Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Determinação da composição de fitosteróis em
cremes vegetais, farináceos e cafés
comercializados em São Paulo.**

Fernanda Perides Akaishi

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Nutrição em Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Nutrição em
Saúde Pública

Orientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth A.
F. S. Torres

São Paulo

2014

Determinação da composição de fitosteróis em cremes vegetais, farináceos e cafés comercializados em São Paulo.

Fernanda Perides Akaishi

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Nutrição em Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Nutrição em
Saúde Pública

Orientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth
AFS Torres

São Paulo

2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

***Aos meus pais, por todos
os ensinamentos, carinho e
suporte.***

Obrigada por tudo!

Agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem a ajuda de diversas pessoas, que participaram direta ou indiretamente, incentivando, apoiando, influenciando e dando forças. São a estas pessoas que eu gostaria de dedicar algumas palavras.

Aos meus pais, Eddie e Dulce, por se esforçarem para proporcionar sempre o melhor para mim e meu irmão. Por todo o carinho, amor, dedicação, ensino e paciência. Por simplesmente existirem! Tenho muito orgulho em dizer que sou filha de vocês.

Ao meu irmão Gabriel pelo companheirismo e coração enorme.

A aqueles que infelizmente a vida me tirou o prazer da presença, meus avós Jorge e Ophélia, que ajudaram eu me transformar naquilo que sou hoje.

A minha avó Diva, por toda atenção dedicada e por me acolher em sua casa nos últimos anos.

Aos meus tios Renato e Giselda, pelo incentivo e interesse em meu trabalho.

Ao Antonio (tio Toninho) e à Lais, ao Evanderci e à Cristina, à Mariza por fazerem parte da minha vida.

Àqueles com quem convivi durante os trabalhos realizados no Emporium da Energia, que me ensinaram e ajudaram a evoluir não só no lado espiritual, mas também na forma de lidar com as aflições do dia a dia.

Em especial, ao Maurício e à Rosana pelo suporte e dedicação. Muito obrigada!

Às amigas que fiz durante a graduação, algumas que continuam na minha vida até hoje, outras que estão afastadas, pelo companheirismo, horas de alegria e aflição compartilhadas e por serem grandes incentivadoras da minha caminhada.

Um agradecimento especial à Bianca, minha amiga desde o primeiro ano da faculdade e que mesmo quando estivemos mais distantes jamais deixou de me apoiar.

Aos colegas que conheci e convivi durante todos esses anos de graduação e mestrado na FSP. As experiências de convívio fora e dentro das aulas foram gratificantes.

À Profa. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres, pela oportunidade de ser sua aluna de iniciação científica e mestrado, pela confiança, pelas orientações e conselhos prestados.

À Dra. Geni Rodrigues Sampaio, pelo profissionalismo e toda atenção dedicada àqueles que frequentam o laboratório, pelos ensinamentos e conselhos, pela ajuda na elaboração e correção deste trabalho.

À Dra Tatiana Saldanha, pelo acolhimento, pelos ensinamentos e ajudas em todos esses anos de trabalho, pelas contribuições na correção desta dissertação.

À Ms Rosana A. M. Soares por todos os conselhos e ajudas.

A todos aqueles com que tive o prazer de trabalhar e conviver durante esses anos de laboratório.

Aos funcionários da Faculdade de Saúde Pública.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

“Por aqui, contudo, não olhamos para trás por muito tempo. Seguimos em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas... e curiosidade nos conduz a novos caminhos.”

Walt Disney

Resumo

Akaishi FP. **Determinação da composição de fitosteróis em creme vegetal, farináceos e cafés comercializados em São Paulo.** [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2014.

Introdução-- Os fitosteróis (FS) são esteróis de origem vegetal, reconhecidos como componentes funcionais devido ao seu papel hipocolesterolêmico. A recomendação de ingestão diária desses compostos é de 1,6 a 2 g/dia, no entanto há poucos estudos que avaliem os teores desses compostos em alimentos, sendo necessária sua quantificação. **Objetivo** - O objetivo deste projeto foi desenvolver uma metodologia e determinar os teores de FS em alguns alimentos usualmente consumidos e comercializados em São Paulo. **Metodologia** – Foram avaliadas amostras de creme vegetal sem sal (*in natura*, e aquecidas a 100° C e 140° C), dos farináceos: farinha de trigo, farinha de milho, farinha de mandioca, amido de milho, café em pó (torras: tradicional, forte e extraforte, descafeinado e *gourmet*), café solúvel instantâneo, cappuccino e da bebida coada. As amostras, em triplicata, foram submetidas ao processo de saponificação a frio e a matéria insaponificável extraída foi derivatizada e posteriormente injetada em cromatógrafo gasoso. **Resultados** – Os principais FS encontrados foram: β -Sitosterol, campesterol e estigmasterol. As maiores médias de teores de FS foram encontradas nos cremes vegetais ($186,2 \pm 21,7$ mg /100g) e nos pós de café moído ($92,24 \pm 3,95$ mg /100g). As farinhas apresentaram teores intermediários, $42,27 \pm 7,09$ mg /100g; $35,10 \pm 10,49$ mg /100g; $22,02 \pm 1,22$ mg /100g; $14,33 \pm 3,07$ mg /100g para farinha de rosca, milho, trigo e mandioca, respectivamente. As amostras cappuccino ($5,73 \pm 0,78$ mg /100g), café solúvel ($4,03 \pm 0,84$ mg /100g) e amido de milho ($3,55 \pm 0,8$ mg /100g) foram as apresentaram menores teores de FS. Nas amostras de creme vegetal, o processamento térmico reduziu os teores totais de FS das amostras *in natura* em 10% e 53,7%, para os aquecimentos até 100° C e 140° C, respectivamente. Não houve influencia do grau de torra e do processo de descafeinização nos teores totais de FS encontrados nas amostras de pó de café moído. **Conclusão:** De acordo com os resultados obtidos os alimentos com maiores teores de fitosteróis são o creme vegetal e o pó de café. Pode-se considerar que o creme vegetal, mesmo sem adição de FS é boa fonte desse nutriente. Nas amostras de café o processamento térmico pouco influenciou nos teores de FS, o mesmo não aconteceu com as amostras de creme vegetal. As mais

baixas concentrações de FS foram observadas nas amostras de farinhas, amidos, cappuccino e café em pó solúvel.

Descritores: Fitosteróis; Café; Creme vegetal; Farináceos.

Akaishi FP. Determination of phytosterols composition in vegetable creams, farinaceous and coffees commercialized in Sao Paulo. **[Dissertation]. Sao Paulo (BR). Public Health School of the University of Sao Paulo; 2014.**

Introduction: Phytosterols (PS) are plant sterols, known as functional components due to its hypocholesterolemic role. The recommendation for daily intake of these compounds is 1.6-2 g/day, however there are few studies that evaluate the content of these compounds in foods, requiring its quantification. **Objective:** the objective of this project was to develop a methodology and determine the content of PS in some foods usually consumed and traded in Sao Paulo. **Methodology:** Were evaluated samples of: unsalted vegetable cream (*in natura*, and heated to 100°C and 140°C), farinaceous: wheat, corn and cassava flour, breadcrumbs and cornstarch, powdered coffee (roasts: traditional, strong and extra strong, decaffeinated and *gourmet*), instant coffee, cappuccino and strained drink coffee. Samples in triplicate were subjected to cold saponification process and unsaponifiable matter was extracted, derivatized and subsequently injected into the gas chromatograph. **Results:** The main PS founded in the samples were: β -sitosterol, campesterol and stigmasterol. The highest average levels of PS were found in vegetable creams (186.2 ± 21.7 mg / 100g) and powdered coffee (92.24 ± 3.95 mg / 100g). Farinaceous had intermediate levels, 42.27 ± 7.09 mg / 100g; 35.10 ± 10.49 mg / 100g; 22.02 ± 1.22 mg / 100g; 14.33 ± 3.07 mg / 100g for breadcrumbs, corn, and wheat and cassava flour, respectively. Cappuccino samples (5.73 ± 0.78 mg / 100g), soluble coffee (4.03 ± 0.84 mg / 100g) and corn starch (3.55 ± 0.8 mg / 100g) showed lower levels of PS. In samples of vegetable cream, thermal processing reduced in 10% and 53.7%, for heating up to 100°C and 140°C, the total content of PS comparing with *in natura* samples. There was no influence of the degree of roasting and decaffeination process in the total levels of PS founded in samples of ground coffee powder. **Conclusions:** According to the results, in the samples evaluated, foods with the highest content of phytosterols are vegetable cream and powder coffee. Margarine can be considered good source of PS even without it industry addition. The heat treatment did not affected the PS content in the coffee samples, however, the same didn't happen with samples of vegetable cream. The lowest concentrations of PS were observed in samples of farinaceous, cappuccino and soluble coffee.

Key Words: Phytosterols; Coffee; Margarine; Farinaceous.

Índice

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Fitosteróis.	17
1.1.1 Funções, estrutura química, biossíntese e principais tipos.....	17
1.1.2. Fontes alimentares.	22
1.1.3. Alimentos enriquecidos.....	22
1.1.4. Metabolismo, absorção e efeitos na saúde.	24
1.1.5. Fatores que influenciam degradação e estabilidade.	27
1.2. Alimentos estudados.....	29
1.2.1. Cremes vegetais.....	30
1.2.2. Farináceos.....	30
1.2.3. Cafés.	32
1.3. Validação de métodos analíticos.	36
2. OBJETIVO	38
2.1. Objetivos específicos.	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Material	39
3.1.1. Padrões e reagentes	39
3.1.1.2. Preparo e armazenamento dos padrões	39
3.1.2. Amostras	40
3.2. Métodos	43
3.2.1. Avaliação dos teores de fitosteróis	43
3.2.2. Validação.....	46
3.2.3. Análises estatísticas	47
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Otimização e validação de metodologia analítica para derivatização de fitosteróis.	48
4.2. Validação de padrão interno para análises de quantificação de fitosteróis por cromatografia gasosa.	57
4.3. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação e quantificação de fitosteróis.	60

4.3.1. Otimização, validação de metodologia e quantificação dos teores de fitosteróis em amostras de cremes vegetais.....	60
4.3.2. Otimização, validação de metodologia e quantificação dos teores de fitosteróis em farináceos.....	72
4.3.3. Otimização, validação de metodologia e quantificação dos teores de fitosteróis em amostras em café.....	81
5. CONCLUSÕES	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
CURRICULO LATTES ELIZABETH APARECIDA FERRAZ DA SILVA TORRES	98
CURRICULO LATTES FERNANDA PERIDES AKAISHI.....	99

Listas de Tabelas

Tabela 1 - Concentração dos padrões de referência nas soluções stock

Tabela 2 - Amostras comerciais analisadas durante o experimento

Tabela 3 - Áreas dos picos dos padrões derivatizados durante 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas.

Tabela 4 – Parâmetros de validação da metodologia de derivatização modificada.

Tabela 5 – Linearidade da curva de calibração para quantificação dos fitosteróis

Tabela 6 - Parâmetros avaliados para a otimização da reação de saponificação em amostras de óleo.

Tabela 7 - Comparação entre os métodos de saponificação testados (áreas médias $\pm$ desvio. padrão).

Tabela 8 - Parâmetros de validação da metodologia otimizada para saponificação de amostras de óleos.

Tabela 9 - Teores de fitosteróis em amostras de creme vegetal Marca A e B (mg/100g).

Tabela 10 - Parâmetros avaliados para a otimização da reação de saponificação em amostras de farinha de trigo.

Tabela 11 - Parâmetros de validação da metodologia otimizada para saponificação de amostras de farináceos

Tabela 12 - Teores de fitosteróis em amostras de farináceos marcas A e B (mg/100g)

Tabela 13 - Parâmetros de validação da metodologia otimizada para saponificação de amostras de café

Tabela 14 - Teores de fitosteróis em amostras de pó de café marcas A e B (mg/100g).

Tabela 15 - Teores de fitosteróis em amostras de pó de café solúvel, cappuccino, borra e bebida coada (mg/100g).

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura molecular geral dos fitosteróis

Figura 2 – Biossíntese de fitosteróis

Figura 3 - Semelhanças estruturais entre o colesterol e os principais fitosteróis

Figura 4 – Mecanismo de ação dos fitosteróis

Figura 5 – Estrutura dos produtos de oxidação de fitosteróis mais comuns.

Figura 6 – Esquema de amostragem

Figura 7 – Cromatogramas dos padrões de fitosteróis derivatizados pelo método proposto por Johnson e Dutta (2003).

Figura 8 - – Cromatogramas dos padrões de fitosteróis derivatizados pelo método otimizado no estudo.

Figura 9 – Cromatograma do *pool* de padrões de fitosteróis derivatizado pelo método otimizado no presente estudo.

Figura 10 – Cromatogramas com picos eluindo no mesmo tempo de retenção do 5 α -colestano.

Figura 11 – Cromatogramas das amostras com 250 mg e 150 mg de óleo de soja.

Figura 12 – Cromatogramas das amostras com 0,5 g e 1 g de farinha de trigo.

Figura 13 – Cromatograma amostra com 1g de pó de café.

Lista de Abreviações

19 OH – 19 hidroxicolesterol

ABCG 5 – ATP-binding cassette gene 5

ABCG 8 – ATP-binding cassette gene 8

CG – cromatografia gasosa

CV % - coeficiente de variação

FID – detector de ionização por chama

FS – fitosteróis.

HDLc – HDL colesterol

HDMS + TMCS 3:1 – hexamethyldisilazane + trimethylchlorosilane 3:1

LD – limite de detecção

LDLc – LDL colesterol

LQ – limite de quantificação

POFs – produtos da oxidação de fitosteróis

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fitosteróis.

1.1.1 Funções, estrutura química, biossíntese e principais tipos.

Os fitosteróis (FS) são substâncias encontradas nos vegetais, incluindo sementes, frutos e óleos vegetais, cuja estrutura e função são similares ao colesterol. São importantes na composição da membrana celular de plantas e, em sua forma livre, tem papel na estabilização da bicamada de fosfolipídios, além de serem precursores de um grupo de fatores de crescimento dos vegetais (Moreau et al., 2002).

Sabe-se que a estabilidade e fluidez das membranas vegetais dependem da relação esterol/fosfolipídio. Um aumento nesta relação leva à formação de uma membrana mais rígida. Porém, as propriedades de cada fitosterol diferem individualmente em seu efeito sobre as mesmas. Durante a senescência, por exemplo, ocorre um aumento da proporção de estigmasterol em relação aos outros FS, pois este está diretamente relacionado à “desordem” das membranas celulares (Moreau et al., 2002).

Os FS possuem estrutura química formada por 28 ou 29 carbonos, dispostos em um anel tetracíclico e uma longa e flexível cadeia lateral no carbono C17, diferindo assim do colesterol que possui 27 carbonos em sua estrutura e não possui um grupamento metil, etil ou insaturação em sua cadeia lateral (Moreau et al., 2002).

Os quatro anéis que os compõe (A, B, C, D) apresentam ligação *trans*, formando um sistema de superfície α . A lateral da cadeia e os dois grupos metila são angulares à estrutura do anel, e acima do plano deste, originando uma estrutura esteroquímica na forma β (Biedermann et al., 1993; Ferretti et al., 2010; MacKay et al., 2011). (Figura1)

Figura 1 – Estrutura molecular geral dos fitosteróis (Wasowicz et al, 2011).

Nos organismos de origem vegetal e animal, os esteróis derivam-se a partir de uma mesma molécula de esqualeno linear, derivada do mevalonato (Piironen et al., 2000; Moreau et al., 2002; Devlin, 2007).

A síntese do mevalonato inicia-se com a formação do 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), este, é formado a partir de duas moléculas de acetil-CoA que catalisadas pela tiolase formam a acetacetil-CoA que condensa-se com uma terceira molécula de acetil-CoA, dando origem ao composto 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). O HMG-CoA ao ser reduzido pela HMG-CoA redutase, que consome duas moléculas de NADPH

e liberta CoA, converte-se em mevalonato (Piironen et al., 2000; Devlin, 2007).

Esta unidade isoprênica sofre uma sequência de reações de condensação mediadas por enzimas, formando o geranil-pirofostato, composto por dez átomos de carbono, o farnesil-pirofosfato, com quinze átomos de carbono e por fim, o esqualeno, composto por trinta átomos de carbono (Piironen et al., 2000; Moreau et al., 2002)

Após esta etapa, em células animais ocorre à formação de uma molécula denominada lanosterol que após diversas reações, como oxidações, perda e migrações dos grupos metila, dá origem ao colesterol; já nas células vegetais, é formado o cicloartenol que após varias reações dá origem aos fitosteróis (Piironen et al., 2000; Moreau et al., 2002; Ellegard et al., 2007 Devlin, 2007) (Figura 2).

Figura 2 – Biossíntese de fitosteróis. (Piironen et al., 2002)

Mais de 250 FS e compostos derivados já foram identificados em várias espécies vegetais. De acordo com o número de grupos metila em C4 os FS podem ser divididos em três grupos principais: 4-desmetil esteróis (nenhum grupo), 4-monometil esteróis (um grupo) 4,4-dimetil esteróis (dois grupos) (Moreau et al., 2002; Brufau et al., 2008).

A subclasse 4-desmetil é a mais abundante e, principal responsável pelo efeito hipocolesterolêmico dos FS, possui o β - sitosterol, campesterol e estigmasterol como principais representantes, correspondendo a 98% dos FS ingeridos na dieta. As duas outras são precursoras de outros esteróis e, por esta razão, na maioria das vezes, são presentes em quantidades

inferiores. Os principais 4-monometil esterol são o obtusifoliol e o gramisterol, enquanto o cicloartenol e o lanosterol são os principais representantes dos 4-desmetil esteróis (Dutta 2004; Piironen et al. 2000).

Os 4-desmetilesteróis podem ainda ser categorizados em Δ^5 -esteróis, Δ^7 - esteróis e $\Delta^5,7$ - esteróis, de acordo com a posição e o número de duplas ligações no anel B (Piironen et al. 2000).

Outra divisão, também relacionada à estrutura química, é feita pela presença ou ausência de insaturações, o que os subdivide em esteróis ou estanóis, respectivamente (Moreau et al., 2002; Brufau et al., 2008).

O sitosterol e o estigmasterol apresentam um grupo etila no C24, enquanto o campesterol possui um grupo metila na mesma posição. O estigmasterol apresenta ainda, uma insaturação adicional no C22 da cadeia lateral (Figura3) (Piironen et al., 2000; Phillips et al. 2002; Fernandes et al., 2007).

Figura 3 - Semelhanças estruturais entre o colesterol e os principais fitosteróis (Ostlund, 2002 adaptado).

1.1.2. Fontes alimentares.

Os fitoesteróis são encontrados em todos os alimentos de origem vegetal, na forma livre, esterificados com ácidos graxos ou com glicosídeos. As concentrações mais elevadas são encontradas em óleos vegetais refinados, oleaginosas e azeites (Piironen et al., 2000; Ostlund, 2002; Quílez et al., 2003; Fernandes et al., 2007; Marangoni et al., 2010).

Algumas sementes, cereais integrais e leguminosas também são boas fontes alimentares de fitoesteróis (De Jong et al, 2003). Além disso, podem ser encontrado em fontes não vegetais, como gema de ovo, fígado de mamíferos e crustáceos (Marangoni et al. 2010).

Hans et al (2008) determinaram os teores de FS nos vegetais e frutas mais consumidos na China. Nos vegetais os valores variaram de 1,1 a 53,7 mg/ 100 g, sendo as maiores concentrações encontradas em ervilhas, couve-flor, brócolis e alface romana. Nas frutas os valores variaram de 1,6 a 32,6 mg/ 100 g sendo as maiores concentrações encontradas na laranja baia, tangerina e manga.

1.1.3. Alimentos enriquecidos.

O primeiro alimento contendo ésteres de fitostanóis (fitosterol saturado) foi o Benecol[®], lançado na Finlândia em 1995, iniciando assim, a entrada de alimentos enriquecidos com fitosteróis em sua forma esterificada, na tentativa de se aumentar o consumo de FS e obter as ações

hipocolesterolêmicas e antiaterogênicas desejadas (Moreau et al, 2002; Tapiero et al 2003).

Industrialmente, os FS são isolados a partir de óleos vegetais, tais como óleo de soja, semente de colza (canola), óleo de girassol e óleo de milho, ou do chamado "*tall oil*", um subproduto da fabricação de celulose. Eles são purificados por destilação, extração, cristalização e lavagem, resultando em produtos de elevada pureza, usados tanto na indústria alimentícia (alimentos funcionais), como na farmacêutica (produção de esteroides e suplementos) e cosmética (produção de creme) (Coss et al., 2000; Hayes et al., 2002, Quilez et al., 2003; Fernandes et al. 2007; Brufau et al., 2008; FAO, 2008).

Durante anos a única matriz considerada para adição de FS era a de elevado teor lipídico, uma vez que aumentava a solubilidade deste (Acuff et al., 2007).

Atualmente, a adição de emulsificantes, tais como lecitina, é uma das formas pelas quais os FS podem ser adicionados em matrizes de menor teor lipídico (Thomsen et al., 2004; Ortega et al., 2006; FAO 2008; Plumb et al., 2011; Esche et al., 2012; Moreno-Calvo et al., 2014.)

Dependendo do fabricante, a mistura de FS adicionada aos alimentos pode ser usada na forma esterificada, dispersões cristalinas em meio oleoso ou aquoso e por solubilização em micro emulsões (Rozner et al., 2006; FAO, 2008; Moreno-Calvo et al., 2014).

Atualmente no Brasil, os alimentos enriquecidos com fitosteróis disponíveis são creme vegetal e bebidas lácteas fermentadas, em outros

países é possível encontrar também, *snacks*, iogurtes, maionese, produtos de queijo, bebidas de frutas e até mesmo salsichas e pães enriquecidos esses compostos (FAO, 2008).

1.1.4. Metabolismo, absorção e efeitos na saúde.

A manutenção de níveis plasmáticos baixos de LDL colesterol (LDLc) em humanos é importante, pois o LDLc elevado é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Yankah, 2006).

Desde a década de 50, inúmeras pesquisas sobre o efeito do consumo de FS na redução do LDLc foram realizadas e suas evidências indicam um efeito positivo no aumento do consumo de FS e redução do LDLc (Law 2000; Katan et al., 2003; Abumweis et al., 2008; Demonty et al., 2009; Musa-Veloso et al., 2011; Abumweis et al., 2014).

Baseado nesses estudos estabeleceu-se a indicação do consumo diário de FS para combater e prevenir a hipercolesterolemia. Segundo as atuais diretrizes de saúde relacionadas às doenças cardiovasculares, o consumo de 1,6 a 2 g/dia de fitosteróis é recomendado para diminuir os níveis plasmáticos de LDL colesterol (National Cholesterol Education Program, 2001; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007; Reiner et al., 2011; Perk et al., 2012, Paillard et al., 2014; Eckel et al., 2014).

O mecanismo de ação exato dos FS na redução do LDLc não é totalmente conhecido, no entanto, acredita-se que uma vez que os FS mostram-se mais lipofílicos que o colesterol, tem maior afinidade pela

micela, o que resulta no deslocamento do colesterol do interior dessas para o lúmen intestinal. O colesterol livre que não é incorporado no interior das micelas é, então, eliminado através das fezes. Com isso, há diminuição do colesterol livre no interior das micelas e, por sua vez, na diminuição da absorção de colesterol nos enterócitos (De Jong et al., 2003; Bradford et al., 2007; Vergés, 2009; Calpe-Berdiel et al., 2009; Eussen et al., 2010). (Figura 4)

Além disso, os FS parecem aumentar a expressão de transportadores ABCG5 e ABCG8, envolvidos no transporte reverso de colesterol a partir dos enterócitos para o lúmen intestinal, e também reduzir a atividade da acetil-coenzima A acetiltransferase (ACAT) (Davis Jr et al, 2009; Chen et al., 2011; Garcia-Llatas et al., 2011). (Figura 4)

Figura 4 – Mecanismo de ação dos fitosteróis (Davis Jr et al, 2009).

O uso de FS com propósitos terapêuticos tem sido realizado principalmente através da ingestão de alimentos funcionais ou da ingestão de formas farmacêuticas (Rudkowska, 2010).

Segundo Reiner (2010), em humanos, o uso de ésteres de estanois e esteróis demonstraram efeitos redutores não somente sobre os níveis de colesterol total e LDLc, mas também uma tendência de melhora nos níveis de HDLc.

Além de suas ações para reduzir o colesterol, as evidências sugerem que os FS, em especial o β -sitosterol, possuem efeitos anticancerígenos (Choi et al., 2007; Ifere et al., 2008; Woyengo et al., 2009; Baskar et al., 2010).

O mecanismo exato pelo qual FS oferecem essa proteção não é totalmente conhecido. No entanto, as teorias mais aceitas sugerem que: 1) eles são incorporados nas membranas das células, alterando sua fluidez e a atividade de enzimas ligadas às mesmas 2) podem alterar a transdução de sinal em vias que conduzem o crescimento de tumores e estimular a apoptose em linhas celulares tumorais 3) em alguns estudos *in vitro*, os FS demonstraram a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos e células T *in vitro*, o que sugere uma possível estimulação do sistema imune 4) através da alteração do nível de esteróis fecais resultantes da conversão do colesterol e ácidos biliares primários em coprostanol e ácidos biliares secundários alterando ação bacteriana no intestino grosso (Ifere et al., 2008; Jones et al., 2009; Woyengo et al., 2009).

De forma geral, os FS demonstraram serem efetivos para o tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento, como as doenças cardiovasculares e cânceres (Ifere et al., 2008; Jones et al., 2009; Woyengo et al., 2009; Musa-Veloso et al., 2011; Abumweis et al., 2014).

No entanto, é necessária cautela quanto ao uso desses compostos como agentes terapêuticos, uma vez que os aspectos relacionados, principalmente, à dose diária de consumo recomendada precisam ser mais bem estabelecidos por estudos clínicos. Por isso, assim como preconizado pela ANVISA (2008), crianças, gestante e lactente devem evitar o consumo de produtos enriquecidos com FS.

1.1.5. Fatores que influenciam degradação e estabilidade.

Devido a sua natureza química insaturada, os FS estão sujeitos à oxidação, sendo este processo acelerado pelo aquecimento e exposição à luz e a produtos químicos ou enzimáticos. As reações podem ocorrer durante a manipulação destas substâncias ou longo período de armazenamento, originando produtos de oxidação denominados produtos de oxidação dos fitosteróis (POFs) ou óxidos de fitosterol (Lampi et al., 2002; Saynajoki et al., 2003; Foley et al., 2010; Xu et al., 2011; Derewiaka et al., 2012; Botelho et al., 2014; O'Callaghan et al., 2014).

A oxidação dos esteróis consiste em uma sequência de reações em cadeia de radicais livres, que são iniciadas por diferentes tipos de moléculas contendo oxigênio, como singlete e triplete, ozônio, hidroperóxidos e radical hidroxila, podendo ocorrer tanto no anel ciclopentano, quanto na cadeia

lateral. O mecanismo de oxidação mais comum para os esteróis é a auto oxidação, iniciada pela perda de um hidrogênio reativo em C7, C24 ou C25, resultando na reação do radical formado com o oxigênio triplete, levando a formação de um radical peroxi (Johnsson et al., 2006; Foley et al., 2010).

O processo pode ser iniciado também com o ataque de um oxigênio singlete, este é altamente reativo e eletrofílico, reagindo rapidamente com a ligação dupla do esterol, num mecanismo enocíclico que resulta na entrada de um átomo de oxigênio em um dos carbonos da ligação dupla. Os produtos primários deste processo são hidroperóxidos, cujos produtos de oxidação secundária apresentam diversos grupos químicos como hidroxil, ceto e epóxi (Lampi *et al.*, 2000; Saynajoki *et al.*, 2003; O'Callaghan et al., 2014). A figura 5 apresenta alguns dos POFs mais comuns.

Figura 5 – Estrutura dos produtos de oxidação de fitosteróis mais comuns. (R representa a cadeia lateral destes compostos) (Ryan et al, 2009).

A concentração e distribuição dos POFs em alimentos dependem de numerosos fatores, incluindo os teores dos FS presentes, temperatura e tempo de aquecimento, estrutura do fitosterol, esterificação da molécula, grau de saturação, conteúdo de água presente, tipo de matriz lipídica, além das condições de processamento e estocagem (Ryan et al., 2009; García-Llatas et al., 2011; O'Callaghan et al., 2014).

Em virtude do enriquecimento de alimentos com FS, pesquisadores têm investigado a formação de POFs em relação à temperatura esterificação e matriz lipídica na qual estão veiculados, encontrando teores de POFs aumentados em produtos submetidos à altas temperaturas e teores maiores de FS (Koschutnig, 2009; Ryan et al., 2009; García-Llatas et al., 2011).

Os efeitos biológicos dos POFs não estão totalmente elucidados, no entanto os estudos realizados em humanos e animais sugerem que eles apresentam efeitos deletérios iguais aos produtos de oxidação do colesterol tais como: atividades citotóxica, mutagênica e aterogênica. (Adcox et al., 2001; Lampi *et al.*, 2002; Grandgirard et al., 2004; Foley *et al.*, 2010; O'Callaghan et al., 2014).

1.2. Alimentos estudados.

Diante da necessidade de prestar informações úteis aos consumidores e buscando ser um instrumento motivador para a adoção de um banco de dados da composição de fitosteróis em alimentos, no presente trabalho, buscou-se a investigação dos teores de fitosteróis em alguns

alimentos comumente consumidos pela população dentre os quais se escolheram: cremes vegetais, farináceos e café.

1.2.1. Cremes vegetais.

A resolução nº 270 de 22 de setembro de 2005, define creme vegetal como sendo todo produto em forma de emulsão plástica ou fluída, constituído principalmente de água e óleo e/ou gordura vegetal, podendo ser adicionado outro(s) ingrediente(s) (Brasil, 2005).

Os cremes vegetais são produzidos pela hidrogenação parcial de óleos vegetais, que por sua vez, modificam a composição, a estrutura e a consistência de óleos vegetais, no intuito de produzirem alimentos com baixos teores de insaturações e elevados pontos de fusões, aumentando assim sua estabilidade oxidativa e substituindo dessa maneira as gorduras animais na dieta da população brasileira (Ribeiro et al., 2007).

1.2.2. Farináceos.

Os cereais como trigo, milho, aveia, cevada, sorgo e centeio são melhor utilizados para consumo humano quando preparados na forma de farinha (Scheuer et al., 2011).

As farinhas de diferentes origens são constituídas basicamente de carboidratos e possuem papel fundamental na alimentação humana, como fonte de nutrientes e fibras e, tecnologicamente, devido às variadas formas

que podem ser utilizadas para o consumo humano (Prado et al., 2005; Scheuer et al., 2011).

Segundo a RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005, farinhas são os produtos obtidos de partes comestíveis de uma ou mais espécies de cereais, leguminosas, frutos, sementes, tubérculos e rizomas por moagem e ou outros processos tecnológicos considerados seguros para produção de alimentos.

Por esta mesma resolução, amidos: são os produtos amiláceos extraídos de partes comestíveis de cereais, tubérculos, raízes ou rizomas.

As principais farinhas consumidas pela população são: farinha de trigo, farinha de milho, farinha de mandioca e farinha de rosca (Embrapa, 2010).

Além disso, o estudo da composição dos farináceos é importante, pois eles são consumidos tanto na forma pura (ex: farinha de mandioca) ou como ingredientes diversos outros produtos tais como pães, tortas, bolos e massas, alimentos que são consumidos diariamente pela população.

A seguir são descritas as formas de produção destes farináceos.

No processo para obtenção da farinha de trigo o endosperma é separado da casca e do gérmen e em seguida moído. O endosperma constituirá a farinha (Embrapa, 2010).

O processamento do milho pode ocorrer à seco ou por via úmida. No processo a seco, o grão seco limpo passa por uma série de moinhos e peneiras, gerando os diversos produtos com base no seu tamanho (farinha, canjica, grits, fubás, etc.). No processo por via úmida se utiliza água para

auxiliar na separação de suas partes (película, gérmen, proteína e amido), posteriormente submetidas a outras formas de processamento, gerando derivados diferentes dos obtidos na moagem a seco, tais como óleo, xarope, amido de milho, álcool para combustível e bebida, farelo de gérmen e etc (Embrapa, 2010)

Para obtenção do amido de milho, por exemplo, após a separação do gérmen, o milho passa por tratamento térmico, trituração, duas moagens, refinação, refinação do amido e desidratação (Embrapa, 2004).

A farinha de rosca, também chamada farinha de pão, conforme definição da RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000, é o produto obtido pela moagem do pão de trigo torrado (pão comum), muito utilizada na fabricação de empanados.

Por fim, para fabricação de farinha e polvilho, a mandioca é colhida, lavada, descascadas e ralada. Logo após a ralação, é realizada a prensagem, seguida do esfarelamento, peneiração e torração, para por fim ser empacotada e armazenada (Embrapa, 2006).

1.2.3. Cafés.

A planta café é membro da família dos *Rubiaceae*, que inclui mais de seis mil espécies, a maioria delas arbustos tropicais, sendo as mais comuns as espécies Arábica (*Coffea arabica*) e a Robusta ou Conilon (*Coffea canephora*) (Neves, 1974; Monteiro et al., 2005; Mussatto et al., 2011).

O café arábica, quando comparado ao robusta, tem um valor de mercado mais alto, pois além de ser mais apreciado pelo consumidor, também é considerado de melhor qualidade (mais fino e requintado, aroma intenso e os mais diversos sabores, com inúmeras variações de corpo e acidez). Quanto maior a concentração de café arábica, melhor é considerada a qualidade do café. Cafés *gourmet* são aqueles que utilizam somente combinações de arábica (Monteiro et al., 2005; Belitz et al., 2009; Sturm et al., 2010).

Por sua vez, o café robusta é utilizado nos *blends*, com o arábica, podendo compor até 30% do produto final, com a finalidade de conferir mais corpo a bebida e diminuir a acidez. Sua utilização diminui o custo e facilita o ajuste da bebida à preferência ou ao costume de determinada classe de consumidores. Além disso, por possuir maior teor de sólidos solúveis que o arábica e apresentar maior rendimento após o processo de torrefação, o café robusta é componente essencial dos cafés solúveis. (Monteiro et al., 2005; Belitz et al., 2009; Sturm et al., 2010).

O fruto de café, além da água, tem em sua composição, vários minerais, carboidratos, ácidos, aminoácidos, proteínas, lipídeos, cafeína, vitaminas, fenóis, enzimas, entre outros (Pimenta et al., 2009). Sua qualidade e composição química são afetadas diretamente, pelo método de plantio e manejo da lavoura, processamento (secagem, torrefação, descafeinização, etc.) e armazenamento (Pimenta et al., 2004; Santos et al., 2007; 2009; Borém et al., 2008).

Na fase de pré-processamento os lotes de café são uniformizados por meio da separação hidráulica, a fim de melhorar a eficiência da secagem e a qualidade do produto. As impurezas maiores e os frutos secos são retirados durante este processo (Borém et al., 2008; Malta et al., 2009).

Após limpeza e a separação, o processamento do pó de café é relativamente simples, envolve as seguintes etapas: composição do café ("*blend*"), torrefação, moagem, embalagem e armazenamento. (Borém et al., 2008; Malta et al., 2009).

A composição do *blend* é considerada a mais importante porque requer um grande conhecimento do processo de formação do *blend* ideal, definido como sendo aquele que utiliza a mistura correta das variedades de grãos de café conilon e arábica, de tal forma a se obter como resultado um pó de café que tenha um padrão de cor e de sabor que seja bem aceito pelos mercados que se queira atingir (Borém et al., 2008; Malta et al., 2009).

A torrefação utiliza temperaturas entre 200 e 250°C por 5 a 15 minutos, dependendo do grau de torrefação desejado. O processo faz com que a água existente no interior do grão evapore, e também ocorram várias reações que geram produtos responsáveis pelo sabor e aroma característicos do café, como por exemplo, os compostos voláteis. (Vilas Boas et al., 2001; Mazzafera et al., 2002, Borém et al., 2008; Pimenta et al., 2008; Resende et al., 2009).

A variação dos sabores está diretamente associada com a cor do grão torrado. Na torra clara a característica predominante é a acidez, mas à medida que a torra aumenta, a cor torna-se mais escura, esta característica

diminui deixando ressaltar as demais. O aroma e o corpo são mais acentuados em graus intermediários, à medida que o grão se torna mais escuro, ocorre à carbonização de alguns componentes, portanto, acentuando o sabor de queimado (Farah et al., 2006; Ribeiro et al., 2009).

Como a torra define a qualidade do produto ou da bebida torna-se necessário o acompanhamento deste processo. Para monitorar indiretamente o grau de torra, fora do forno, a SCAA (Specialty Coffee Association of America) e a empresa norte-americana Agtron criaram padrões aceitos internacionalmente, este consiste de uma escala de 0 a 100, determinada com base na absorção de luz infravermelha pelo grão do café ou pelo pó, dividida em intervalo de 10 em 10 valores, chamados de número agtron. Cada número agtron corresponde a um intervalo de temperatura do grão, quanto mais alto for o grau de torra menor será esse número. Outros padrões existem, mas esse é atualmente o mais popular (SCAA, 2008).

Após a torrefação inicia-se o processo de moagem, onde os grãos torrados são triturados até se transformarem em pó fino e então embalados (Borém et al., 2008; Malta et al., 2009).

A obtenção do café solúvel é semelhante a do café torrado moído até a etapa de torrefação, a partir dessa fase ele passa pelos processos de extração, concentração, secagem por aspersão e liofilização (Inmetro, 2012).

O processo de extração da cafeína é realizado antes do processo de torrefação, nos grãos crus inteiros. Existem dois métodos para a produção de café descafeinado e ambos utilizam solventes (ex: diclorometano, clorofórmio, álcool, acetona, água). O primeiro se baseia na extração direta

dos grãos pelo solvente e o segundo, na água, seguida do uso de um solvente para a extração da cafeína (Inmetro, 2012).

1.3. Validação de métodos analíticos.

O desenvolvimento de métodos analíticos envolve a avaliação e otimização de condições, incluindo etapas de preparação da amostra, detecção e quantificação. A validação é necessária para demonstrar, se o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos (Swartz et al., 1998; Ribani et al., 2004; Bonfilio et al., 2012).

Os parâmetros fundamentais de avaliação incluem linearidade, precisão, limites de quantificação e detecção (AOAC, 2010; Ribani et al., 2004; Bonfilio et al., 2012).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Na maioria das vezes ela é determinada por uma curva analítica de no mínimo cinco pontos, que não incluam o ponto zero na curva, minimizando assim, possíveis erros associados. (AOAC, 2010; Ribani et al., 2004)

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando regressão linear e o coeficiente de correlação r . Quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e melhor a qualidade da

curva. Recomenda-se que para ser usada, uma curva de calibração deve ter coeficiente de correlação acima de 0,90. (AOAC, 2010; Ribani et al., 2004)

A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. É determinada pela repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. (AOAC, 2010; Bonfilio et al., 2012).

A repetibilidade é efetuada por meio de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. Esta determinação deve ser feita a partir de, no mínimo, seis determinações na concentração estabelecida correspondente a 100%. A precisão intermediária expressa o efeito das variações devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo (AOAC, 2010; Ribani et al., 2004; Bonfilio et al., 2012).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (AOAC, 2010; Ribani et al., 2004; Bonfilio et al., 2012).

Por fim, o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (AOAC, 2010; Ribani et al., 2004; Bonfilio et al., 2012).

2. OBJETIVO

Determinar a composição de fitosteróis em cremes vegetais, farináceos e cafés consumidos em São Paulo.

2.1. Objetivos específicos.

1. Otimizar a metodologia para derivatização em menor temperatura.
2. Otimizar, validar metodologia e quantificar os teores de fitosteróis em amostras de cremes vegetais
3. Otimizar, validar metodologia e quantificar os teores de fitosteróis em amostras de farináceos utilizando cromatografia gasosa.
4. Otimizar, validar e quantificar os teores de fitosteróis em amostras de cafés e seus derivados nas diferentes formas de processamento utilizando cromatografia gasosa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Padrões e reagentes

Os padrões de brassicasterol, campesterol, β -sitosterol, estigmasterol, 5 α -colestano, 19-hidroxicolesterol (19-OH) foram adquiridos na Sigma Aldrich (Huntsville,USA). O reagente de derivatização, HMDS+TMCS 3:1 (Sylon HT[®]), foi obtido da Supelco[®] (Pennsylvania, USA). As membranas utilizadas na filtragem das amostras (0.45 μ m) foram adquiridas da Millipore.

Os solventes orgânicos foram obtidos da Merck Brasil[®].

3.1.1.2. Preparo e armazenamento dos padrões

Os padrões de referência (brassicasterol, campesterol, β -sitosterol, estigmasterol, 5 α -colestano, 19-hidroxicolesterol) foram diluídos em acetato de etila grau HPLC para o preparo das soluções Stock (Tabela 1), armazenados em frasco âmbar (Pyrex[®]) devidamente vedados, e posteriormente estocados em freezer -20°C.

Tabela 1 - Concentração dos padrões de referência nas soluções stock

Padrão	Concentração (µg/mL)
19-Hidroxicolesterol	40
5α-Colestano	100
β-Sitosterol	200
Campesterol	20
Estigmasterol	250
Brassicasterol	100

3.1.2. Amostras

As amostras de creme vegetal sem sal, dos farináceos: farinha de trigo, farinha de milho, farinha de mandioca e amido de milho e de café: café em pó (torras: tradicional, forte e extraforte, descafeinado e *gourmet*), café solúvel instantâneo, cappuccino (Tabela 2) foram adquiridas em hipermercados de São Paulo.

No caso das amostras de café foram utilizadas também amostras de grãos da variedade Arábica anteriores ao processamento e da bebida preparada utilizando coador e a borra proveniente dessa preparação.

Tabela 2 - Amostras comerciais analisadas durante o experimento

Produto analisado	Marcas
Creme vegetal	A e B
Farinha de Trigo	A e B
Farinha de Milho	A e B
Farinha de Rosca	A e B
Farinha de Mandioca	A e B
Amido de Milho	A e B

Tabela 2 (continuação) - Amostras comerciais analisadas durante o experimento

Pó de Café Tradicional	A e B
Pó de Café Forte	A e B
Pó de Café Extraforte	A e B
Pó de Café Descafeinado	A e B
Café Solúvel Instantâneo	A e B
Cappuccino	A e B
Grão de café verde	A
Borra de Café	A
Café Preparado	A

A amostragem foi aleatória, escolhendo-se duas marcas dentro das marcas mais consumidas na cidade de São Paulo. Foram utilizados dois lotes para cada marca comercial, adquiridos em épocas diferentes. Para cada lote foram adquiridas três embalagens de cada produto (figura 6)

Figura 6 – Esquema de amostragem

O grão de café sem processamento, a bebida preparada e a borra proveniente da mesma foram analisadas considerando apenas um lote.

3.1.2.2. Preparo e armazenamento das amostras

As amostras de creme vegetal foram analisadas *in natura* e após o processamento térmico das mesmas. As embalagens de mesmo lote foram homogeneizadas juntas, identificadas e então separadas em três alíquotas, uma para cada temperatura de tratamento (*in natura*, 100°C e 140°C).

As amostras submetidas a processamento térmico foram aquecidas em fritadeira elétrica (Master Britânia®), até a temperatura atingir 100°C e 140°C (temperatura máxima atingida pelo produto). Quando o centro das amostras atingiu as temperaturas preconizadas, a fritadeira foi desligada, para que os alimentos permanecessem a mesma temperatura, durante 5 minutos, simulando desta forma o processo de fritura.

As temperaturas foram medidas utilizando um termômetro digital calibrado (Traceable Long- Stem, VWR®).

Após o processamento, todas as amostras foram recolhidas em recipientes de vidro, vedadas e acondicionadas sobre refrigeração até o momento das análises.

As embalagens de mesmo lote foram abertas juntas e seus conteúdos, homogeneizados, identificados e então acondicionados em sacos plásticos zip, devidamente vedados, na ausência de luz, em local seco e arejado.

A preparação da bebida de café foi feita em coador respeitando-se as indicações de preparo sugeridas pela ABIC, na qual se utiliza 100g de pó de café para preparação de 1 Litro de bebida. A análise da bebida foi realizada logo após a sua elaboração.

3.2. Métodos

3.2.1. Avaliação dos teores de fitosteróis

3.2.1.1. Saponificação

Devido à diferença na composição química entre os alimentos avaliados, optou-se em testar metodologias distintas para obtenção da fração insaponificável das amostras estudadas. O processo de otimização e validação das metodologias adotadas é descrito nos resultados do presente trabalho.

Foram testadas as metodologias de Saldanha et al., (2006) com adição 4 mL de uma solução aquosa de KOH 50% e 6 mL de álcool etílico, de Dionisi et al., (1998) utilizando-se 10 mL de solução metanólica de KOH 1 molar e também um terceiro método (“Dionisi et al. (1998) modificado”), com modificações na metodologia preconizada por Dionisi et al. (1998), onde adicionou-se as amostras 10 mL de solução de etanólica de KOH 1 molar.

Ao final dos processos de otimização e validação as reações de saponificação ficaram da seguinte forma:

Para todas as amostras o processo de saponificação, foi feito em temperatura ambiente, sob agitação constante, durante o período de 22 horas.

Para a saponificação do creme vegetal e dos farináceos adicionou-se 10 mL de solução etanólica de KOH 1molar. A diferença foi a quantidade inicial de amostra, sendo de 150mg para as amostras de creme vegetal e 1g para as amostras de farináceos (Dionisi et al. (1998) modificado).

Para a saponificação das amostras de café utilizou-se 1g de amostra, adicionada de 4 mL de solução aquosa de KOH 50% e 6 mL de etanol padrão analítico (PA) (Saldanha et al., 2006).

3.2.1.2. Extração

A extração da fração insaponificável das amostras foi realizada segundo metodologia descrita por Saldanha et al., (2006).

3.2.1.3. Derivatização

Partiu-se da metodologia proposta por Johnsson e Dutta, 2003, para criar uma etapa de derivatização utilizando menores temperaturas e consequentemente reduzindo a degradação dos compostos de interesse.

Para a realização da reação de derivatização otimizada no presente estudo, adiciona-se 100 μ L do reagente de derivatização (HMDS + TMCS, 3:1) ao material insaponificável (seco em N_2) extraído das amostras, seguido de repouso, na ausência de luz, durante 2 horas.

Após o período de 2 horas, os resíduos do reagente de derivatização são secos sob N_2 e as amostras foram então ser ressuspensas para posterior injeção.

3.2.1.4. Preparo para injeção

Para injeção das amostras no cromatógrafo gasoso, adicionou-se 1 mL de hexano grau HPLC às amostras secas e derivatizadas. As amostras foram então agitadas em ultrassom (Unique Ultracleaner[®] 1400), frequência 60 Hz, por 5 minutos.

Após a agitação o volume foi filtrado em filtros Millex[®] (0.45µm de poro) direto no vial.

As amostras ficaram acondicionadas em freezer -18°C até o momento da injeção.

3.2.1.5. Equipamento e condições cromatográficas

As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás (GC-2010, Shimadzu[®]), equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Varian Factor Four[®] (30 m x 0,25 mm x 0,10 µm). As condições de operação foram as descritas a seguir:

Injeção em modo *Splitless*

Temperatura do injetor 290°C;

Temperatura do detector 350°C;

Condições da coluna:

Temperatura inicial de 230°C $\xrightarrow{2^{\circ}\text{C/min}}$ 264°C (5 minutos) $\xrightarrow{1^{\circ}\text{C/min}}$ 275°C (2 minutos).

Tempo total da corrida 35 minutos.

3.2.1.5. Quantificação

A quantificação foi realizada por padronização externa, sendo a curva de calibração constituída por 10 pontos, construída pela injeção dos padrões dos principais fitosteróis (Brassicasterol, Campesterol, Estigmasterol e β -Sitosterol) em concentrações variando entre 5 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.2. Validação

A validação dos métodos utilizados foi efetuada avaliando os seguintes parâmetros: recuperação, precisão (repetibilidade), linearidade, limites de detecção e quantificação, segundo critérios estabelecidos pela AOAC (2007).

A linearidade do método foi verificada através de curva de calibração dos padrões dos principais fitosteróis (Brassicasterol, Campesterol, Estigmasterol e β -Sitosterol), com concentrações variando entre 5 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

A precisão foi obtida pela repetibilidade, calculada pelo coeficiente de variação (CV%) de 10 repetições de uma mesma amostra.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados por diluições consecutivas das amostras utilizadas para avaliação da repetibilidade. Quando se determinou a menor concentração dos compostos avaliados, foram realizadas 10 injeções consecutivas, sendo o limite de detecção 3 vezes o desvio padrão e o limite de quantificação 10 vezes o desvio padrão das replicatas.

A recuperação foi realizada utilizando-se 2 níveis de adição ($\mu\text{g/mL}$) das soluções padrão para cada composto estudado, sendo realizadas 6 replicatas para cada nível de adição e 6 replicatas para o branco. Os níveis de adição foram determinados de acordo com as concentrações dos fitosteróis presentes nas amostras estudadas, sendo adicionado 1 nível acima e 1 nível abaixo dos teores determinados no branco, em $\mu\text{g/g}$.

3.2.3. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram efetuadas com o uso do software “Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)”, versão 16.0 for Windows.

Para escolha do método de saponificação a ser utilizada a comparação entre os métodos foi feita utilizando o teste *t-student*. O nível de significância estabelecido para os testes estatísticos aplicados foi $p < 0.05$.

Os resultados das análises das áreas dos esteróis nos diferentes tempos de derivatização foram comparados através de análises de variância (ANOVA). As médias entre os diferentes tempos de reação foram comparadas usando o teste *Tukey*, com $p < 0.05$.

Igualmente, para cada “grupo de alimento” os resultados das concentrações de fitosteróis encontrados foram comparados através de análises de variância (ANOVA).

As médias entre as triplicatas analisadas foram comparadas usando o teste *Tukey*, com $p < 0.05$.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização e validação de metodologia analítica para derivatização de fitosteróis.

Para realizar uma análise por CG, é necessário que as substâncias sejam suficientemente voláteis e termicamente estáveis. No caso de substâncias de alta massa molar e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares, há a necessidade de derivatização ou de utilização de uma coluna cromatográfica com fase estacionária específica (Collins et al., 2006).

As principais razões para o uso da derivatização química em análises cromatográficas são: o aumento da sensibilidade na detecção dos compostos e a melhora no comportamento cromatográfico dos mesmos - o que pode ocorrer por meio de alguns fatores como atribuição de volatilidade - melhora da estabilidade térmica, melhora da resolução cromatográfica (separação de picos), melhora da quantificação (Collins et al., 2006).

As reações de derivatização normalmente empregadas na análise de fitosteróis (AOAC, 1995; Johnsson e Dutta, 2003) utilizam temperatura maior que 60°C, o que pode catalisar reações como as de oxidação, com consequente degradação dos compostos de interesse.

A primeira etapa do projeto consistiu na otimização da reação de derivatização, procurando-se encontrar uma forma de diminuir a degradação dos fitosteróis durante a realização da mesma.

No primeiro momento testou-se a metodologia de Johnsson e Dutta (2003), normalmente utilizada nas análises de fitosteróis. Alíquotas de 20µg dos padrões de β -sitosterol, campesterol, estigmasterol e brassicasterol, foram pipetados individualmente em frascos (Pyrex®, 5mL) e secos sob N₂. O experimento foi realizado em triplicata.

De acordo com os autores, a reação de derivatização de fitosteróis obedece as seguintes etapas:

Ao usar a metodologia acima citada a resolução cromatográfica dos compostos avaliados mostrou de baixa qualidade, com os padrões dos compostos avaliados apresentando degradação. (Figura 7)

Figura 7 – Cromatogramas dos padrões de fitosteróis derivatizados pelo método proposto por Johnson e Dutta (2003).

Para evitar degradação dos compostos desejados, procurou-se desenvolver uma metodologia utilizando menor exposição ao calor para a realização da reação de derivatização.

Partindo da metodologia proposta por Johnsson e Dutta, (2003), a primeira modificação realizada foi a diminuição da temperatura da reação de derivatização. A reação foi então realizada em estufa, com temperatura de 30°C e na ausência de luz.

Com a diminuição da temperatura, houve a necessidade de alterar tempo da reação de derivatização. Desta forma, foram testados sete diferentes tempos: 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas.

Para cada tempo de reação foram utilizadas duplicatas de 5 α -colestano, 19-hidroxicolesterol e dos padrões (campesterol, estigmasterol e β -sitosterol), perfazendo 28 amostras.

Após a realização dos testes, as áreas dos picos foram tabuladas, sendo obtida uma média entre as duplicatas para o mesmo padrão/tempo de reação.

Não foram observadas diferenças significantes entre as áreas dos picos derivatizados após 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas de reação, para nenhum dos padrões avaliados (tabela 3). Assim, foi determinado que o tempo de 2 horas para a reação em questão.

Tempo (horas)

Padrão ¹	2	4	6	8	12	16	24
	Área (Média ± Desvio padrão) *						
5α-colestanol.	26091 ± 132,0 ^a	26165 ± 423,0 ^a	25453 ± 103,5 ^a	25680 ± 124,0 ^{a,b}	25676 ± 237,0 ^{a,b}	25864 ± 212,0 ^{a,b}	25816 ± 200,5 ^{a,b}
Campesterol	17391 ± 324,5 ^{a,b}	17685 ± 249,5 ^b	17039 ± 52,0 ^a	17580 ± 24,0 ^b	17600 ± 149,0 ^b	17318 ± 241,5 ^{a,b}	17477 ± 5,0 ^{a,b}
Estigmasterol	7359 ± 80,5 ^a	7420 ± 5,0 ^{a,b}	7652 ± 207,0 ^{a,b}	7398 ± 14,5 ^{a,b}	7567 ± 394,0 ^{a,b}	7887 ± 62,0 ^b	7614 ± 140,0 ^{a,b}
β-Sitosterol	12513 ± 289,5 ^a	12795 ± 301,5 ^a	12401 ± 78,5 ^a	12331 ± 27,5 ^a	12476 ± 62,0 ^a	12561 ± 297,5 ^a	12541 ± 470,0 ^a
19-OH	29279 ± 75,00 ^a	28966 ± 19,50 ^a	29134 ± 213,00 ^a	29453 ± 157,50 ^a	29475 ± 139,50 ^a	29129 ± 184,00 ^a	29546 ± 449,50 ^a
Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0.05)							

Após o estabelecimento da duração da reação de derivatização, novas modificações foram realizadas.

Procurando diminuir o número de interferentes na amostra, os resíduos do reagente de derivatização depois de transcorridas às duas horas de reação, foram secos sob N₂.

Em seguida, adicionou-se 1mL de hexano em detrimento aos 100µL propostos por Johnsson e Dutta (2003). Desta forma, aumentou-se a superfície de contato entre os esteróis e o solvente, facilitando a solubilização dos mesmos.

A centrifugação foi substituída pela agitação em Ultrassom (Unique Ultracleaner 1400®), em frequência 60 Hz, durante 5 minutos.

Transcorridos os 5 minutos, observou-se a presença de resíduos na camada hexânica. Estes resíduos poderiam interferir na coluna cromatográfica, prejudicando a análise e também o equipamento. Para contornar o problema, o sobrenadante foi filtrado através de filtros Millex (Millipore®, 0.45 µm) diretamente no vial, removendo o resíduo em questão.

Após as modificações, a metodologia para derivatização otimizada, obedece as seguintes etapas:

Nas figuras 8 e 9 encontram-se os cromatogramas dos padrões de fitosteróis derivatizados pelo método otimizado.

Figura 8 - – Cromatogramas dos padrões de fitosteróis derivatizados pelo método otimizado no estudo.

Figura 9 – Cromatograma do *pool* de padrões de fitosteróis derivatizado pelo método otimizado no presente estudo nas respectivas ordens de eluição: 1)Brassicasterol 2)Campesterol 3)Estigmasterol e 4)β-Sitosterol.

Apesar do aumento do tempo da reação de derivatização, com relação à metodologia original, com o método otimizado diminuiu-se a formação de produtos de degradação e/ou outros interferentes e os cromatogramas apresentaram-se com ótima resolução dos picos.

Os resultados obtidos na validação da metodologia de derivatização, realizada conforme disposto no item 3.2.2 encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros de validação da metodologia de derivatização modificada

Parâmetros	Brassicasterol	Campesterol	Estigmasterol	β-Sitosterol
Linearidade	0,9943	0,9964	0,9978	0,9940
Limite de detecção (µg)	6×10^{-6}	3×10^{-5}	6×10^{-5}	9×10^{-6}
Limite de quantificação (µg)	2×10^{-5}	1×10^{-4}	2×10^{-4}	3×10^{-5}
Precisão CV (%)	0,05	0,1	0,05	0,07

A partir dos resultados obtidos na validação e a melhora na resolução dos picos observadas na visualização dos cromatogramas considerou-se que o método pode ser utilizado para a derivatização dos fitosteróis de uma forma segura.

4.2. Validação de padrão interno para análises de quantificação de fitosteróis por cromatografia gasosa.

Uma das intenções do presente estudo foi a adequação de um composto que fosse utilizado como padrão interno, e desta forma foram

testados, individualmente, os seguintes padrões: 19-OH e o 5- α -colestano, usualmente utilizados como padrão interno em análises envolvendo esteróis.

Alíquotas de 20 μ g dos padrões 19 OH e 5- α -colestano foram pipetados individualmente em frascos (Pyrex®, 5mL), secos sob N₂, derivatizados e injetados segundo condições estabelecidas no item 3.2.1.5, para determinação dos tempos de retenção e posterior adequação ao método.

Após a injeção dos padrões, observou-se que o 19-hidroxicoolesterol elui entre os picos do Brassicasterol e o Campesterol, ficando complexa a separação entre os mesmos, sendo o composto em questão descartado.

O 5 α -colestano elui á 15 minutos (Figura 10). Entretanto, quando foram realizados os testes iniciais com as amostras dos alimentos desejados, sem a adição de 5 α -colestano, observou-se a presença de um pico interferente no mesmo tempo de retenção, impossibilitando a utilização deste composto como padrão interno.

Assim, optou-se por quantificar os compostos por de curvas de calibração, utilizando os padrões de Campesterol, Estigmasterol, Brassicasterol e β -Sitosterol para a construção das mesmas.

As curvas de calibração foram compostas por 10 pontos, com concentrações variando entre 10 e 1000 μ g/mL (Tabela 5).

Tabela 5 - Linearidade da curva de calibração para quantificação dos fitosteróis

Padrões	Equação da reta	Linearidade
Brassicasterol	$y = 1385,4x - 539,57$	$R^2 = 0,9943$
Campesterol	$y = 1149,8x + 3394$	$R^2 = 0,9964$
Estigmasterol	$y = 6052,3x - 23637$	$R^2 = 0,9978$
β -sitosterol	$y = 1249,4x - 20910$	$R^2 = 0,9940$

Figura 10 – Cromatograma do 5α-colestano e dos picos eluindo ao mesmo tempo nas amostras puras avaliadas (1- creme vegetal; 2 – farinha de trigo; 3 – pó de café moído torra tradicional).

4.3. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação e quantificação de fitosteróis.

As amostras utilizadas no presente estudo foram: cremes vegetais sem sal, farináceos: farinha de trigo, farinha de milho, farinha de mandioca, farinha de rosca e amido de milho e café em pó (torras: tradicional, forte e extraforte, descafeinado e *gourmet*), café solúvel instantâneo, cappuccino.

Devido à diferença na composição química entre os alimentos avaliados, optou-se em testar metodologias distintas para obtenção da fração insaponificável das amostras estudadas. O processo de otimização e validação das metodologias adotadas é descrito a seguir.

4.3.1. Otimização, validação de metodologia e quantificação dos teores de fitosteróis em amostras de cremes vegetais.

Os testes para otimização do método de saponificação para as amostras de creme vegetal, amostra essencialmente lipídica, foi utilizado o óleo de soja uma vez que os teores de fitosteróis presentes nesse produto já estão devidamente estabelecidos na literatura e sendo assim, facilmente confirmados.

O primeiro parâmetro otimizado foi do peso da amostra. De acordo a literatura (Dionisi et al. 1998; Dutta et al., 1997; Soupas et al., 2007; Johnson et al., 2005), normalmente são utilizados entre 100 a 300 mg de óleo em

reações de saponificação. No presente estudo, optou-se por testar duas concentrações intermediárias de óleo: 150 e 250 mg.

Além disso, também foram testados três métodos de saponificação: o preconizado por Saldanha et al., (2006) com adição 4 mL de uma solução aquosa de KOH 50% e 6 mL de álcool etílico as amostras previamente pesadas; o recomendado por Dionisi et al., (1998) utilizando-se 10 mL de solução metanólica de KOH 1 molar. Também foi testado um terceiro método, com modificações na metodologia preconizada por Dionisi et al. (1998), onde adicionou-se as amostras 10 mL de solução de etanólica de KOH 1 molar.

Na tabela 6, encontra-se o resumo da otimização do experimento de saponificação. Foram realizadas 6 extrações para cada método testado, sendo 3 extrações contendo 150 mg e 3 contendo 250 mg de amostra, perfazendo 18 extrações. As 18 amostras de óleo de soja foram pesadas em frascos Pyrex® (70 mL com tampa de rosca), sendo 9 frascos contendo 250 mg e 9 frascos com 150 mg de óleo. Posteriormente, adicionou-se aos mesmos 10 mL dos reagentes pré-determinados (Tabela 6). As amostras permaneceram sob agitação à temperatura ambiente, na ausência de luz, durante 22 horas (Saldanha et al., 2006).

Após o período de saponificação, adicionou-se, em cada frasco, 5 mL de água destilada e 10 mL de hexano PA. Em seguida, os frascos foram agitados em vortex durante 30 segundos. A fração superior (insaponificável contendo os fitosteróis) foi recolhida com o auxílio de pipetador automático e em seguida transferida para em um balão de fundo redondo. O

procedimento foi repetido três vezes, perfazendo 4 extrações ou 40 mL da fase hexânica (Saldanha et al., 2006).

As amostras submetidas à metodologia proposta por Saldanha et al., (2006), utilizando solução aquosa de KOH 50%, mostraram a formação de emulsão durante processo de extração dos insaponificáveis, sendo assim, a metodologia foi considerada inadequada para esse tipo de amostra e desconsiderada.

As análises prosseguiram, comparando-se os métodos propostos por Dionisi et al. (1998) e o método Dionisi et al. (1998) modificado. As 12 amostras restantes foram então derivatizadas, ressuspensas e injetadas conforme metodologia disposta nos itens 3.2.1.3, 3.2.1.4 e 3.2.1.5, respectivamente.

Após a injeção das amostras e análise dos cromatogramas, observou-se baixa resolução e/ou duplicação dos picos dos fitosteróis nas triplicatas contendo 250 mg de óleo, independente do método de saponificação. O mesmo não foi observado nas amostras saponificadas a partir de 150 mg de óleo (Figura 11).

Com base nesses resultados, recomenda-se que para amostras essencialmente lipídicas 150 mg de amostras devem ser utilizadas no início da reação de saponificação.

Tabela 6 - Parâmetros avaliados para a otimização da reação de saponificação em amostras de óleo de soja

Amostra	Peso da amostra (mg)	Reagente utilizado	Método
1	250	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
2	250	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
3	250	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
4	150	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
5	150	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
6	150	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
7	250	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
8	250	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
9	250	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
10	150	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
11	150	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
12	150	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
13	250	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado
14	250	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado
15	250	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado
16	150	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado
17	150	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado
18	150	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado

Figura 11 – Cromatogramas das amostras com 250 mg e 150 mg de óleo de soja. Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem ao Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol e β -Sitosterol, respectivamente.

Uma vez estabelecido que as amostras iniciais de 150 mg apresentaram melhores resultados cromatográficos, somente os dados obtidos nos cromatogramas das mesmas foram tabulados e usados para definir qual a melhor solução a ser usada para saponificação.

A partir da tabulação dos dados das áreas dos picos dos cromatogramas referentes às amostras 10 a 12 e 16 a 18, foram calculadas as concentrações de FS nelas presente. Em seguida, para cada FS, foram comparadas as médias das concentrações obtidas com cada método, um com a adição de solução metanólica 1 molar de KOH e o outro com adição de solução etanólica 1 molar de KOH.

Para comparar os métodos de saponificação foi utilizado o teste t-student. O nível de significância estabelecido para os testes estatísticos aplicados foi de 5%. De acordo com os resultados obtidos, há diferença diferenças estatisticamente significantes entre os métodos de saponificação avaliados para os compostos campesterol, estigmasterol e β -Sitosterol ($p < 0.05$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação entre os métodos de saponificação testados

Método	Concentração ($\mu\text{g/ mL}$) $\pm$ desvio padrão.		
	Campesterol	Estigmasterol	B-Sitosterol
Dionisi et al. (1998)	38,47 $\pm$ 0,12 ^a	6,05 $\pm$ 0,93 ^a	116,68 $\pm$ 0,55 ^a
Dionisi et al. modificado	53,41 $\pm$ 0,33 ^b	9,21 $\pm$ 0,74 ^b	238,24 $\pm$ 0,23 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05$

Houve diferença estatisticamente significante entre os métodos utilizados para determinação dos teores de FS.

Em comparação com os dados obtidos na literatura (Verleyen et al., 2002; Phillips et al., 2002; Codex 2011) o método de saponificação modificado no presente estudo, através da adição de solução etanólica de KOH 1 molar em detrimento a solução preconizada na metodologia original (Dionisi et al., 1998), foi o que obteve melhores resultados, sendo o mesmo validado e utilizado no preparo das amostras de creme vegetal durante o experimento.

Os parâmetros de validação da metodologia final utilizada para avaliação dos teores de fitosteróis no creme vegetal estão descritos na tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros de validação da metodologia otimizada para saponificação de amostras de creme vegetal

Parâmetros	Campesterol	Estigmasterol	β -Sitosterol
Concentração (mg/100g).	31,6 $\pm$ 0,23	8,72 $\pm$ 0,16	113,5 $\pm$ 5,73
Linearidade	0,9964	0,9978	0,9940
Adição nível 1 (μ g/ml)	20	30	50
Adição nível 2 (μ g/ml)	100	60	200
Recuperação (%) nível 1	93,5	99,1	98,7
Recuperação (%) nível 2	96,8	95,0	99,3
Limite de detecção (μ g/g)	5,4 $\times 10^{-3}$	1,2 $\times 10^{-3}$	6 $\times 10^{-4}$
Limite de quantificação (μ g/g)	1,8 $\times 10^{-2}$	4 $\times 10^{-2}$	2 $\times 10^{-3}$
Precisão CV (%)	0,9	0,4	2,8

Conforme disposto no item 3.1.2, foram analisados dois lotes (nomeados pelos números 1 e 2) de duas marcas comerciais, que receberam o código A e B, em três diferentes formas: *in natura* e termo

oxidadas a 100°C e 140°C. Três amostras de cada lote foram homogeneizadas e analisadas em triplicatas.

Os teores de fitosteróis encontrados nas amostras de creme vegetal estão demonstrados na tabela 9, apresentados em mg/100g de amostra.

Em ambas as marcas, o fitosterol predominante é o β -Sitosterol, representando aproximadamente 73% e 71%, para as marcas A e B, respectivamente, seguido pelo campesterol e depois estigmasterol. Não houve detecção de brassicasterol nas amostras de cremes vegetais estudadas, sendo assim o teor de brassicasterol não será demonstrado.

Considerando-se os teores totais de fitosteróis das amostras *in natura*, as amostras dos lotes dois apresentaram maiores teores de FS, tanto para a marca A quanto para a marca B, no entanto, estas diferenças não foram consideradas estatisticamente significantes.

Rodrigues e colaboradores (2004) avaliaram a porcentagem dos principais fitosteróis em creme vegetal enriquecido com FS. O β -Sitosterol, campesterol e o estigmasterol, nessa ordem, assim como no presente projeto foram os fitosteróis encontrados em maior quantidade.

Após o tratamento térmico, diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) ocorreram, em todas as amostras de 140°C, quando comparadas as amostras *in natura* e submetidas ao aquecimento de 100°C.

Tabela 9 -Teores de fitosteróis em amostras de creme vegetal Marcas A e B (mg/100g).

Marca/lote	Temperatura	Fitosteróis			
		Concentração - mg /100g (Média ± Desvio padrão) *			
		Campesterol	Estigmasterol	β-Sitosterol	Total
Marca A lote 1	In natura	39,5 ± 0,3 ^a	14,5 ± 0,2 ^a	148,2 ± 1,3 ^a	202,3 ± 0,5 ^a
	100°C	33,6 ± 2,7 ^b	13,2 ± 0,5 ^a	128,4 ± 7,4 ^b	175,4 ± 3,6 ^b
	140°C	12,7 ± 1,3 ^c	6,0 ± 0,0 ^b	54,2 ± 1,4 ^c	73,0 ± 0,9 ^e
Marca A lote 2	In natura	40,2 ± 1,4 ^a	15,2 ± 0,4 ^a	151,2 ± 5,8 ^a	206,7 ± 2,5 ^a
	100°C	36,3 ± 4,9 ^a	14,0 ± 1,4 ^a	134,8 ± 17,9 ^b	185,1 ± 8,0 ^{a, b}
	140°C	16,2 ± 2,0 ^c	3,2 ± 0,2 ^c	63,5 ± 0,1 ^d	83,0 ± 0,7 ^d
Marca B lote 1	In natura	33,6 ± 2,1 ^b	12,2 ± 0,5 ^a	116,2 ± 2,0 ^b	162,1 ± 1,2 ^b
	100°C	32,5 ± 2,2 ^b	11,8 ± 0,5 ^a	113,6 ± 8,3 ^b	158,0 ± 3,6 ^b
	140°C	21,9 ± 0,6 ^d	9,5 ± 0,2 ^b	79,9 ± 7,2 ^c	111,5 ± 0,7 ^c
Marca B lote 2	In natura	35,3 ± 0,2 ^b	12,7 ± 0,2 ^a	125,6 ± 2,7 ^b	173,7 ± 1,0 ^b
	100°C	34,1 ± 1,1 ^b	11,69 ± 0,7 ^a	111,4 ± 8,8 ^b	157,2 ± 3,5 ^b
	140°C	16,8 ± 0,3 ^c	7,9 ± 0,4 ^b	59,6 ± 2,6 ^d	84,4 ± 1,1 ^d

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05$.

Considerando os teores totais de fitosteróis, nas amostras da marca A, houve diferença estatisticamente significativa na comparação do creme vegetal *in natura* com os termo-oxidados (redução entre 10,4 e 13,3%, quando aquecidas a 100°C e entre 31 e 64% após o aquecimento das amostras a 140°C), e também na comparação entre as amostras termo oxidadas (redução entre 41 e 55%).

No caso da comparação entre a creme vegetal *in natura* e a submetida a 100°C, a diferença se deve principalmente a redução nos teores de β -Sitosterol, que reduziu aproximadamente 13,3% e 11,3% nas amostras dos lotes 1 e 2, respectivamente. As diferenças encontradas para os teores de campesterol e estigmasterol não foram consideradas estatisticamente significantes. .

Quando comparadas as amostras de creme vegetal *in natura* e a submetida a 140°C, houve diferença estatisticamente significativa nos teores de todos os fitosteróis estudados.

Para as amostras da marca B, no lote 1, não houve diferença estatisticamente significativa nos teores total e nem individual de fitosteróis, entre as amostras *in natura* e termo oxidadas a 100°C. A redução dos teores não passou de 3,5%.

Diferenças estatisticamente significantes só foram encontradas na comparação entre os teores de fitosteróis das amostras *in natura* com as amostras termo oxidadas a 140°C e entre as amostras termo oxidadas, a redução nesses casos ficou entre 22,2 e 35%.

No lote 2, houve diferença significativa também na comparação entre os teores de fitosteróis das amostras in natura para as termo oxidadas a 100°C. Novamente, essa diferença nos teores totais deu-se principalmente pelo β -Sitosterol. As variações foram de 9,5 a 48%.

A comparação dos teores de fitosteróis entre as marcas revelou que houve diferença estatisticamente no teor de β -Sitosterol, bem como nos teores de FS. A legislação brasileira somente exige que os creme vegetais devem conter de 10 a 90% de teor lipidico, sendo este sempre de origem vegetal. A combinação de óleos utilizados fica a cargo da indústria, segundo melhor lhe convir, tal condição pode ter influenciado para os diferentes teores de fitosteróis encontrados entre as marcas de cremes vegetais, cada indústria produz seu creme vegetal utilizando diferentes combinações de óleos vegetais.

A redução nos teores de fitosteróis nas amostras termo oxidadas pode ser explicada pela possível degradação destes compostos via processo oxidativo. O contato com o ar, luz, aquecimento e presença de metais, são fatores que favorecem a oxidação dos fitosteróis, estes, que tem a sua estabilidade oxidativa determinada principalmente pelo grau de saturação da estrutura em anel de esteróis (Dutta et al., 2006; Soupas et al., 2006).

Alguns autores (Lampi et al., 2000; Soupas et al., 2004; Lampi et al., 2002; Soupas et al., 2006) demonstraram que além da estrutura química, o binomio tempo X temperatura de exposição também são fatores primordiais na avaliação da oxidação dos esteróis. Em maiores temperaturas houve

maior degradação dos fitosteróis, assim como também em condições de aquecimento, em temperaturas mais baixas, porém por tempo prolongado.

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com aqueles encontrados por Soupas et al. (2006) e Oehrl et al., (2001), onde se observou perda do conteúdo de fitosteróis quando expostos ao aquecimento, sendo perdas menores encontradas para o campesterol e estigmasterol e maiores para o β -Sitosterol.

Segundo a ANVISA (2008), para poder utilizar a alegação de produto enriquecido com fitosteróis, a porção do produto pronto para consumo deve fornecer no mínimo 0,8g de fitosteróis livres.

Considerando os teores de FS obtidos nos cremes vegetais *in natura*, os dados obtidos no presente estudo revelam que, sem o enriquecimento, os cremes vegetais estudados oferecem, por porção de creme vegetal (10g), aproximadamente 2% do valor necessário para receber a alegação de produto enriquecido.

Os teores de fitosteróis encontrados para nos cremes vegetais *in natura* avaliados no presente estudo foram similares àqueles encontrados em óleo de soja e azeite (Weihrauch et al., 1978; Toivo et al., 1998; Piironen et al., 2000; Phillips et al., 2002; Ostlund, 2002; Normén et al., 2007; Bachetti et al., 2011), alimentos considerados fonte destes compostos.

4.3.2. Otimização, validação de metodologia e quantificação dos teores de fitosteróis em farináceos.

A otimização da metodologia de saponificação para os farináceos foi realizada utilizando farinha de trigo.

Assim como no experimento anterior, o primeiro parâmetro testado foi o peso das amostras. Inicialmente foram pesadas 6 amostras contendo 0,5g e 6 contendo 1g de farinha, respectivamente.

Além do parâmetro peso da amostra, foram testados dois métodos de saponificação: Saldanha et al., (2006) com adição 4 mL de uma solução aquosa de KOH 50% e o método modificado no experimento das amostras de maior teor lipídico - Dionisi et al. (1998) modificado, onde adicionou-se as amostras 10 mL de solução de etanólica de KOH 1 molar. Realizaram-se 6 extrações para cada método testado, sendo 3 extrações contendo 0,5 g e 3 contendo 1 g de amostra, perfazendo 12 extrações.

Na tabela 10 encontra-se o resumo da otimização do experimento de saponificação em amostras de farináceos.

As 12 amostras de farinha de trigo foram pesadas em frascos Pyrex[®] (70 mL com tampa de rosca), sendo 6 frascos contendo aproximadamente 0,5g e 6 frascos com aproximadamente 1,0g de farinha, respectivamente.

Em seguida, adicionou-se aos mesmos 10 mL dos reagentes pré-determinados (Tabela 10). As amostras permaneceram sob agitação a temperatura ambiente, na ausência de luz, durante 22 horas (Saldanha et al., 2006).

Tabela 10 - Parâmetros utilizados para a otimização da reação de saponificação em amostras de farinha de trigo.

Amostra	Peso da amostra (mg)	Reagente utilizado	Método
1	250	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
2	250	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
3	250	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
4	150	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
5	150	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
6	150	KOH 50% em água + etanol	Saldanha et al., (2006)
7	250	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
8	250	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
9	250	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
10	150	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
11	150	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
12	150	KOH metanólico 1 molar	Dionisi et al., (1998)
13	250	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado
14	250	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado
15	250	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado
16	150	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado
17	150	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado
18	150	KOH etanólico 1 molar	Dionisi et al. (1998) modificado

Após as 22 horas de saponificação a extração dos FS seguiu a metodologia de Saldanha et. al (2006).

Decorridas às 22 horas de saponificação, verificou-se que a metodologia proposta por Saldanha et. al (2006), utilizando solução aquosa de KOH 50%, não se adequou a amostra em questão, com formação de grumos durante o processo, não sendo solubilizada pelos reagentes utilizados, sendo a mesma desconsiderada. Desta forma, foi validado para a amostra em questão o método modificado durante o experimento em questão (adição de 10 mL de KOH etanólico 1 molar).

Após a reação de derivatização (item 3.2.1.3), as amostras foram injetadas em cromatógrafo gasoso, conforme parâmetros descritos no item 3.2.1.5.

A partir da análise dos cromatogramas, observaram-se melhores resultados nas amostras saponificadas a partir de 1 g de farinha, em detrimento as saponificadas com 0,5 g de trigo, que apresentaram picos pequenos para campesterol e estigmasterol, prejudicando assim a posterior quantificação (Figura 12).

Com base nos resultados obtidos, estabeleceu-se que o método de saponificação modificado no presente estudo, com adição de solução etanólica de KOH 1 molar e utilização de 1g de farinha foi o que melhor serviu para a detecção dos fitosteróis, sendo o mesmo validado e utilizado nas amostras de alimentos farináceos durante o projeto em questão.

A tabela 11 apresenta os dados obtidos na validação do método para determinação dos teores de FS em farináceos.

Tabela 11 - Parâmetros de validação da metodologia otimizada para determinação dos teores de fitosteróis em farináceos

Parâmetros	Campesterol	Estigmasterol	β -Sitosterol
Concentração (mg / 100g)	$2,40 \pm 0,21$	$0,72 \pm 0,14$	$15,33 \pm 0,46$
Linearidade	0,9911	0,9939	0,9975
Adição nível 1	20	5	30
Adição nível 2	100	50	200
Recuperação (%) nível 1	94,5	96,6	98,2
Recuperação (%) nível 2	98,6	95,9	99,3
Limite de detecção ($\mu\text{g/g}$)	$3,9 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$	9×10^{-4}
Limite de quantificação ($\mu\text{g/g}$)	$1,3 \times 10^{-2}$	7×10^{-2}	3×10^{-3}
Precisão CV (%)	0,5	0,06	0,7

Os teores de fitosteróis encontrados em cada lote das duas marcas das farinhas de trigo, de rosca, de milho e mandioca e amido de milho estão apresentados na tabela 12.

Os fitosteróis encontrados nas amostras de farinhas de trigo, de rosca, mandioca e milho, amido de milho foram o β -Sitosterol, campesterol e estigmasterol, sendo o β -Sitosterol o predominante em todas as amostras, seguido, com exceção das amostras de amido de milho e uma das marcas de farinha de mandioca, pelo campesterol.

O brassicasterol não foi determinado nas amostras estudadas, pois sua detecção encontrou-se abaixo do limite de detecção.

As maiores concentrações de fitosteróis foram encontradas nas amostras de farinha de milho ($27,27 \pm 0,2$ a $50,12 \pm 0,1$ mg/ 100 g) e farinha de rosca ($33,34 \pm 0,4$ a $48,79 \pm 0,5$ mg/ 100g). Em seguida estiveram as amostras de farinha de trigo ($21,22 \pm 0,1$ a $23,81 \pm 0,2$ mg/100g) e farinha de

mandioca ($10,13 \pm 0,0$ a $17,42 \pm 0,1$ mg/100g), nas Marcas A e B, respectivamente.

Figura 12 – Cromatogramas das amostras com 0,5 g e 1 g de farinha de trigo. Os picos 1, 2 e 3 correspondem ao Campesterol, Estigmasterol e β -Sitosterol, respectivamente.

Tabela 12 - Teores de fitosteróis em farináceos das marcas A e B (mg/100g).

Tipo	Marca/lote	Fitosteróis			
		Concentração - mg /100g (Média ± Desvio padrão) *			
		Campesterol	Estigmasterol	β-Sitosterol	Total
Farinha de trigo	Marca A lote 1	2,76 ± 0,12 ^a	0,83 ± 0,15 ^a	17,62 ± 0,54 ^a	21,22 ± 0,27 ^a
	Marca A lote 2	3,20 ± 0,31 ^a	0,84 ± 0,20 ^a	19,78 ± 0,33 ^a	23,81 ± 0,24 ^a
	Marca B lote 1	2,82 ± 0,17 ^a	0,82 ± 0,12 ^a	17,58 ± 0,27 ^a	21,22 ± 0,13 ^a
	Marca B lote 2	2,76 ± 0,15 ^a	0,83 ± 0,11 ^a	18,26 ± 0,32 ^a	21,85 ± 0,13 ^a
Farinha de milho	Marca A lote 1	3,24 ± 0,25 ^a	1,17 ± 0,10 ^b	24,1 ± 0,21 ^b	28,51 ± 0,17 ^b
	Marca A lote 2	6,91 ± 0,21 ^b	1,44 ± 0,09 ^b	41,77 ± 0,18 ^c	50,12 ± 0,12 ^c
	Marca B lote 1	4,09 ± 0,30 ^c	1,10 ± 0,02 ^b	22,08 ± 0,46 ^b	27,27 ± 0,23 ^b
	Marca B lote 2	3,97 ± 0,11 ^c	1,12 ± 0,21 ^b	29,43 ± 0,41 ^d	34,52 ± 0,26 ^d
Farinha de rosca	Marca A lote 1	6,1 ± 0,24 ^b	0,9 ± 0,03 ^a	32,9 ± 0,60 ^e	39,9 ± 0,21 ^d
	Marca A lote 2	5,6 ± 0,76 ^b	0,84 ± 0,02 ^a	26,9 ± 0,62 ^b	33,34 ± 0,42 ^d
	Marca B lote 1	7,72 ± 0,51 ^d	1,15 ± 0,09 ^b	38,19 ± 1,74 ^c	47,06 ± 0,80 ^c
	Marca B lote 2	8,91 ± 0,49 ^d	1,16 ± 0,08 ^b	38,73 ± 1,31 ^c	48,79 ± 0,53 ^c
Farinha de mandioca	Marca A lote 1	1,49 ± 0,07 ^e	1,52 ± 0,12 ^b	12,42 ± 0,72 ^e	15,43 ± 0,21 ^e
	Marca A lote 2	1,15 ± 0,09 ^e	1,24 ± 0,03 ^b	7,74 ± 0,09 ^f	10,13 ± 0,07 ^f
	Marca B lote 1	1,63 ± 0,05 ^e	2,29 ± 0,06 ^c	13,50 ± 0,21 ^e	17,42 ± 0,16 ^e
	Marca B lote 2	1,78 ± 0,31 ^e	2,15 ± 0,12 ^c	10,43 ± 0,13 ^e	14,36 ± 0,13 ^e
Amido de milho	Marca A lote 1	0,55 ± 0,07 ^f	0,78 ± 0,01 ^a	2,00 ± 0,09 ^h	3,33 ± 0,01 ^f
	Marca A lote 2	0,80 ± 0,05 ^f	0,80 ± 0,03 ^a	3,14 ± 0,15 ^g	4,74 ± 0,07 ^g
	Marca B lote 1	0,56 ± 0,09 ^f	0,88 ± 0,02 ^{a, b}	1,60 ± 0,04 ^h	3,04 ± 0,08 ^f
	Marca B lote 2	0,53 ± 0,03 ^f	0,98 ± 0,01 ^b	1,58 ± 0,02 ^h	3,09 ± 0,07 ^f

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significantes p<0,05.

Os menores teores de FS encontrados para a farinha de mandioca, quando comparados com as farinhas provenientes de cereais, possivelmente estão relacionados ao fato de que sua matéria prima possui um menor teor lipídico os cereais.

Com exceção das amostras de farinha de trigo, em todos os outros produtos houve diferença estatisticamente significante quando comparando diferentes lotes e marcas dos produtos.

Os resultados obtidos nesse estudo são de 24,3 a 73,6% inferiores aqueles encontrados por Nórmen et al. (2002). Essas diferenças podem ocorrer devido alterações nas condições de cultivo das matérias primas. Dangour et al., (2009) afirmam que diferentes cultivares, da mesma cultura, podem apresentar composições nutricionais diferentes, uma vez que dependem da utilização de fertilizantes, regime de utilização de defensivos agrícolas, condições de crescimento, estação do ano e outros fatores.

Outros autores (Normen et al., 1999; Piironen et al., 2003; Gul et al., 2006) observaram que dependendo do estágio de maturação do vegetal analisado há mudança nos teores de FS encontrados. Vegetais mais maduros apresentaram maiores teores de FS.

As diferenças de nos teores de FS encontrados para as diferentes farinhas possivelmente está relacionada às diferentes matérias primas que a originam. O milho é o cereal de maior teor de fitosteróis, consequentemente sua farinha também apresentou maiores teores de FS.

Os menores teores de FS encontrados no amido de milho possivelmente são decorrentes de seu processo de obtenção. O amido de milho é obtido após tratamento térmico, moagem e refinação do milho.

Os farináceos apresentaram baixos teores de FS se comparados aos alimentos considerados fonte (óleos e sementes), que possuem teores totais superiores a 150 mg/ 100g. No entanto, os óleos são consumidos em quantidades muito inferiores ao longo do dia, sendo assim, os farináceos e produtos dele derivados acabam por contribuir mais para o aumento da ingestão de FS uma vez que são consumidos em maiores quantidades.

4.3.3. Otimização, validação de metodologia e quantificação dos teores de fitosteróis em amostras em café.

Com base nos testes feitos nas amostras anteriores, inicialmente testou-se a metodologia preconizada por Saldanha et al., (2006), com adição 4 mL de uma solução aquosa de KOH 50% e 6 mL de álcool etílico as amostras previamente pesadas (1g).

Obteve-se sucesso já nos primeiros testes realizados, sendo portanto o método Saldanha et al., (2006) o utilizado para determinação dos teores de fitosteróis nas amostras de café.

A figura 13 mostra o cromatograma do teste realizado e que mostrou-se adequado para ser utilizado com essas amostras.

Figura 13 – Cromatograma amostra com 1g de pó de café. Os picos 1, 2, 3 Campesterol, Estigmasterol e β -Sitosterol.

Na tabela 13 estão os resultados da validação do método analítico otimizado para as amostras de café

Tabela 13 - Parâmetros de validação da metodologia para amostras de café.

Parâmetros	Campesterol	Estigmasterol	β-Sitosterol
Concentração (mg / 100g).	20,25 ± 0,89	8,21 ± 0,43	68,22 ± 0,91
Linearidade	0,9948	0,9959	0,9939
Adição nível 1	20	5	50
Adição nível 2	100	20	200
Recuperação (%) nível 1	96,7	98,2	98,5
Recuperação (%) nível 2	97,9	95,9	99,4
Limite de detecção (µg/g)	3,6x10 ⁻³	4,8x10 ⁻³	4x10 ⁻⁴
Limite de quantificação (µg/g)	1,2x10 ⁻²	1,6 x10 ⁻²	1,4x10 ⁻²
Precisão CV (%)	0,04	0,06	0,03

De acordo com os resultados obtidos no experimento de validação, os métodos de saponificação otimizados no presente estudo mostraram-se robustos, sensíveis e precisos para determinação dos fitosteróis nas amostras pesquisadas, podendo ser então utilizados com segurança para a quantificação dos referidos compostos.

Os teores de fitosteróis encontrados para os dois lotes das duas marcas das amostras de pó de café torrado e moídos torras: extraforte, forte, tradicional, descafeinado, gourmet, solúvel, cappuccino se encontram nas tabelas 14 e 15.

Os principais FS encontrados nas amostras de pó de café analisadas são β-Sitosterol, campesterol e estigmasterol, sendo o β-Sitosterol observado em maiores concentrações.

O grau de torrefação (tradicional, forte e extra-forte) não influenciou nos teores de fitosteróis encontrados nas amostras avaliadas.

Tabela 14 - Teores de fitosteróis em pó de café moído das marcas A e B (mg/100g).

Tipo	Marca/lote	Fitosteróis			
		Concentração - mg /100g (Média ± Desvio padrão)*			
		Campesterol	Estigmasterol	β-Sitosterol	Total
Extra Forte	Marca A lote 1	18,46 ± 0,09 ^a	7,66 ± 0,08 ^a	64,38 ± 0,01 ^a	90,50 ± 0,02 ^a
	Marca A lote 2	19,52 ± 0,24 ^a	8,04 ± 0,11 ^a	69,38 ± 0,84 ^a	96,94 ± 0,61 ^a
	Marca B lote 1	18,41 ± 0,37 ^a	7,56 ± 0,14 ^a	62,85 ± 1,38 ^a	88,83 ± 0,54 ^a
	Marca B lote 2	19,08 ± 0,43 ^a	8,08 ± 0,17 ^a	66,51 ± 1,55 ^a	93,67 ± 0,71 ^a
Forte	Marca A lote 1	18,30 ± 1,39 ^a	7,68 ± 0,48 ^a	63,75 ± 3,38 ^a	89,73 ± 1,12 ^a
	Marca A lote 2	20,80 ± 0,76 ^a	8,51 ± 0,29 ^a	71,55 ± 2,51 ^a	100,86 ± 0,89 ^a
	Marca B lote 1	18,12 ± 0,28 ^a	7,63 ± 0,11 ^a	62,32 ± 1,15 ^a	88,07 ± 0,73 ^a
	Marca B lote 2	19,30 ± 0,06 ^a	7,89 ± 0,02 ^a	66,79 ± 0,19 ^a	93,99 ± 0,08 ^a
Tradicional	Marca A lote 1	19,81 ± 0,13 ^a	7,80 ± 0,03 ^a	65,75 ± 0,37 ^a	93,36 ± 0,22 ^a
	Marca A lote 2	19,84 ± 0,34 ^a	8,26 ± 0,13 ^a	70,78 ± 1,13 ^a	98,89 ± 0,68 ^a
	Marca B lote 1	20,20 ± 0,84 ^a	8,19 ± 0,33 ^a	67,23 ± 2,80 ^a	95,62 ± 1,04 ^a
	Marca B lote 2	21,14 ± 0,09 ^a	8,60 ± 0,03 ^a	69,09 ± 0,18 ^a	98,83 ± 0,07 ^a
Gourmet	Marca A lote 1	19,53 ± 0,19 ^a	7,90 ± 0,08 ^a	71,27 ± 0,90 ^a	98,71 ± 0,59 ^a
	Marca A lote 2	14,14 ± 1,89 ^b	5,41 ± 0,14 ^b	44,65 ± 1,02 ^b	64,20 ± 0,95 ^c
	Marca B lote 1	18,52 ± 0,42 ^a	7,54 ± 0,16 ^a	70,28 ± 1,50 ^a	96,34 ± 0,92 ^a
	Marca B lote 2	19,25 ± 0,11 ^a	6,88 ± 0,33 ^a	63,03 ± 3,59 ^a	89,16 ± 1,27 ^a
Descafeinado	Marca A lote 1	21,38 ± 0,95 ^a	7,65 ± 0,84 ^a	61,74 ± 7,56 ^a	90,77 ± 3,54 ^a
	Marca A lote 2	11,27 ± 0,16 ^b	4,97 ± 0,15 ^b	40,21 ± 0,21 ^b	56,45 ± 0,18 ^c
	Marca B lote 1	18,86 ± 0,74 ^a	7,86 ± 0,29 ^a	72,99 ± 2,93 ^a	99,72 ± 1,29 ^a
	Marca B lote 2	24,71 ± 0,49 ^a	10,72 ± 0,29 ^c	85,75 ± 1,64 ^a	121,18 ± 0,84 ^d

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05$.

Tabela 15 - Teores de fitosteróis em pó de café solúvel, cappuccino, borra e bebida coada.

Tipo	Marca/lote	Fitosteróis			
		Concentração - mg /100g (Média ± Desvio padrão)*			
		Campesterol	Estigmasterol	β-Sitosterol	Total
Solúvel	Marca A lote 1	0,65 ± 0,01 ^c	0,79 ± 0,01 ^d	2,05 ± 0,02 ^c	3,49 ± 0,01 ^e
	Marca A lote 2	0,74 ± 0,01 ^c	0,81 ± 0,00 ^d	2,22 ± 0,03 ^c	3,78 ± 0,00 ^e
	Marca B lote 1	0,79 ± 0,07 ^c	1,04 ± 0,05 ^d	3,45 ± 0,18 ^c	5,28 ± 0,19 ^f
	Marca B lote 2	0,68 ± 0,01 ^c	0,80 ± 0,01 ^d	2,09 ± 0,03 ^c	3,57 ± 0,02 ^e
Cappuccino	Marca A lote 1	1,13 ± 0,07 ^c	0,91 ± 0,01 ^d	4,77 ± 0,42 ^c	6,82 ± 0,08 ^f
	Marca A lote 2	1,09 ± 0,05 ^c	0,91 ± 0,00 ^d	3,78 ± 0,10 ^c	5,78 ± 0,07 ^f
	Marca B lote 1	1,04 ± 0,00 ^c	0,84 ± 0,05 ^d	3,44 ± 0,19 ^c	5,32 ± 0,03 ^f
	Marca B lote 2	0,99 ± 0,03 ^c	0,86 ± 0,00 ^d	3,18 ± 0,05 ^c	5,03 ± 0,02 ^f
Grão Verde	Marca A lote 1	8,42 ± 0,38 ^d	3,64 ± 0,16 ^e	33,30 ± 1,92 ^d	45,36 ± 0,65 ^g
Borra	Marca A lote 2	7,77 ± 0,12 ^d	3,56 ± 0,09 ^e	26,45 ± 0,89 ^d	37,78 ± 0,54 ^g
Bebida Coadada	ND	ND	ND	ND	ND

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas p<0,05

ND - não detectado

Ao contrário do que ocorre com outros compostos como trigonelina, cafeína e ácidos clorogênicos que tem seus teores alterados pelo grau de torrefação (Moraes et al, 2001; Monteiro et al., 2005; Nascimento et al., 2007; Abrahão et al., 2008, Abrahão et al. 2010) não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os fitosteróis nas amostras de café com diferentes graus de torrefação.

As amostras de café descafeinado demonstraram variação, com diferença estatisticamente significativa, entre os teores de fitosteróis quando realizada comparação intralotes e entre marcas. Alterações na composição química de diferentes amostras de café descafeinado também foram encontradas por Toci et al., 2006.

Além da extração da cafeína, outros fatores interferem no resultado das amostras de café, como origem, clima, processamento e torrefação.

Quando as amostras de café descafeinado foram comparadas com as amostras somente submetidas à torrefação houve diferenças estatisticamente significantes somente com um lote de cada marca, um dos lotes da marca A apresentou menores teores de fitosteróis enquanto um dos lotes da marca B apresentou maiores teores de fitosteróis que as amostras somente torradas. Novamente, essa diferença possivelmente está associada a diferenças da matéria prima utilizada.

O segundo lote da marca A de café *gourmet* apresentou teores de fitosteróis significativamente diferentes do lote 1 da marca A e dos dois lotes da marca B. Essa diferença possivelmente está relacionada à alterações dos grãos causadas por diferenças durante as fases de plantação e colheita.

Os lotes e marcas das amostras de cappuccino e café solúvel, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados entre si. Os teores de fitosteróis para essas amostras foi 90% inferior às amostras de pó de café analisadas.

O café solúvel é produto de um café que passa por etapas de extração, concentração, secagem por aspersão ou liofilização, após o processo de torrefação (Inmetro, 2012). Essas etapas adicionais de processamento podem ser as responsáveis por estes resultados, ocorrendo perda de grande parte do teor de fitosteróis na extração.

Os pós de cappuccinos prontos para consumo disponíveis no mercado são compostos por açúcar, leite em pó integral, café solúvel, bicarbonato de sódio, cacau em pó entre outros componentes. Por levar café solúvel em sua composição o cappuccino também possui menores teores de fitosteróis. O fato dos teores de fitosteróis do cappuccino não serem inferiores aos do café solúvel, possivelmente, é decorrente do fato dos outros ingredientes que o compõe também apresentarem fitosteróis em sua composição, tais como chocolate e leite.

Os teores de fitosteróis encontrados na bebida filtrada ficaram abaixo do limite de detecção do método empregado, portanto não foram quantificadas. Suspeita-se que esse resultado é decorrente do fato dos fitosteróis serem componentes lipossolúveis e, portanto, não extraídos de maneira eficaz somente pela filtragem com água quente. Assim, ao ingerir a bebida coada não o indivíduo não ingere os FS presentes no café. A análise da borra proveniente da preparação da bebida filtrada mostrou a retenção parcial dos FS nessa matriz.

Considerando-se a busca de alimentos que possam auxiliar no aumento do consumo de fitosteróis, avaliando os valores de teores de FS encontrados para as amostras de pó de café torrado e moído o café poderia ser uma boa fonte de FS, no entanto, ao avaliar o teor de FS da bebida coada nota-se uma grande perda destes compostos, assim a alternativa atual seria o consumo de café solúvel, que retém maiores teores de fitosteróis considerando sua forma final de consumo.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos durante o desenvolvimento deste projeto, considera-se que a otimização das metodologias analíticas de derivatização e saponificação se mostraram eficientes.

A validação dos novos métodos para saponificação a frio mostrou que o método foi sensível e preciso para determinação dos fitosteróis nas amostras estudadas.

Apesar do tempo da reação de derivatização ter aumentado, em comparação com a metodologia original, houve a melhoria da resolução cromatográfica, sem a formação de produtos de degradação, e a identificação dos compostos desejados foi facilitada, assim a nova metodologia foi considerada segura para ser usada para a derivatização dos fitosteróis.

Os cremes vegetais termo oxidados a 140⁰C apresentaram grande redução nos teores de fitosteróis quando comparadas as amostras in natura e 100⁰C, possivelmente devido à oxidação dos fitosteróis.

As amostras de farinhas e amido de milho apresentaram baixos teores de fitosteróis quando comparadas aos alimentos considerados fonte, porém, são alimentos base da alimentação da população em geral, considerando o consumo tanto na forma pura, quanto indireta, como ingredientes diversos outros produtos tais como pães, tortas, bolos e massas, sendo assim em termos de consumo diário podem contribuir de forma significativa para o alcance das recomendações diárias.

Os teores de fitosteróis dos grãos de café verde são inferiores aqueles encontrados nas amostras de pó de café torrado e moído. Esta diferença

possivelmente está associada ao fato da etapa de torrefação concentrar os compostos presentes no café pela grande perda de umidade.

As amostras de pó de café apresentam expressiva concentração de fitosteróis, porém o mesmo não é observado com nas amostras de café solúvel, bebida filtrada e cappuccino.

O pó de café moído, independente do grau de torra ou processo de descafeinização apresenta teores consideráveis de fitosteróis, similares àqueles encontrados para alguns óleos vegetais, fator que pode ser considerado no desenvolvimento de novos produtos.

Novos estudos avaliando os teores de fitosteróis em alimentos são necessários para que possamos melhor avaliar quanto à população realmente consome desse composto. Ainda, também são necessários estudos que avaliem os teores de óxidos de fitosterol nos alimentos uma vez que eles podem ter efeitos deletérios na saúde.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café. Processo produtivo. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=207> Acesso em: maio 2014.
- Abrahão AS, Pereira RGFA, Duarte SMS, Lima AR, Alvarenga DJ, Ferreira EB. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). *Ciênc. agropec.* 2010, 34 (2), 414-20.
- Abrahão AS, Pereira RGFA, Lima AR, Ferreira EB, Malta MR. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. *Pesq. agropec. Bras.* 2008, 43 (12), 1799-804.
- AbuMweis SS, Barake R, Jones P. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food & Nutr Res.* 2008, doi:10.3402/fnr.v52i0.1811
- AbuMweis SS, Marinangeli CPF, Frohlich J, Jones PJ. Implementing Phytosterols into Medical Practice as a Cholesterol-Lowering Strategy: Overview of Efficacy, Effectiveness and Safety. *Can J Cardiol.* 2014, DOI: 10.1016/j.cjca.2014.04.022
- Acuff RV, Cai DJ, Dong ZP, Bell D. The lipid lowering effect of plant sterol ester capsules in hypercholesterolemic subjects. *Lipids Health Dis.* 2007, 6 (11).
- Adcox, C, Boyd, L, Oehrl, L, Allen, J, Fenner, G. Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophage-derived cell lines. *J Agric Food Chem.* 2001, 49 (4), 2090-95.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Determination of Campesterol, Stigmasterol, and beta-Sitosterol in Saw Palmetto Raw Materials and Dietary Supplements by Gas - Chromatography: Single-Laboratory Validation. *J AOAC Int.* 2006, 89 (1), 22-34.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2010. Disponível em: http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf Acesso em: maio 2014.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 994.10 for "Cholesterol in Foods. 1995 AOAC International, Gaithersberg (USA).
- Bacchetti T, Masciangelo S, Bicchiega V, Bertol EI, Ferretti G. Phytosterols, phytostanols and their esters: from natural to functional foods – Review. *Med J Nutrition Metab.* 2011, 4 (3), 165-72
- Baskar AA, Ignacimuthu S. Paulraj GM, Al-Numair KS. Chemopreventive potential of β -Sitosterol in experimental colon cancer model: an In vitro and In vivo study. *BMC Complem Altern M.* 2010, 10 (24).
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. Coffee, tea, cocoa. *Food Chem.* 2009, 4, 938-51.
- Biedermann, M., Konrad, G., Mariani, C. Transesterification and on-line LC-GC for determining the sum of free and sterified sterols in edible oils and fats. *Fat Sci Technol.* 1993, 95 (4), 127-33.
- Bonfilio R, Cazedey ECL, Araújo MB, Salgado HRN. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: A practical approach. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2012, 42 (1), 87-100.

- Borém FM, Coradi PC, Saath R, Oliveira JA. Qualidade do café natural e despulpado após a secagem em terreiro e com altas temperaturas. *Ciênc. Agrotec.* 2008, 32 (5), 1609-15.
- Botelho PG, Galasso M, Dias V, Mandrioli M, Lobato LP, Rodriguez-Estrada MT, Castro IA. Oxidative stability of functional phytosterol-enriched dark chocolate. *Food Sci Technol.* 2014, 55 (2), 444–51.
- Bradford G, Awad B. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res.* 2007, 51 (2), 161-70.
- Brasil – ANVISA. Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em julho/2008. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_allega.htm Acesso em: maio 2014.
- Brasil – ANVISA. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. Diário Oficial da União, Brasília.
- Brasil – ANVISA. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para café, cavada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Diário Oficial da União, Brasília.
- Brasil – ANVISA. Resolução RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão. Diário Oficial da União, Brasília.
- Brasil – ANVISA. Resolução RDC nº. 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Diário Oficial da União, Brasília.
- Brufau G, Canela AM, Rafecas M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutr Res.* 2008, 28 (4), 217-25.
- Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis.* 2009, 203 (1), 18-31.
- Chen ZY, Ma KY, Liang YT, Peng C, Zuo YY. Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. *Journal of Functional Foods*, 2011, 3 (2), 61-9.
- Choi JM, Lee EO, Lee HJ, Kim KH, Ahn KS, Shim BS, Kim NI, Song MC, Baek NI, Kim SH. Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L and its antiangiogenic activities. *Phytother Res.* 2007, 21 (10), 954–59.
- Codex Alimentarius Commission. Codex General Standard for Named Vegetable Oils, Codex Stan 210-1999. 2011.
- Collins CH, Braga GL, Bonato P. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p
- Coss, JL, Kutney JP, Milanova RK, Jollez P. Process of purifying phytosterols from woody or plant-derived sources and compositions resulting therefrom. 2000, WO0064921.
- Dangour AD, Dodhia SK, Hayter A, Allen E, Lock K, Uauy R. Nutritional Quality of Organic Foods: A Systematic Review. *Am J Clin Nutr.* 2009 doi: 10.3945/ajcn.

- Davis Jr HR, Altmann SW. Niemann–Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim Biophys Acta*. 2009, 1791 (7), 679–83
- De Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J Nutr Biochem*. 2003; 14 (7):362-69.
- Devlin TM. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*, 6ª Edição. São Paulo. Editora Blucher, 2007.
- Demonty I, Ras RT, Van der Knaap HCM, Duchateau GSMJE, Meijer L, Zock JM, Trautwein EA. Continuous dose–response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J Nutr*. 2009, 139 (2), 271–84.
- Derewiaka D, Obiedzinski M. Phytosterols oxides content in selected thermally processed products. *Eur Food Res Technol*. 2012, 234 (4), 703–12.
- Dionisi F, Golay PA, Aeschlimann JM, Fay LB. Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: methods comparison and validation. *J. Agric. Food Chem*. 1998, 46 (6), 2227-33.
- Dutta PC, Eskin MNA, Appelqvist LA. Formation, analysis and health effects of oxidized sterols in frying fats. In: *Deep frying: chemistry, nutrition and practical applications*. AOAC Press. 2006, 111-64.
- Dutta PC. Phytosterols as functional food components and nutraceuticals. Nova Iorque, Editora: Marcel Dekker. 2004
- Dutta PC. Studies on phytosterol oxides II. Content in some vegetable oils and in French fries prepared in these oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc*. 1997, 74 (6), 659-66.
- Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, Hubbard VS, de Jesus JM, Houston Miller N, Lee I-M, Lichtenstein AH, Loria CM, Millen BE, Nonas CA, Sacks FM, Smith SC Jr, Svetkey LP, Wadden TW, Yanovski SZ. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014; 129 (2), 76–99.
- Ellegard HL, Andersson SW, Normen LA. Dietary plant sterols and cholesterol metabolism. *Nutr Rev*. 2007, 65 (1) 39-45.
- Embrapa – Árvore do conhecimento – Milho 2010. Processamento. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fdyq37cx02wx5a900e1qe5b1sjh62.html> Acesso em: maio 2014.
- Embrapa – Árvore do Conhecimento – Trigo - http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000gqirlwnqt02wx5ok05vadr1qrnof0m.html Acesso em: maio 2014.
- Embrapa – Árvore do conhecimento – Amido de milho - <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fdyq37cz02wx5a900e1qe5iy19bqd.html> Acesso em: maio 2014.
- Esche R, Barnsteiner A, Scholz B, Engel KH. Simultaneous analysis of free phytosterols/-stanols and intact phytosteryl/stanyl fatty acid and phenolic acid esters in cereals. *J Agric Food Chem*. 2012, 60 (21), 5330-9.
- Eussen S, Klungel O, Garssen J, Verhagen H, van KranenH, Van LoverenH, RompelbergC. Support of drug therapy using functional foods and dietary supplements: focus on statin therapy. *Br J Nutr*. 2010, 103 (9), 1260-77.
- FAO – Phytosterols, phytostanols and their esters. *JECFA Monographs* 5. 2008.
- Farah A, Monteiro MC, Calado V, Franca AS, Trugo LC. Correlation between cup quality and chemical attributer of Brazilian coffee. *Food Chem*. 2006, 98 (2), 373-380.

- Fernandes P, Cabral JMS. Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresour Technol.* 2007, 98 (12), 2335-50.
- Ferreti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Bicchiega V. Effect of phytosterols on copper lipid peroxidation of human low-density lipoproteins. *Nutrition.* 2010, 26 (3), 296-04.
- Foley D, O'Callaghan Y, O'Brien N, McCarthy FO, Maguire AR. Synthesis and characterization of stigmasterol oxidation products. *J Agric Food Chem.* 2010, 58 (2), 1165-73.
- Garcia-Llatas G, Rodriguez-Estrada MT. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chem Phys Lipids.* 2011, 164 (6), 607-24.
- Grandgirard A, Martine L, Demaison L, Cordelet C, Joffre C, Berdeaux O, Semon E. Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *Brit J Nutr.* 2004, 91 (1), 101-06.
- Gul MK, Amar S. Sterols and the phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Cell Mol Biol.* 2006, 5, 71-79.
- Hans JH, Yang YX, Feng MY. Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. *Biomed Environ Sci* 2008, 21 (6) 449-53.
- Hayes KC, Pronczuk A, Wijendran V, BeerFree M. Phytosterols effectively reduce plasma and liver cholesterol in gerbils fed cholesterol. *J. Nutr.* 2002, 132 (7), 1983-88.
- IBGE. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil.* 2010.
- Ifere GO, Barr E, Equan A, Gordon K, Singh UP, Chaudhary J, Igietseme J, Ananaba G. Differential effects of cholesterol and phytosterols on cell proliferation, apoptosis and expression of a prostate specific gene in prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev.* 2008, 32 (4), 319-32.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Relatório sobre análise do teor de cafeína em produtos descafeinado. 2012. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/produtos_descafeinados.pdf Acesso em: maio 2014.
- Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 2008. Edição digital. São Paulo.
- International Coffee Organization. The Story of Coffee. Disponível em: http://www.ico.org/coffee_story.asp Acesso em: maio 2014.
- International Coffee Organization. Trade Statistics - Total production of exporting countries. Disponível em: <http://www.ico.org/prices/po.htm> Acesso em: maio 2014.
- Johnson L. *Phytosterol oxidation products: formation, analysis and occurrence.* Tese (Doutorado). Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2004. 58 p.
- Johnson RB, Dutta PC. Characterization of side-chain oxidation products of sitosterol and campesterol by chromatographic and spectroscopic methods. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 2003, 80 (8), 767-76.
- Johnson RB, Dutta PC. Determination of phytosterol oxides in some food products by using an optimized transesterification method. *Food Chem.* 2006, 97 (4), 606-13.
- Johnson RB, Dutta PC. Separation of phytosterol oxidation products by combination of different polarity gas chromatography capillary columns. *J. Chromatogr. A.* 2005, 1064 (2), 213-17.

- Jones PJ, Abumweis SS. Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009, 12 (2), 147–51
- Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc*. 2003, 78 (8), 965-78.
- Koschutnig K. Safety assessment of phytosterol oxidation products. Tese (Doutorado em Ciências Naturais), Universitat Wien, Viena, 2009.
- Kritchevsky D, Chen SC. Phytosterols – health benefits and potential concerns: a review. *Nutr Res*. 2005, 25 (5), 413-28.
- Lampi AM, Juntunen L, Toivo J, Piironen V. Determination of thermo-oxidation products of plant sterols. *J. Chromatogr B*. 2002, 777 (1-2), 83-92.
- Lampi AM, Toivo J, Hovi RL, Piironen V. Stability of plant sterols and formation of oxidation products in oils during heating. *J. Food Sci*. 2000, 18, 208-209.
- Law M. Plant sterol and stanol margarines and health. *Br Med J*. 2000, 320 (7238), 861–64.
- Lima AR, RGFA, Abrahão AS, Duarte SMS, Paula FBA. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante *in vitro* e do café verde e torrado. *Quim Nova*. 2010,33 (1), 20-24.
- Mackay DS, Jone PJH. Phytosterols in human nutrition: Type, formulation, delivery, and physiological function. *Eur Lipid Sci. Technol*. 2011, 113 (12), 1427–32.
- Malta MR, Chagas SJR. Avaliação de compostos não voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. *Acta. Sci. Agron*. 2009. 31 (1), 57-61.
- Marangoni F, Poli A. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol Res*. 2010. 61 (3), 193-96.
- Mazzafera P, Gonçalves K, Shimizu MM. Extração e dosagem da atividade da polifenoloxidase do café. *Scientia Agrícola*. 2002, 59 (4), 695-700.
- Monteiro MAM, Minin VPR, Silva AF, Chaves JBP, Cardello HMAB. Perfil sensorial da bebida café (*Coffea arabica* L.) determinado por análise tempo-intensidade. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2005, 25 (4), 772-80.
- Monteiro MC, Trugo LC. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim. Nova*. 2005, 28 (4), 637-41.
- Moraes RCP, Trugo LC. Efeito da torrefação e da granulometria na composição química do café. 2001. Disponível em: http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/537/155585_Art209f.pdf?sequence=1 Acesso em: maio 2014.
- Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res*. 2002, 41 (6), 457-500.
- Moreno-Calvo E, Temelli F, Cordoba A, Masciocchi N, Veciana J, Ventosa N. A New Microcrystalline Phytosterol Polymorph Generated Using CO₂-Expanded Solvents. *Cryst. Growth Des*. 2014, 14 (1), 58–68.
- Musa-Veloso K, Poon TH, Elliot JA, Chung C. A comparison of the LDL-cholesterol lowering efficacy of plant stanols and plant sterols over a continuous dose range: results of a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011, 85 (1), 9–28.

Mussatto SI, Machado EMS, Martins S, Teixeira JA. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol.* 2011, 4 (5), 661–72.

Nascimento EAN; Aquino FJT, Nascimento PM, Chang R, Morais SAL. Composição química do café conillon em diferentes graus de torração. *Ciência & Engenharia.* 2007, 16, 17-21.

National Cholesterol Education Program. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA.* 2001, 285 (19), 2486–97.

Neves C. A estória do café. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 1974.

Normén L; Brygelson S; Johnsson M; Dutta P. The phytosterols contents some cereal foods commonly consumed in Sweden and in the Netherlands. *J. Food Comp. Anal.* 2002, 15 (6), 693-704.

O'Callaghan Y, McCarthy FO, O'Brien NM. Recent advances in Phytosterol Oxidation Products. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 2014, 446 (3), 786 – 91.

Oehrl L, Hansen AP, Rohrer CA, Fenner L.B. Oxidation of phytosterol in a test food system. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 2001, 78 (11), 1073-78.

Ortega RM, Palencia A, Lopez-Sobaler AM. Improvement of cholesterol levels and reduction of cardiovascular risk via the consumption of phytosterols. *Br J Nutr.* 2006, 96 (1), 89–93.

Ostlund RE, Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22, 533-49.

Paillard F, Bruckert E, Picard P, van Ganse E. Cardiovascular risk and lifestyle habits of consumers of a phytosterol-enriched yogurt in a real-life setting. *J Hum Nutr Diet.*, 2014, doi: 10.1111/jhn.12236

Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syva M, Scholte Op Reimer W, Vrints C, Wood D, Zamorano J, Zannad F. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical. *Eur. Heart J.* 2012, 33, 1635–01.

Phillips KM, Ruggio DM, Toivo JI, Swank MA, Simpkins AH. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J Food Comp Anal.* 2002, 15 (2), 123-42.

Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric.* 2000, 80 (7), 939-66.

Pimenta CJ, Chalfoun SM, Pereira MC, Angelico CL, Tavares LS, Martins R. Avaliação físico-química e de qualidade do café (*Coffea arabica* L.) submetidos a diferentes tempos de espera para secagem. *Rev Bras de Armazenamento.* 2009, 10 (6), 36-41.

Pimenta CJ, Vilela VR, Carvalho Junior C. Componentes de parede celular de grãos de frutos de café (*Coffea arabica* L.) submetidos a diferentes tempos à espera da secagem. *Acta. Sci. Agron.* 2004, 26 (2), 203-09.

Plumb JA, Rhodes MJC, Lampi AM, Buchgraber M, Kroon PA. Phytosterols in plant foods: Exploring contents, data distribution and aggregated values using an online bioactives database. *J of Food Compos Anal.* 2011, 24 (7), 1024-31.

Prado SPT, Franco AR, Souza L, Oliveira MA, Correia M. Contaminação por matérias estranhas e microrganismos em farináceos comercializados em Ribeirão Preto. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2005, 64 (2), 237-44.

- Quílez J, Garcia-Lorda P, Salas-Salvadó J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clinical Nutrition*, 2003, 22 (4), 343-51.
- Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011, 32 (14), 1769-818.
- Reiner Z. Combined therapy in the treatment of dyslipidemia. *Fundam Clin Pharmacol*, 2010, 24 (1), 19-28.
- Resende O, Siqueira VC, Arcanjo VR. Influência do pavimento de terreiros na secagem e na qualidade do café conilon. *Glob. Sci. Technol*. 2009, 3 (5), 26-37.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova*. 2004, 27(5), 771-80.
- Ribeiro APB, Moura JLN., Grimald IR Gonçalves LAG. Interesterificação Química: alternativa para obtenção de gorduras zero trans. *Quím Nova*. 2007, 30 (5), 1295-300.
- Ribeiro JS, Augusto F, Salva TJ, Thomaziello RA, Ferreira MM. Prediction of sensory properties of Brazilian Arabica roasted coffees by headspace solid phase microextraction – gas chromatography and partial least squares. *Anal Chim Acta*. 2009, 634 (2), 172-9.
- Rocha M, Bañuls c, Bellod L, Jover A, Victor M, Hernández-Mijares A. A Review on the Role of Phytosterols: New Insights into Cardiovascular Risk. *Curr Pharm Des*. 2011, 17 (36), 4061-75
- Rodrigues JN, Mancini Filho J, Torres RP, Gioielli LA. Caracterização físico-química de creme vegetal enriquecido com ésteres de fitoesteróis. *Rev Bras Cienc Farm*. 2004, 40 (4), 505-20.
- Rozner S, Garti N. The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids Surf A*. 2006, 282-83, 435–456.
- Rudkowska I. Plant sterols and stanols for healthy aging. *Maturitas*, 2010, 66 (2), 158-62.
- Ryan, E., McCarty, F.O., Maguire, A. R., O'Brien, N. M. Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence, and biological effects. *Food Rev Int*. 2009, 25 (2), 157-74
- Saldanha T, Sawaya ACF, Eberlin MN, Bragagnolo N. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of UV, RI and APCI-MS detectors. *J. Agric. Food Chem*. 2006, 54 (12), 4107-13.
- Santos MA, Chalfoun SM, Pimenta CJ. Influência do processamento por via úmida e tipos de secagem sobre a composição físico-química e química do café (*Coffea arabica* L.). *Ciênc. Agrotec*. 2009, 33 (1), 213-18.
- Santos MH, Batista BL, Duarte SMS. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café. *Quim. Nova*, 2007, 30 (3), 604-610.
- Saynajoki S, Sundberg S, Soupas L, Lampi AM, Piironen V. Determination of stigmasterol primary oxidation products by high-performance liquid chromatography. *Food Chem*. 2003, 80 (3), 415-21.
- SCAA - Specialty Coffee Association of America. Protocolo para análise sensorial de café metodologia SCAA. 2008. Disponível em <http://www.scaa.org> Acesso em: maio 2014.

- Scheuer PM, Francisco A de, Miranda MZ, Limberger VM. Trigo: características e utilização na panificação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 2011, 13 (2), 211–22.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. 2007, 88 (1).
- Soupas L, Huikko L, Lampi AM, Piironen V. Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *Eur. Food Res*. 2006, 222 (3-4), 266-73.
- Soupas L, Huikko L, Lampi AM, Piironen V. Pan-frying may induce phytosterol oxidation. *Food Chem*. 2007, 101 (1), 286-97.
- Soupas L, Juntunen L, Lampi AM, Piironen V. Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. *J. Agric. Food Chem*. 2004, 52 (21), 6485-91.
- Sturm GM, Coser SM, Senra JFB, Ferreira MFS, Ferreira A. Qualidade sensorial de café conilon em diferentes altitudes. *Enciclopédia Biosfera*. 2010, 11, 1-7.
- Swartz ME, Krull IS. Validação de métodos cromatográficos. *Pharm. technol*. 1998, 2 (3), 12-20.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother*. 2003, 57 (8), 321-25.
- Thomsen AB, Hansen HB, Christiansen C, Green H, Berger A. Effect of free plant sterols in low-fat milk on serum lipid profile in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2004, 58 (6), 860–70.
- Toci A, Farah A, Trugo LC. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. *Quim Nova*. 2006, 29 (5), 965-971
- Toivo J, Piironen V, Kalo P, Varo P. Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid-phase extraction in sample preparation. *Chromatographia*. 1998, 48 (11), 1–6.
- Vergés B. Les Phytostérols: quels bénéfices? Quels risques? *Medecine dès maladies. Métaboliques*. 2009, 3 (6), 589-93.
- Verleyen T, Forcades M, Verhea R, Dewettinck K, Huyghebaert A, Greyt W. Analysis of Free and Esterified Sterols in Vegetable Oils. *JAOCs*. 2011, 79, 117–22
- Vilas Boas BM, Licciardi R, Moraes AR, Carvalho VD. Seleção de extratores e tempo de extração para determinação de açúcares em café torrado. *Ciênc. Agrotec*. 2001, 25 (5), 1169-73.
- Wasowicz E, Rudzinska M. Cholesterol and Phytosterols. In: Sikorski ZE, Kolakowska A. *Chemical, Biological and Functional Aspects of Food Lipids*. 2 ed. Boca Raton. CRC. 2011, 113-131.
- Weihrauch JL, Gardner JM. Sterol content of foods plant origin. *J Am Diet Assoc*. 1978, 73 (1), 39–47.
- Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJH. Anticancer effects of phytosterols. *Eur J Clin Nutr*. 2009, 63, 813-20.
- Xu GH, Sun JL, Liang YT, Yang C, Chen ZY. Interaction of fatty acids with oxidation of cholesterol and beta-sitosterol. *Food Chem*. 2011, 124 (1), 162-70.
- Yankah VV. Lipids phytosterols and human health. In: Akoh CC. *Handbook of functional lipids*. New York: CRC, 2006, 403–18.

CURRICULO LATTES ELIZABETH APARECIDA FERRAZ DA SILVA TORRES

Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9804923403746874>

Última atualização do currículo em 22/06/2014

Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres concluiu o Doutorado em Ciência dos Alimentos (São Paulo, SP) pela Universidade de São Paulo, em 1988. Foi Visiting Scholar na MSU de 1986 a 1987, como bolsista Fulbright Comission. Professora Associada - desde 2000 na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Associado 3 desde 2013. Publicou 92 artigos em periódicos especializados e 126 trabalhos em anais de eventos. Possui 5 livros publicados, 1 processo, 1 software e 1 patente técnica além de outros 30 itens de produção técnica. Participou de 17 eventos no exterior e 87 no Brasil. Supervisionou 3 pós-doutores com bolsa da FAPESP e supervisionou um Jovem Pesquisador com auxílio e bolsa da FAPESP. Orientou 24 dissertações de Mestrado, 16 teses de Doutorado e co-orientou 1 tese de Doutorado, em complemento orientou 24 trabalhos de Iniciação Científica nas áreas de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nutrição e Saúde Coletiva. Vários AT foram treinados. Recebeu 6 Prêmios/Homenagens. Atua diretamente na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos com ênfase em quatro linhas de pesquisa: 1) Lipídios, ácidos graxos, colesterol, fitoesterol e seus produtos de oxidação. 2) Antioxidantes e substâncias bioativas. 3) Carnes, Aves e Pescados 4) Microsossomos, Lipossomos e Sistemas Modelo. Em suas atividades profissionais, interagiu com 165 colaboradores em co-autorias de trabalhos científicos. Em seu CVLattes, os termos mais frequentes na contextualização da produção científica, tecnológica e artístico cultural, são: aulas ministradas, comissões, grupos de trabalho, valor nutricional, segurança alimentar, lipídios, qualidade higiênico sanitária, substitutos de gordura, alimentos funcionais e tecnologia de alimentos. Em 29/05/2014 apresentou fator H=12 na base SCOPUS - ID 243086900 e ResearcherGate 22.39 (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres
Nome em citações bibliográficas	TORRES, E. A. F. S.;Torres, Elizabeth Aparecida Ferraz Da Silva;Torres, Elizabeth A. F. S.;Elizabeth Aparecida F.S. Torres;Torres, Elizabeth Aparecida F.S.;Elizabeth A. F. da S. Torres

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. Av. Dr. Arnaldo, 715 HNT Cerqueira César 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617857 Fax: (11) 30617130 URL da Homepage: www.fsp.usp.br/~veatorres/
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2000	Livre-docência. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Teor de Lipídios em Alimentos e sua importância na Nutrição, Ano de
-------------	---

CURRICULO LATTES FERNANDA PERIDES AKAISHI

Fernanda Perides Akaishi

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4348817613275269>

Última atualização do currículo em 22/06/2014

Formada em Nutrição pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (2012). Desde março de 2012 ingressou no mestrado pelo Programa de Pós Graduação de Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Tem experiência em Nutrição, atuando principalmente nos seguintes temas: fitosteróis, óleos, café, ácidos graxos, óxidos de colesterol e cromatografia. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Fernanda Perides Akaishi
Nome em citações bibliográficas AKAISHI, F. P.

Endereço

Endereço Profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
 Avenida Doutor Arnaldo, 715
 Cerqueira Cesar
 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil
 Telefone: (11) 30617748
 URL da Homepage: <http://www.fsp.usp.br>

Formação acadêmica/titulação

2012 Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública.
 Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo.
 Título: Avaliação do Teor de Fitosteróis em Alimentos Consumidos pela população de São Paulo, Orientador: Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres.
 Palavras-chave: Fitosteróis; Cromatografia Gasosa; Café; Margarina; Farináceos.
 Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.

2007 - 2012 Graduação em Nutrição.
 Faculdade de Saúde Pública-USP.