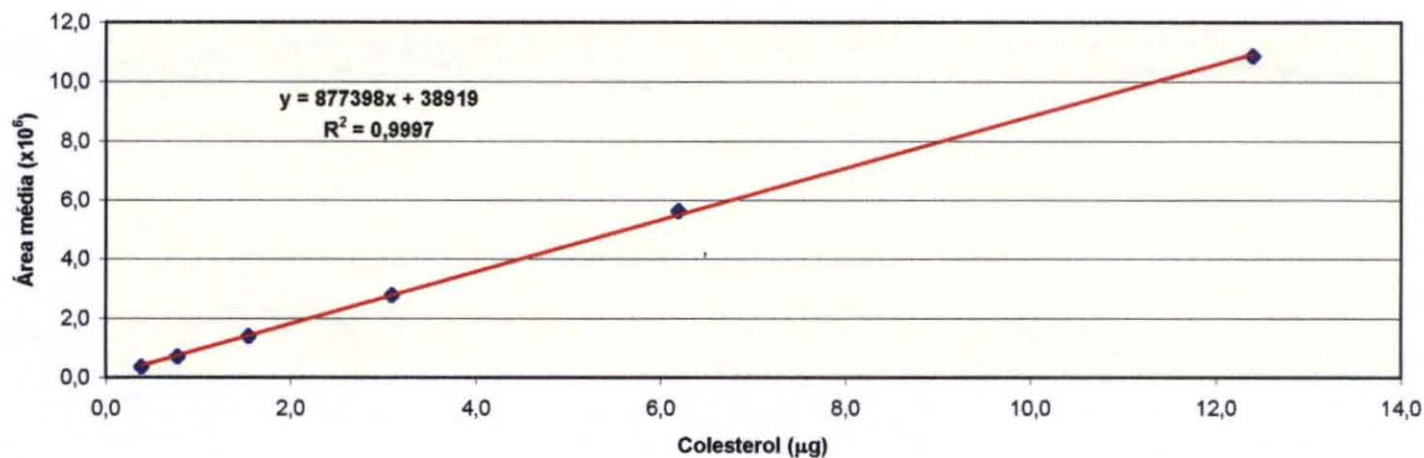


Figura 19: Curva de calibração para padrões de colesterol analisados por HPLC (n = 3)

Tabela 12: Padrões de 25-OH analisados por HPLC (n = 3)

Massa (μg)	4,00	2,00	1,00	0,50	0,25	0,13
Injeção 1	3386689	1719618	849346	425679	225330	118068
Injeção 2	3246477	1750860	814669	406113	200167	107754
Injeção 3	3239985	1740476	814868	410180	222914	123455
Área média	3291050	1736985	826294	413991	216137	116426
Desvio padrão	82889	15911	19964	10325	13883	7978
Coef. de variação (%)	2,5	0,9	2,4	2,5	6,4	6,9

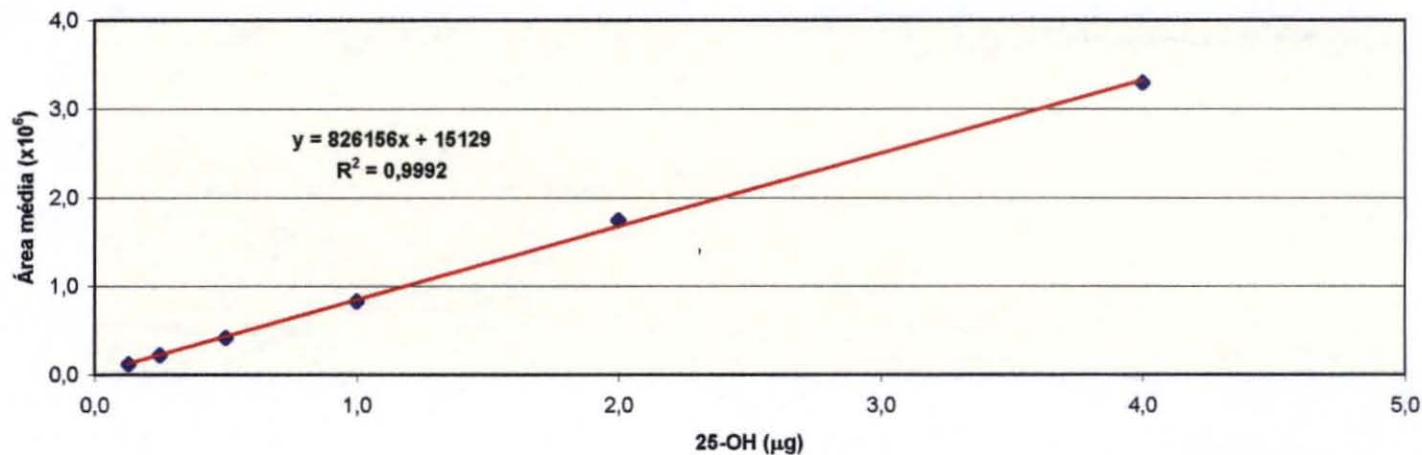


Figura 20: Curva de calibração para padrões de 25-OH analisados por HPLC (n = 3)

Tabela 13: Padrões de 7-K analisados por HPLC (n = 3)

Massa (µg)	8,04	4,02	2,01	1,01	0,50	0,25
Injeção 1	23473255	11206016	5620331	2833807	1560276	753881
Injeção 2	23479542	11248641	5643999	2888355	1559825	808872
Injeção 3	23413120	11224647	5627869	2744455	1403288	741230
Área média	23455306	11226435	5630733	2822206	1507796	767994
Desvio padrão	36669	21369	12091	72648	90507	35962
Coef. de variação (%)	0,2	0,2	0,2	2,6	6,0	4,7

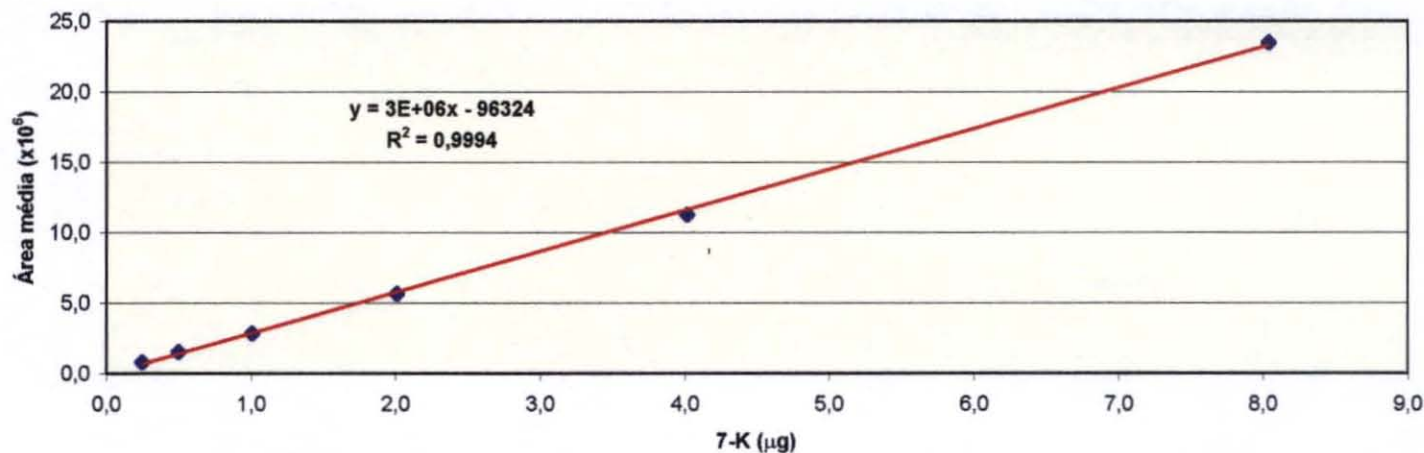


Figura 21: Curva de calibração para padrões de 7-K analisados por HPLC (n = 3)

Tabela 14: Padrões de 7 α -OH analisados por HPLC (n = 3)

Massa (μg)	4,40	2,20	1,10	0,55	0,28	0,14
Injeção 1	6211188	3065058	1583321	799876	394532	192434
Injeção 2	6028607	3218387	1550571	771055	393459	200890
Injeção 3	6083277	3237868	1562387	754597	383901	194567
Área média	6107691	3173771	1565426	775176	390631	195964
Desvio padrão	93707	94651	16585	22919	5853	4398
Coef. de variação (%)	1,5	3,0	1,1	3,0	1,5	2,2

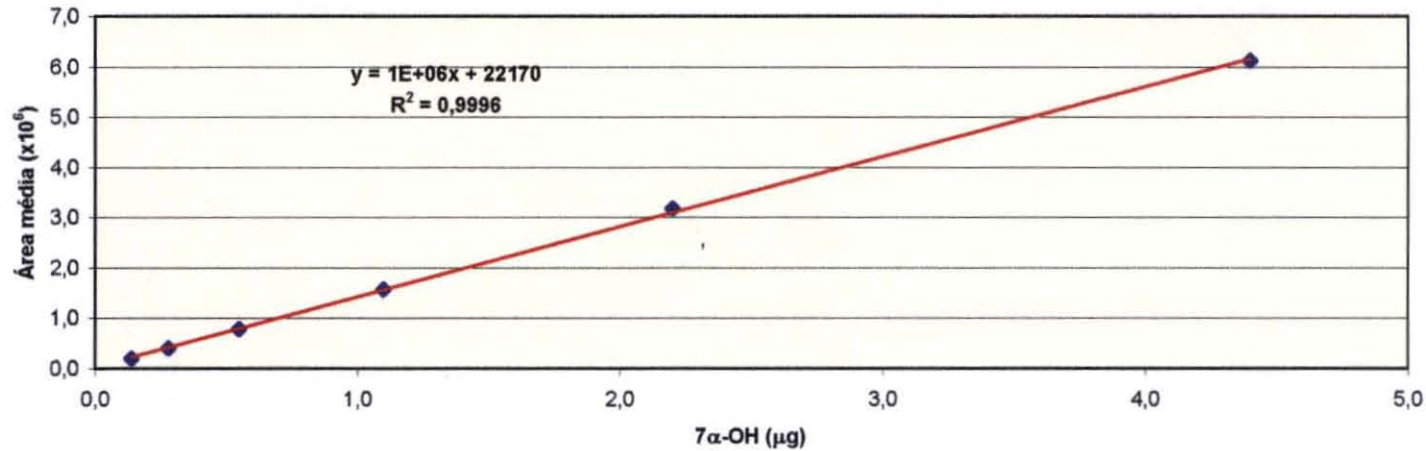


Figura 22: Curva de calibração para padrões de 7 α -OH analisados por HPLC (n = 3)

Tabela 15: Padrões de 7 β -OH analisados por HPLC (n = 3)

Massa (μg)	4,60	2,30	1,15	0,58	0,29	0,14
Injeção 1	6136898	3020104	1570049	767853	384831	190056
Injeção 2	6244049	3233078	1524977	760896	365308	180890
Injeção 3	6036409	3195856	1581118	751480	387722	194567
Área média	6139119	3149679	1558715	760076	379287	188504
Desvio padrão	103838	113748	29737	8217	12192	6969
Coef. de variação (%)	1,7	3,6	1,9	1,1	3,2	3,7

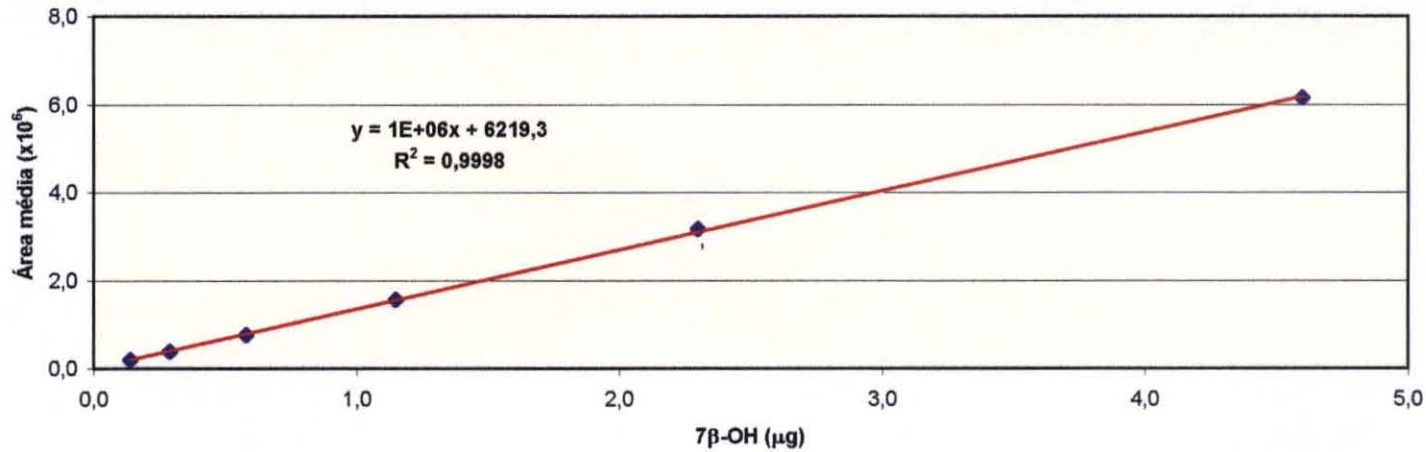


Figura 23: Curva de calibração para padrões de 7 β -OH analisados por HPLC (n = 3)

5.3.3 Testes de recuperação

A etapa seguinte visou a determinação do índice de recuperação dos compostos de interesse após a realização do processo de extração. Utilizando-se os padrões certificados, foi preparada uma solução com quantidades conhecidas de colesterol, 25-OH, 7-K, 7 α -OH e 7 β -OH, conforme a tabela 16.

Tabela 16: Preparação dos padrões para os testes de recuperação

Composto	Massa utilizada (g)	Volume de solução (mL)	Massa em 20 μ L (μ g)
Colesterol	0,0050	100	1,00
25-OH	0,0054	100	1,08
7-K	0,0026	100	0,52
7 α -OH	0,0071	100	1,42
7 β -OH	0,0099	100	1,98

20 μ L desta solução foram injetados 5 vezes no HPLC. Com as áreas obtidas e com o uso dos gráficos do item 5.3.2, foram calculadas as massas de cada um dos componentes. Pode ser visto na tabela 17 que os valores obtidos por HPLC concordam bastante bem com as massas reais utilizadas na preparação do padrão.

Tabela 17: Massas dos padrões calculadas por HPLC (n = 5)

Injeção	Colesterol	25-OH	7-K	7 α -OH	7 β -OH
1	951510	889393	1557129	1410421	1990239
2	954228	871234	1546824	1361535	1985002
3	936069	893444	1505548	1441924	1987911
4	941050	870314	1540653	1419596	2073025
5	952643	880012	1528291	1421987	2042852
Média	947100	880879	1535689	1411093	2015806
Desvio padrão	8051	10437	19821	29991	39957
Coef. de variação (%)	0,85	1,18	1,29	2,13	1,98
Massa por HPLC (μ g)	1,04	1,05	0,54	1,39	2,01

Esta mesma solução contendo os 5 componentes foi submetida ao processo extrativo (Folch et al, 1957; Csallany e Ayaz, 1976) e o extrato final foi novamente analisado por HPLC. Os valores obtidos após estas operações refletem os índices de recuperação do processo (tabela 18).

Tabela 18: Índices de recuperação do colesterol e seus óxidos por HPLC (n = 5)

Injeção	Colesterol	25-OH	7-K	7 α -OH	7 β -OH
1	860907	824489	1422416	1260472	1832940
2	857050	785641	1443487	1336292	1865870
3	890454	794009	1493485	1263008	1914308
4	884535	798907	1437880	1294049	1874812
5	899703	815110	1448646	1290529	1779056
Média	878530	803631	1449183	1288870	1853397
Desvio padrão	18698	15854	26644	30634	50669
Coef. de variação (%)	2,13	1,97	1,84	2,38	2,73
Recuperação (%)	92,76 \pm 1,97	91,23 \pm 1,80	94,37 \pm 1,73	91,34 \pm 2,17	91,94 \pm 2,51

Trabalhos realizados por outros pesquisadores relatam índices de recuperação próximos aos encontrados acima. Como comparação, relacionamos na tabela 19 os valores determinados no estudo de quantificação de óxidos de colesterol em carne de porco realizado em 1989 por Csallany et al (autores da modificação do método original de extração) e em 2001 por Aizpurúa em tese de doutorado sobre a formação de óxidos de colesterol em maionese em função da armazenagem, realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Tabela 19: Índices de recuperação de colesterol e seus óxidos em estudos similares

Pesquisador	Índices de recuperação (%)				
	Colesterol	25-OH	7-K	7 α -OH	7 β -OH
Csallany et al, 1989 (n = 3)	-----	93	88	85	87
Aizpurúa, 2001 (n = 6)	93,98 \pm 8,84	89,90 \pm 9,30	95,59 \pm 9,18	90,04 \pm 11,18	90,65 \pm 11,08

5.3.4 Limites de detecção e quantificação

No último item da validação, foi realizada a determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o método cromatográfico (HPLC). Conforme Leite (1998), o limite de detecção equivale ao menor valor detectado em confiabilidade de precisão aceitável para o sistema utilizado, equivalendo matematicamente a 3 vezes o ruído médio obtido com o uso de um branco (ou controle). Já o limite de quantificação equivale ao menor valor que pode ser determinado com confiabilidade aceitável (precisão e exatidão) dentro da condição analítica, sendo igual a 10 vezes o ruído médio. Para esta determinação, utilizamos função existente no software PC1000[®] for OS2 do HPLC que calcula o ruído de corridas cromatográficas. 20 µL da fase móvel hexano:2-propanol (97:3 v/v) foram injetados 8 vezes, obtendo-se os ruídos (mV) da tabela 20. Uma vez que o 7-K foi medido em 233 nm e os compostos restantes (colesterol, 25-OH, 7 α -OH e 7 β -OH) em 206 nm, determinamos estes ruídos nos respectivos comprimentos de onda.

Tabela 20: Determinação do ruído do sistema cromatográfico (n = 8)

Injeção	Ruído (206 nm)	Ruído (233 nm)
1	$1,54 \cdot 10^4$	$0,92 \cdot 10^3$
2	$1,06 \cdot 10^4$	$0,59 \cdot 10^3$
3	$2,05 \cdot 10^4$	$1,22 \cdot 10^3$
4	$1,45 \cdot 10^4$	$0,98 \cdot 10^3$
5	$1,38 \cdot 10^4$	$0,84 \cdot 10^3$
6	$1,05 \cdot 10^4$	$0,73 \cdot 10^3$
7	$1,33 \cdot 10^4$	$0,95 \cdot 10^3$
8	$2,03 \cdot 10^4$	$1,31 \cdot 10^3$
Ruído médio	$1,48 \cdot 10^4$	$0,94 \cdot 10^3$
Desvio padrão	$0,38 \cdot 10^4$	$0,24 \cdot 10^3$

Considerando-se que o ruído médio é o mesmo mas os compostos apresentam sensibilidade diferenciada para o detector utilizado, fizemos uso das equações já apresentadas no item 5.3.2 para determinarmos os limites de detecção e quantificação

de cada um deles (tabela 21). A título de comparação, incluímos na mesma tabela os limites de detecção obtidos por outros pesquisadores em trabalhos de quantificação de colesterol e seus óxidos por HPLC em carne de porco (Csallany et al, 1989), gema de ovo (Caboni et al, 1997) e maionese (Aizpurúa, 2001).

Tabela 21: Comparação dos limites de detecção e de quantificação do método cromatográfico deste estudo e de trabalhos similares

	Colesterol (g)	25-OH (g)	7-K (g)	7 α -OH (g)	7 β -OH (g)
LQ (n = 8)	$1,24 \times 10^{-7}$	$1,62 \times 10^{-7}$	$0,35 \times 10^{-7}$	$1,26 \times 10^{-7}$	$1,42 \times 10^{-7}$
LD (n = 8)	$0,62 \times 10^{-8}$	$3,54 \times 10^{-8}$	$3,30 \times 10^{-8}$	$2,22 \times 10^{-8}$	$3,82 \times 10^{-8}$
Csallany et al 1989 LD (n = 3)	$1,10 \times 10^{-8}$	$2,20 \times 10^{-8}$	$0,38 \times 10^{-8}$	$1,50 \times 10^{-8}$	$1,70 \times 10^{-8}$
Caboni et al 1997 LD (n = 3)	----	----	$6,0 \times 10^{-8}$	$3,2 \times 10^{-7}$	$2,8 \times 10^{-7}$
Aizpurúa 2001 LD (n = 10)	$1,09 \times 10^{-8}$	$0,67 \times 10^{-8}$	$0,20 \times 10^{-8}$	$3,11 \times 10^{-8}$	$6,90 \times 10^{-8}$

Pode ser visto que os limites obtidos estão compatíveis com outros trabalhos realizados com colesterol e óxidos de colesterol. Dependendo do sistema utilizado (método, detector, solventes, matriz a ser analisada, etc.), as curvas de área “versus” massa podem não passar pela origem, como ocorreu neste estudo (figuras 19 a 23). Neste caso, o termo b da equação $y = ax + b$ que desconta estas interferências não é nulo e, portanto, para o cálculo dos LQs (10 vezes o ruído médio) é incorreto multiplicar-se os LDs (3 vezes o ruído médio) por 3,33 devendo então ser calculados a partir dos ruídos médios e das equações determinadas.

5.4 Teor de colesterol e óxidos de colesterol

Após os testes de validação, os 4 tipos de hambúrgueres crus e processados termicamente foram submetidos ao processo de extração e análise quanto ao seu conteúdo de colesterol, 25-OH, 7-K, 7 α -OH e 7 β -OH, gerando as tabelas a seguir. Nestas, foi utilizada a seguinte legenda:

- ND (não detectado): indica que o componente está ausente ou presente em quantidade que não pode ser detectada com confiabilidade estatística em todas as 3 amostras analisadas;
- TR (traços): indica que a presença da substância foi confirmada em pelo menos 1 das 3 amostras analisadas, mas a sua quantificação não se mostrou possível com confiabilidade estatística;
- Para as determinações acima do limite de quantificação, foi relatada a média das 3 amostras analisadas, com o respectivo desvio padrão.

Os valores obtidos foram convertidos para o equivalente a um hambúrguer no momento do consumo. Este procedimento foi adotado pois facilita a utilização das informações por profissionais de diversas áreas de atuação, sem a execução de cálculos adicionais. Nas amostras processadas termicamente, a temperatura interna no centro do hambúrguer ao final do processamento foi medida com o uso de medidor digital e incluída nas tabelas de resultados.

Tabela 22: Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres crus com massa inicial de 56 gramas

Hambúrguer tipo	Colesterol (mg)	25-OH (μ g)	7-K (μ g)	7 α -OH (μ g)	7 β -OH (μ g)
Regular	38,53 \pm 1,12	ND	TR	ND	ND
Suave	37,90 \pm 1,04	ND	ND	ND	ND
Churrasco	38,32 \pm 1,63	ND	TR	TR	ND
FSP-USP	40,57 \pm 0,79	ND	ND	ND	ND

Valores: média \pm desvio padrão, ND = não detectado, TR = traços (n = 3)

Tabela 23: Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres com massa inicial de 56 gramas, após processamento por 5 minutos em chapa com temperatura inicial de 250°C

Hambúrguer tipo	Temperatura final (°C)	Colesterol (mg)	25-OH (µg)	7-K (µg)	7α-OH (µg)	7β-OH (µg)
Regular	80 ± 2	32,49 ± 1,44	ND	TR	ND	ND
Suave	84 ± 1	34,22 ± 1,60	ND	ND	ND	ND
Churrasco	83 ± 2	32,01 ± 2,17	ND	ND	ND	ND
FSP-USP	83 ± 2	36,40 ± 0,81	ND	ND	ND	ND

Valores: média ± desvio padrão, ND = não detectado, TR = traços (n = 3)

Tabela 24: Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres com massa inicial de 56 gramas, após processamento por 6 minutos em chapa com temperatura inicial de 250°C

Hambúrguer tipo	Temperatura final (°C)	Colesterol (mg)	25-OH (µg)	7-K (µg)	7α-OH (µg)	7β-OH (µg)
Regular	85 ± 2	30,91 ± 1,19	ND	TR	ND	ND
Suave	86 ± 3	32,04 ± 1,51	ND	ND	ND	ND
Churrasco	87 ± 3	31,87 ± 1,75	ND	TR	ND	ND
FSP-USP	86 ± 3	35,53 ± 0,98	ND	ND	ND	ND

Valores: média ± desvio padrão, ND = não detectado, TR = traços (n = 3)

Tabela 25: Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres com massa inicial de 56 gramas, após processamento por 7 minutos em forno convencional com temperatura inicial de 250°C

Hambúrguer tipo	Temperatura final (°C)	Colesterol (mg)	25-OH (µg)	7-K (µg)	7α-OH (µg)	7β-OH (µg)
Regular	83 ± 3	32,29 ± 1,84	ND	ND	ND	ND
Suave	84 ± 2	32,91 ± 1,33	ND	TR	ND	ND
Churrasco	82 ± 1	33,17 ± 1,46	ND	ND	ND	ND
FSP-USP	81 ± 2	34,62 ± 0,90	ND	ND	ND	ND

Valores: média ± desvio padrão, ND = não detectado, TR = traços (n = 3)

Tabela 26: Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres com massa inicial de 56 gramas, após processamento por 8 minutos em forno convencional com temperatura inicial de 250°C

Hambúrguer tipo	Temperatura final (°C)	Colesterol (mg)	25-OH (µg)	7-K (µg)	7α-OH (µg)	7β-OH (µg)
Regular	86 ± 2	31,91 ± 0,94	ND	ND	ND	ND
Suave	88 ± 1	31,15 ± 1,36	ND	ND	ND	ND
Churrasco	85 ± 2	32,44 ± 1,77	ND	TR	TR	ND
FSP-USP	84 ± 3	34,09 ± 1,03	ND	TR	ND	ND

Valores: média ± desvio padrão, ND = não detectado, TR = traços (n = 3)

Tabela 27: Massas de colesterol e derivados oxidados em hambúrgueres com massa inicial de 56 gramas, após processamento por 2 minutos em microondas seguido de dourador (“grill”) por 5 minutos

Hambúrguer tipo	Temperatura final (°C)	Colesterol (mg)	25-OH (µg)	7-K (µg)	7α-OH (µg)	7β-OH (µg)
Regular	86 ± 3	29,28 ± 1,98	ND	TR	ND	ND
Suave	89 ± 1	28,17 ± 1,04	ND	TR	ND	ND
Churrasco	90 ± 2	30,16 ± 1,55	ND	ND	ND	TR
FSP-USP	89 ± 3	32,66 ± 0,88	ND	ND	ND	ND

Valores: média ± desvio padrão, ND = não detectado, TR = traços (n = 3)

As amostras processadas termicamente mostraram redução da quantidade de colesterol quando comparadas às respectivas amostras cruas, possivelmente pela perda deste composto na gordura eluída do alimento durante o seu processamento. Conforme Rodriguez-Estrada et al (1997), esta redução ainda pode estar associada à degradação térmica, à associação do colesterol com outras moléculas orgânicas ou, provavelmente, à combinação destes e de outros fatores.

Após a análise de variância (ANOVA) através do teste F e do teste de Tukey, concluiu-se que a redução do colesterol observada para cada tipo de processamento térmico (tipo 1 = chapa a 250°C por 5', tipo 2 = chapa a 250°C por 6', tipo 3 = forno a 250°C por 7', tipo 4 = forno a 250°C por 8', tipo 5 = microondas 2' + “grill” 5')

apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Pelo teste de Tukey, foi possível verificar homogeneidade em alguns tipos de processamentos térmicos, conforme descrito abaixo:

a) Os processamentos tipo 1 e 3 recaíram em um subgrupo (“subset”) homogêneo, com menores perdas de colesterol, como consequência da menor temperatura interna final;

b) Os processamentos tipo 2 e 4 recaíram em um segundo subgrupo homogêneo, com perdas de colesterol um pouco mais elevadas, por apresentar temperatura interna final intermediária;

c) O processamento tipo 5 recaiu em um terceiro subgrupo isolado dos demais, com maiores perdas de colesterol, por apresentar maior temperatura interna final.

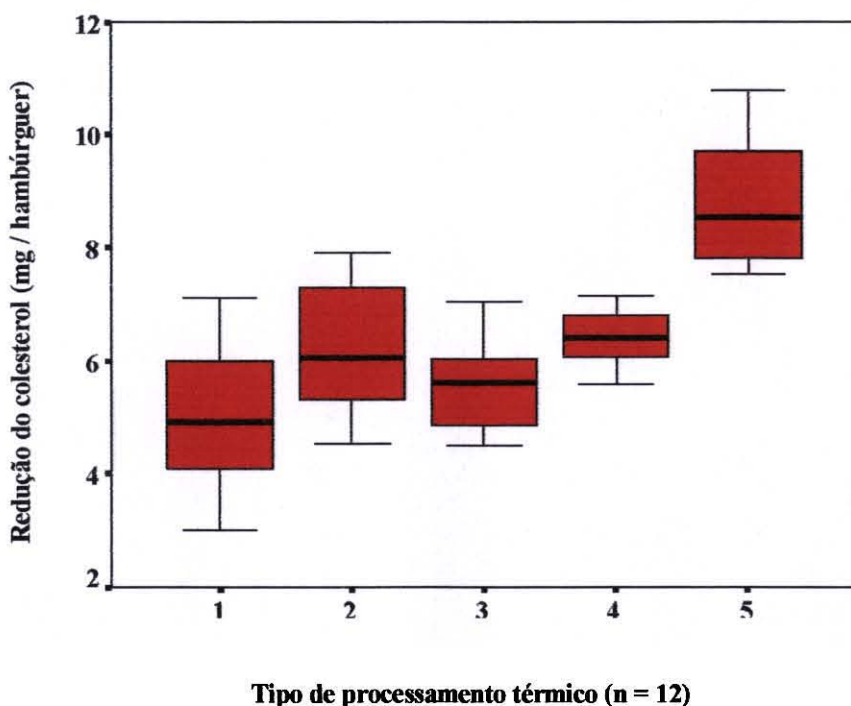


Figura 24: Representação (“boxplot”) da redução do colesterol (mg / hambúrguer com massa inicial de 56 gramas) em função do tipo de processamento térmico, calculado pelo SPSS® com significância estatística ($p < 0,05$)

Na figura 24, a perda média de colesterol para cada tipo de processamento pode ser visualizada como uma linha escura dentro dos intervalos de dados (caixas vermelhas). Os valores máximo e mínimo obtidos para cada tipo de processamento também estão indicados.

Durante os testes, verificou-se que não houve formação adicional de óxidos de colesterol (25-OH, 7-K, 7 α -OH e 7 β -OH) em quantidades quantificáveis, dentro das condições dos ensaios realizados. Em função do alto teor de água dos hambúrgueres, boa parte da energia transferida para os mesmos durante o processamento térmico é transformada em calor latente de vaporização, impedindo o aquecimento excessivo do alimento, o que reduz a possibilidade de formação de óxidos de colesterol, conforme Chien et al (1998), Kesava-Rao et al (1996) e Kim e Nawar (1993).

É importante mencionar que a temperatura de 74°C foi ultrapassada em todos os processamentos utilizados, o que é necessário para se garantir uma boa qualidade microbiológica do alimento, conforme indicado por Germano (2001). Já conforme Poon et al (2001), a temperatura de 70°C por 2 minutos seria suficiente para garantir a segurança microbiológica de produtos de carne moída.

Trabalhos de vários autores como Tu et al (1967), Park e Addis (1985), Higley et al (1986) e compilações como a de Paniangvait et al (1995) e de Aizpurúa e Tenuta-Filho (2002) indicam que carnes bovinas de boa qualidade deverão estar isentas ou apresentar apenas traços destes derivados oxidados, desde que sejam estocadas em condições adequadas, confirmando os resultados obtidos neste estudo.

6. CONCLUSÕES

Após a realização deste trabalho, foi possível comprovar as seguintes hipóteses levantadas em função dos objetivos propostos:

- O procedimento extrativo utilizado mostrou-se de execução simples e com baixa tendência a degradação ou interconversão dos óxidos de colesterol, uma vez que não utiliza calor ou meios alcalinos, possibilitando a extração do colesterol e dos óxidos de colesterol livres que totalizam mais de 90% do total existente nos hambúrgueres;
- O método de análise por HPLC mostrou-se adequado à investigação do colesterol e dos óxidos de colesterol de interesse (25-OH, 7-K, 7 α -OH e 7 β -OH) em uma única corrida isocrática com cerca de 14 minutos de duração;
- Hambúrgueres crus isentos ou praticamente isentos de óxidos de colesterol não apresentaram aumento destes compostos em quantidades quantificáveis após os processamentos térmicos avaliados;
- De 10 a 26% do colesterol inicialmente presente nos hambúrgueres crus foi eliminado, provavelmente por eluição junto com a gordura perdida do alimento durante o processamento térmico;
- Os resultados obtidos concordaram com outros trabalhos que indicam uma baixa ou nenhuma formação de óxidos de colesterol em carnes moídas e hambúrgueres, desde que a qualidade da carne utilizada seja preservada por armazenagem e manipulação adequada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aizpurúa ICM. Formação de óxidos de colesterol em maionese mantida em diferentes condições de estocagem. São Paulo; 2001. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
2. Aizpurúa ICM, Tenuta Filho A. Óxidos de colesterol: ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. **Rev Bras Ciências Farmac** 2002; 38(4):431-42.
3. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K et al. Estrutura da membrana. In: **Fundamentos de biologia celular**. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda; 1999. p.354-61.
4. Ansari GAS, Smith LL. High performance liquid chromatography of cholesterol autoxidation products. **J Chromatogr** 1979; 175: 307-15.
5. Ansari GAS, Walker RD, Smart VB, Smith LL. Further investigation of mutagenic cholesterol preparations. **Food Chem Toxicol** 1982; 20: 35-41.
6. Baranowski A, Adams CWM, Bayliss HOB, Bowyer DB. Connective tissue responses to oxysterols. **Atherosclerosis** 1982; 41: 255-66.
7. Bascoul J, Domergue N, Mourot J, Debry G, Paulet AC. Intestinal absorption and fecal excretion of 5,6 α -cholest-3 β -ol by the male Wistar rat. **Lipids** 1986; 21: 744-7.
8. Beckwith ALJ, Davies AG, Davison IGE, Maccoll A, Mruzek MH. The mechanism of the rearrangement of allylic hydroperoxides: 5 α -hydroperoxi-3 β -hydroxycholest-6-ene and 7 α -hydroperoxi-3 β -hydroxycholest-6-ene. **J Chem Soc Perkin Trans II** 1989: 815-24.
9. Bessalle R, Lavie D. Withanolide C: a chlorinated withanolide from *Withania somnifera*. **Phytochemistry** 1992; 31(10): 3648-51.
10. Björkhem I, Breuer O, Diczfalusy U, Lund E. Oxysterols and atherosclerosis – a minireview. In: **Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention**. London: Bookcraft Ltd; 1996. p.11-7.
11. Boissonneault GA, Henning B, Ouyang CM. Oxysterols, cholesterol biosynthesis and vascular endothelial cell monolayer barrier function. **Proc Soc Exp Biol Med** 1991; 196: 338-43.

12. Caboni MF, Fedrizzi G, Lercker G. Sulla presenza de alcuni prodotti di ossidazione nella carne bovina. In: **Workshop CNR-RAISA Flair Flow Europe** 1995; Udine, Italy. p.143-8.
13. Caboni MF, Costa A, Rodriguez-Estrada MT, Lercker G. High performance liquid chromatographic separation of cholesterol oxidation products. **Chromatographia** 1997; 46(3/4): 151-5.
14. Candide C, Reyftmann JP, Santus R, Mazière JC, Molière P, Goldstein S. Modification of ϵ -amino group of lysines, cholesterol oxidation and oxidized lipid-porphyrin photosensitized oxidation of human LDL. **Photochem Photobiol** 1988; 48(2): 137-46.
15. Careri M, Mangia A, Musci M, Parolari G. Development of gas chromatography method for determination of cholesterol oxides in meat products. **Chromatographia** 1998; 47(1/2): 42-8.
16. Carmo HCE. Pesquisa de orçamentos familiares 1998 – 1999: principais resultados. **Informações FIPE** 1999.
17. Chen BH, Chen YC. Evaluation of the analysis of cholesterol oxides by liquid chromatography. **J Chromatogr** 1994; 661: 127-36.
18. Cheng D, Chang CC, Qu X, Chang TY. Activation of ACAT by cholesterol or by oxysterols in a cell-free system. **J Biol Chem** 1995; 270: 685-95.
19. Chien JT, Wang HC, Chen BH. Kinetic model of the cholesterol oxidation during heating. **J Agric Food Chem** 1998; 46(7): 2572-7.
20. Chisolm GM, Ma G, Irwin KC, Martin LL, Gunderson KG, Lindberg LF et al. 7 β -hydroperoxycholest-5-en-3 β -ol: a component of human atherosclerotic lesion. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91: 11452-6.
21. Christison JK, Rye KA, Stocker R. Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by CETP. **J Lipid Res** 1995; 36: 2017-26.
22. Csallany AS, Ayaz KL. Quantitative determination of organic solvent soluble lipofuscin pigments in tissues. **Lipids** 1976; 11(5): 412-7.
23. Csallany AS, Kindom SE, Addis PB, Lee JH. HPLC method for quantification of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Lipids** 1989; 24(7): 645-51.

24. De Vore VR. TBA values and 7-ketocholesterol in refrigerated raw and cooked ground beef. **J Food Sci** 1988; 53(4): 1058-61.
25. Dollis D, Schuber F. Effects of 2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase inhibitor 2,3:22,23-dioxidosqualene and 24,25-epoxycholesterol on the regulation of cholesterol biosynthesis in human hepatoma cell line HepG2. **Biochem Pharmacol** 1994; 48: 49-57.
26. Emanuel HA, Hassel CA, Addis PB, Bergman SD, Zavorel JH. Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in humans subject fed a meal rich in oxysterols. **J Food Sci** 1991; 56(3): 843-7.
27. Field FJ, Kam NTP, Namathur SN. Regulation of cholesterol metabolism in the intestine. **Gastroenterology** 1990; 99: 539-51.
28. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem** 1957; 226: 497-509.
29. Germano PML, Germano MIS, Ungar ML. Características fundamentais dos alimentos. In: **Higiene e vigilância sanitária**. São Paulo: Editora Varela; 2001. p.629.
30. Gordon MH. The mechanism of antioxidant action. In: **Food Antioxidants**. London: Elsevier Applied Science; 2000. p.1-18.
31. Guardiola F, Codony R, Rafecas M, Boatella J. Formación de derivados oxidados del colesterol em alimentos. **Grasas y Aceites** 1995; 46: 202-12.
32. Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J. Biological effects of oxysterols: current status. **Food Chem Toxic** 1996; 34(2): 193-211.
33. Guo X, Ohno Y, Miyajima A, Sunouchi M, Tanaka A. Oxysterols inhibit gap junctional communications between rat hepatocytes in primary culture. **Pharmacol Toxicol** 1993; 73: 10-3.
34. Guyton AC, Hall JE. Metabolismo dos lipídios. In: **Tratado de fisiologia médica**. 10ª ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 2002. p.787-90.
35. Herian AM, Kuehl NM, Lee K. Growth inhibition of *Mycoplasma gallisepticum* following membrane insertion of cholesterol auto-oxidation products. **J Food Prot** 1985; 48: 1050-3.

36. Heyl BL, Tyrrell DJ, Lambert JD. Cytochrome P-450_{sec}-substrate in interactions: Role of the 3 β and side chain hydroxyls in binding to oxidized and reduced forms of the enzyme. **J Biol Chem** 1986; 261: 2743-9.
37. Higley NA, Taylor SL, Herian AM, Lee K. Cholesterol oxides in processed meats. **Meat Sci** 1986; 16: 176-88.
38. Hodis HN, Crawford DW, Sevanian A. Further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis. **Atherosclerosis** 1991; 89: 117-26.
39. Hu B, Peng SK, Brubaker D, Morin RJ. Influence of cholesterol oxides and antioxidants on prostacyclin production by cultured endothelial cells. **F A S E B J** 1990; 4: 910-5.
40. Hwang KT, Maerkør G. Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. **J Am Oil Chem Soc** 1993; 70(4): 371-5.
41. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3^a ed. São Paulo, 1985. 533p.
42. Jacobson MS. Cholesterol oxides in indian ghee: possible cause of unexplained high risk of atherosclerosis in Indian immigrants population. **Lancet** 1987; ii: 656-8.
43. Johnson EL, Stevenson R. Maintenance and repair. In: **Basic liquid chromatography**. California: Varian Associates, Inc; 1978. p.320-6.
44. Johnson KA, Morrow CA, Knight GD, Scallen TJ. In vivo formation of 25-hydroxycholesterol from endogenous cholesterol after a single meal - dietary cholesterol challenge. **J Lipid Res** 1994; 35: 2241-53.
45. Keler J, Grosch W. Character impact odorants of boiled chicken: changes during refrigerated storage and reheating. **Z Lebensm Unter Forsch** 1997; 2005: 232-8.
46. Kesava-Rao V, Kowale BN, Babu NP, Bisht GS. Effect of cooking and storage on lipid oxidation and development of cholesterol oxidation products in water buffalo meat. **Meat Sci** 1996; 43(2): 179-85.
47. Kim SK, Nawar WW. Parameters influencing cholesterol oxidation with triacylglycerols. **J Am Oil Chem Soc** 1991; 68(12): 931-4.
48. Kim SK, Nawar WW. Parameters influencing cholesterol oxidation. **Lipids** 1993; 28(10): 917-22.

49. Krull UJ, Thompson M, Vanderberg ET, Wong HE. Langmuir-Blodgett film characteristics and phospholipid membrane ion conduction Part I: modification by cholesterol and oxidized derivatives. **Anal Chem Acta** 1985; 172: 83-94.
50. Kubow S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in food. **Free Radic Biol Med** 1992; 12: 63-81.
51. Kucuk O, Stoner-Picking J, Yachnin S, Gordon LI, Williams RM, Lis J, Westerman MP. Inhibition of NK cell-mediated cytotoxicity by oxysterols. **Cell Immunol** 1992; 139: 541-9.
52. Leite F. Sensibilidade, seletividade e limites de detecção e quantificação. In: **Validação em análise química**. 3ª ed. Campinas: Editora Átomo; 1998. p.67-9.
53. Lercker G, Rodrigues-Estrada MT. Cholesterol oxidation: presence of 7-K in different food products. **J Food Composit Anal** 2000; 13: 625-31.
54. Li N, Ohshima T, Shozen K, Ushio H, Koizumi C. Effectes of the degree of unsaturation of coexisting triacylglycerols on cholesterol oxidation. **J Am Oil Chem Soc** 1994; 71(6): 623-7.
55. Lin CY, Morel DW. Esterification of oxysterols in human serum: effects on distribution and cellular uptake. **J Lipid Res** 1996; 37: 168-78.
56. Linseisen J, Wolfram G. Origin, metabolism and adverse health effects of cholesterol oxidation products. **Fett Lipid** 1998a; 100(6): 211-8.
57. Linseisen J, Wolfram G. Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans. **Ann Nutr Metab** 1998b; 42: 221-30.
58. Linseisen J, Hoffman J, Riedl J, Wolfram G. Effect of a single oral dose of antioxidant mixture (vitamin E, carotenoids) on the formation of COPs after ex vivo LDL oxidation in humans. **Eur J Med Res** 1998; 3(1-2): 5-12.
59. Lyons MA, Brown AJ. 7-Ketocholesterol. I **J B C B** 1999; 31: 369-75.
60. Maerker G. Cholesterol autoxidation – current status. **J Am Oil Chem Soc** 1987; 64(3): 388-92.
61. Maerker G, Bunick FJ. Cholesterol oxides II: Measurement of the 5,6 epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions. **J Am Oil Chem Soc** 1986; 63: 771-7.

62. Mahan LK, Escott-Stump S. Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídios. In: **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10^a ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 2002. p.41-52.
63. Maor I, Aviram M. Oxidized low density lipoproteins leads to macrophage accumulation of unesterified cholesterol as a result of lysosomal trapping of the lipoprotein hydrolyzed cholesteryl ester. **J Lipid Res** 1994; 35: 803-19.
64. Maxwell RJ, Marmer WN, Zubillaga MP, Dalikas G. Determination of total fat in meat and meat products by a rapid, dry column method. **J Assoc Off Anal Chem** 1980; 63: 600-3.
65. Mielche MM, Bertelsen G. Approaches to prevention of warmed-over flavor. **Trends Food Sci Tech** 1994; 5: 322-7.
66. Mielche MM, Bertelsen G. Evolution of a mathematical model for prediction of lipid oxidation in heat-treated beef during chill storage. **Z Lebensm Unters Forsch** 1995; 200: 415-9.
67. Nielsen JH, Olsen CE, Jensen C, Skibsted LH. Cholesterol oxidation in butter and dairy spread during storage. **J Dairy Res** 1996; 63: 159-67.
68. Nourooz-Zadeh J. Determination of the autoxidation products from free or total cholesterol: A new multi-step enrichment methodology including the enzymatic release of esterified cholesterol. **J Agric Food Chem** 1990; 38: 1667-73.
69. Ohshima T, Li N, Koizumi C. Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. **J Am Oil Soc** 1993; 70(6): 595-9.
70. Osada K, Kodama T, Yamada K, Sugano M. Oxidation of cholesterol by heating. **J Agric Food Chem** 1993a; 41:1198-202.
71. Osada K, Kodama T, Cui L, Yamada K, Sugano M. Levels and formation of oxidized cholesterol in processed marine foods. **J Agric Food Chem** 1993b; 41: 1893-8.
72. Osada K, Sasaki E, Sugano M. Lymphatic absorption of oxidized cholesterol in rats. **Lipids** 1994; 29: 555-9.
73. Paniangvait P, King AJ, Jones AD, German BG. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **J Food Sci** 1995; 60(6): 1159-74.
74. Park SW, Addis PB. HPLC determination of C-7 oxidized cholesterol derivatives in foods. **J Food Sci** 1985; 50: 1437-41.

75. Park SW, Addis PB. Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. **J Food Sci** 1986; 51(5): 1380-1.
76. Paulet AC, Astruc ME, Bascoul J. Les oxystérols: propriétés biologiques e problèmes nutritionnels. In: **Biologie des lipids chez l'homme**. Paris: Editions Médicales Internationales; 1988. p.154-74.
77. Penazzi G, Caboni MF, Zunin P, Evangelisti F, Tiscornia E, Gallina-Toschi T et al. Routine high performance liquid chromatographic determination of free 7-K in some foods by two different analytical methods. **J Am Oil Chem Soc** 1995; 72(12): 1523-7.
78. Peng SK, Hu B, Morin RJ. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. **J Clin Lab Anal** 1991; 5: 144-52.
79. Pie JE, Spahis K, Seillan C. Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. **J Agric Food Chem** 1991; 39: 250-4.
80. Pinkerton FD, Pelley RP, Shroepfer GJ. Synergistic action of two oxysterols in the lowering of HMG-CoA reductase activity in CHO-K1 cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1992; 186: 569-73.
81. Poon PWB, Durance T, Kitts DP. Composition and retention of lipid nutrients in cooked ground beef relative to heat-transfer rates. **Food Chem** 2001; 74: 485-91.
82. Rhee KS. Enzymic and nonenzymic catalysis of lipid oxidation in muscle foods. **Food Technol** 1988; 42: 127-32.
83. Rodriguez-Estrada MT, Penazzi G, Caboni MF, Bertacco G, Lercker G. Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburgers. **Meat Sci** 1997; 45(3): 365-75.
84. Rodriguez RJ, Arunachalam TA, Parks LW, Caspi E. Growth of a sterol auxotroph derived from *Saccharomyces cerevisiae* on chemically synthesized derivatives of cholesterol possessing side-chain modifications. **Lipids** 1983; 18: 772-5.
85. Sander BD, Smith DE, Addis PB, Park SW. Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products. **J Food Sci** 1989; 54(4): 874-9.
86. Shimura H, Iguchi K, Yamada Y, Nakaike S, Yamagishi T, Matsumoto K, Yokoo C. Aragusterol C: a novel halogenated marine steroid from an Okinawan

- sponge, *Xestospongia sp*, possessing potent antitumor activity. **Experientia** 1994; 50(1): 134-6.
87. Shozen K, Ohshima T, Ushio H, Koizume C. Formation of cholesterol oxides in marine fish products induced by grilling. **Fisheries Sci** 1995; 61(5): 817-21.
88. Shozen K, Ohshima T, Ushio H, Takiguchi A, Koizume C. Effects of antioxidants and packaging on cholesterol oxidation in processed anchovy during storage. **Lebens Winss Technol** 1997; 30: 2-8.
89. Smith LL, Johnson BH. Biological activities of oxysterols. **Free Radic Biol Med** 1989; 7: 285-332.
90. Smith LL. **Cholesterol autoxidation**. New York: Plenum Press; 1981. p.49-123.
91. Smith LL. Review of progress in sterol oxidations 1987 – 1995. **Lipids** 1996; 31: 453-87.
92. Suarna C, Dean RT, May J, Stocker R. Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of α -tocopherol and ascorbate. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1995; 15: 1616-24.
93. Tabacik C, Aliau S, Sainte-Marie J. Regulation of cholesterol biosynthesis at a stage after the HMGCoA reductase step in normal and leukemic (L2C) guinea pig lymphocytes. **Biochem Biophys Acta** 1987; 921: 405-10.
94. Tamasawa N, Tamasawa A, Haykari M. The effect of dietary 7-ketocholesterol, inhibitor of sterol synthesis on hepatic microsomal cholesterol 7 α -hydroxylase activity in rat. **Biochem Biophys Acta** 1994; 1214: 20-6.
95. Tassinari P. Modificazioni dei lipidi di carni rosse dovute a fotossidazioni. Bologna; 1998. [Tesi di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari – Università di Bologna].
96. Torres EAFS. Teor de lipídios em alimentos e sua importância na nutrição. São Paulo; 2000. [Tese de Livre Docência - Faculdade de Saúde Pública da USP].
97. Tu C, Powris WD, Fennema O. Free and esterified cholesterol content of animal muscles and meat products. **J Food Sci** 1967; 32: 30-34.
98. Ulberth F, Rössler D. Comparison of solid phase extraction methods for the cleanup of cholesterol oxidation products. **J Agric Food Chem** 1998; 46(1): 2634-7.

99. Vine DF, Croft KD, Beilin LJ, Mamo JCL. Absorption of dietary cholesterol oxidation products and incorporation into rat lymph chylomicrons. **Lipids** 1997; 32: 887-93.
100. Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA. Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1977; 74: 3922-6.
101. Zhang J, Larson D, Sjövall J. 7 α -hydroxylation of 25-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol in humans fibroblasts. **Biochem Biophys Acta** 1995; 1256: 353-9.
102. Zhou Q, Smith TL, Kummerow FA. Cytotoxicity of oxysterols on cultured smooth muscle cells from human umbilical arteries. **Proc Soc Exp Biol Med** 1993; 202: 75-80.
103. Zubillaga MP, Maerker G. Modified procedure for the extraction of lipids from cured meat. **J Food Sci** 1984; 49: 107-9.
104. Zubillaga MP, Maerker G. Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. **J Food Sci** 1991; 56(5): 1194-7.