UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Estabilidade Oxidativa do Colesterol em
Ovo Integral em Pó e em Macarrão Contendo Ovos
Medida Através do 7-cetocolesterol Livre**

Claudia Escarabajal

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho

São Paulo
2004

Claudia Escarabajal

Estabilidade Oxidativa do Colesterol em
Ovo Integral em Pó e em Macarrão Contendo Ovos
Medida Através do 7-cetocolesterol Livre

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

Dedicatória

Aos meus pais por todo incentivo, carinho e apoio nos momentos que mais precisei.

Ao Adriano, pelo companheirismo e por toda ajuda direta e indireta na realização do meu trabalho.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Dr Alfredo Tenuta Filho, pela disposição, interesse e orientação na realização do projeto.

A coordenadora do Curso de Pós-Graduação, Professora Dra Bernadette D.G. Melo Franco, pela oportunidade de superação profissional.

A todas as pessoas que participaram direta e indiretamente, facilitando o desenvolvimento do projeto.

A CAPES pela bolsa de estudo.

Muito Obrigado

Resumo

O ovo é importante como alimento e matéria-prima industrial. O ovo é rico em colesterol que, por sua vez, está sujeito à oxidação, formando-se óxidos tóxicos. O presente trabalho teve como objetivos, a avaliação da formação do 7-cetocolesterol livre em ovo integral em pó e em macarrão contendo ovos, e a verificação da estabilidade oxidativa do colesterol, em ovo integral em pó, durante a estocagem, e em macarrão contendo ovos, em função do cozimento que antecede o consumo. Para tais propósitos foram analisadas cinco marcas de ovo integral em pó, adquiridas de indústrias produtoras e/ou fornecedores, estando dentro do prazo de validade (6 meses). Para a avaliação da estabilidade oxidativa do colesterol em ovo integral em pó, foi selecionada uma das cinco marcas analisadas, em três lotes, com 7 a 15 dias de fabricação, e estocada à temperatura ambiente por 224 dias. Onze marcas de macarrão contendo ovos foram obtidas comercialmente, estando dentro do prazo de validade (2 anos) e analisadas, sendo duas delas selecionadas para a avaliação da estabilidade oxidativa do colesterol em função do cozimento. A metodologia para a determinação do 7-cetocolesterol livre consistiu na extração dos lípides totais, separação em coluna de Florisil, e a determinação por *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Os resultados de 7-cetocolesterol em ovo integral em pó variaram de 63,74 a 112,80 µg/g de lípides; em macarrão contendo ovos, de 30,49 a 157,25 µg/g de lípides. O emprego do 7-cetocolesterol livre não permitiu indicar com clareza a oxidação do colesterol em ovo integral em pó durante a estocagem. Uma correlação estatisticamente significativa ($r = 0,8093$) foi verificada entre os resultados encontrados para o 7-cetocolesterol livre e as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico - TBARS-, durante a estocagem. O colesterol do macarrão contendo ovos aparentemente foi afetado oxidativamente em função do tratamento térmico, (estatisticamente não-significativos), sugerindo estudos adicionais para melhor avaliar a estabilidade do colesterol nestas condições.

Summary

Egg is important as food and industrial raw material. It is rich in cholesterol, which, in turn, is subjected to oxidation. Forming toxic oxides. The present work had as objectives the evaluation of the formation of the free 7-ketocholesterol in whole egg powder and in pasta containing eggs, and the verification of the oxidative stability of cholesterol in whole egg powder during the storage, and in pasta containing eggs as a function of pre-consumption cooking. For such purposes, sample of five brands of whole egg powder within their validity period (6 months) donated by industries and/or suppliers and analyzed. For the evaluation of oxidative stability of cholesterol in whole egg powder, one of the five analyzed brands was split into three lots within 7-15 days from manufacture and stored at room temperature for 224 days. Samples of eleven brands of pasta produced with eggs within their validity period (2 years) purchased at the local commerce and analyzed. Two brands out of the eleven were selected and evaluated concerning cholesterol oxidative stability after cooking. The method for the determination of free 7-ketocholesterol consisted of total lipid extraction, separation through Florisil column and determination for High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results of free 7-ketocholesterol ranged from 63.74 to 112.80 μ g/g of lipids in whole egg powder and from 30.49 to 157.25 μ g/g of lipids in pasta produced with eggs. The use of free 7-ketocholesterol did not permit to clearly indicate cholesterol oxidation in whole egg powder during storage. The statistically significant correlation ($r = 0.8093$) between the results for free 7-ketocholesterol and the substances that react with thiobarbituric acid - TBARS - during storage was observed. In pasta produced with eggs, cholesterol apparently was oxidized after thermal treatment, (not statistically significant), thus suggesting further studies to better evaluate cholesterol stability under these conditions.

Índice

1. Introdução.....	2
2. Revisão da Literatura.....	4
2.1. Oxidação do colesterol.....	4
2.1.1. Autooxidação.....	5
2.1.2. Peroxidação lipídica.....	7
2.1.3. Oxidação fotoquímica.....	9
2.2. Efeitos biológicos de óxidos de colesterol.....	9
2.3. Estabilidade oxidativa do colesterol em ovo.....	14
2.3.1. Conteúdo de colesterol em ovo integral, ovo integral em pó, gema de ovo e gema de ovo em pó.....	14
2.3.2. Óxidos de colesterol em ovo integral, ovo integral em pó, gema de ovo e gema de ovo em pó.....	15
2.3.3. Efeito do processamento e/ou estocagem do ovo sobre a estabilidade oxidativa do colesterol.....	17
2.4. Estabilidade oxidativa do colesterol em macarrão contendo ovos.....	19
2.4.1. Conteúdo de colesterol em macarrão.....	19
2.4.2. Ocorrência de 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos.....	20
3. Objetivos.....	22
4. Material e Métodos.....	24
4.1. Reagentes.....	24
4.2. Amostras.....	24
4.3. Estabilidade oxidativa do colesterol em ovo integral em pó durante a estocagem.....	24
4.4. Estabilidade oxidativa do colesterol em macarrão contendo ovos após o cozimento.....	25
4.5. Lípides totais e umidade.....	25
4.6. Quantificação de colesterol e 7-ceto segundo Csallany et al. (1989) com saponificação a frio prévia, de acordo com Chen, Chen (1994) e Sander et al. (1989).....	26
4.6.1. Extração lipídica.....	26
4.6.2. Saponificação a frio segundo Chen, Chen (1994) e Sander et al. (1989).....	26
4.6.3. Quantificação.....	26
4.6.4. Teste de recuperação.....	27

4.7. Quantificação de 7-cetocolesterol livre segundo Csallany et al. (1989) com separação prévia em fase sólida (Penazzi et al., 1995).....	27
4.7.1. Extração lipídica	27
4.7.2. Separação em fase sólida	28
4.7.3. Quantificação.....	28
4.7.4. Teste de recuperação	28
4.7.5. TBARS.....	28
4.8. Análise estatística	28
5. Resultados e Discussão	30
5.1. Validação do método de quantificação do colesterol e 7-cetocolesterol livre.....	30
5.2. Ocorrência do 7-cetocolesterol livre em ovo integral em pó.....	33
5.3. Avaliação da estabilidade oxidativa do colesterol em ovo integral em pó	35
5.4. Ocorrência de colesterol e 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos.....	39
5.5. Avaliação da estabilidade oxidativa do colesterol em macarrão contendo ovos.....	43
6. Conclusões	46
7. Referências Bibliográficas	48

Lista de Figuras

Figura 1: Molécula de colesterol (Paniangvait et al., 1995)	4
Figura 2: Formação de óxidos de colesterol comumente encontrados em alimentos (Paniangvait et al., 1995).....	6
Figura 3: Representação entre os resultados de 7-cetocolesterol livre ($\mu\text{g/g}$ de lípidos) e TBARS (mg de AM/Kg), observados durante a estocagem do ovo integral em pó em até 224 dias.	37

Lista de Tabelas

Tabela 1: Umidade, proteína, carboidratos, lípides, colesterol e calorias de ovo e gema de ovo integrais e em pós, e a composição da fração lipídica da gema de ovo (a).....	14
Tabela 2: Quantidades de colesterol em alguns alimentos de origem animal (mg/100g) (a)	15
Tabela 3: Recuperação do 7-cetocolesterol (μg) submetido à saponificação.....	30
Tabela 4: Recuperação do 7-ceto ($\mu\text{g/g}$ de lípides) adicionado à matriz gema de ovo em pó, em função do tempo de saponificação.....	30
Tabela 5: Limites de detecção (LD), de quantificação (LQ) e linearidade das curvas de calibração, dada pelos coeficientes de determinação (R^2), do colesterol e 7-ceto (a)	32
Tabela 6: Recuperação (%) do 6-cetocolesterol (padrão interno), colesterol e 7-cetocolesterol livre, adicionados ao ovo integral em pó e ao macarrão contendo ovos	32
Tabela 7: Valores encontrados de colesterol em ovo integral em pó, em base seca	33
Tabela 8: 7-cetocolesterol livre, TBARS , lípides totais (base seca) e umidade , em três lotes diferentes de cinco marcas de ovo integral em pó. 34	
Tabela 9: Teores de 7-cetocolesterol livre (*) e 7-cetocolesterol total (**) em ovo integral em pó relatados na literatura.....	35
Tabela 10: Teores de 7-cetocolesterol livre ($\mu\text{g/g}$ de lípides) em ovo integral em pó estocado à temperatura ambiente, em até 224 dias.....	36
Tabela 11: Teores de TBARS (mg AM/Kg) em ovo integral em pó estocado à temperatura ambiente, até 224 dias, em base seca	36
Tabela 12: Umidade e lípides totais (g/100g) em ovo integral em pó, estocado à temperatura ambiente.	38
Tabela 13: Colesterol e 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos, em base seca.....	41
Tabela 14: Lípides totais (base seca) e umidade na amostra de macarrão contendo ovos.	42
Tabela 15: 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos em base seca, não-cozido e cozido.	43

Lista de abreviaturas e siglas

OsC = Óxidos de colesterol

7 α -OH = 7 α -hidroxicolesterol

7 β -OH = 7 β -hidroxicolesterol

7-ceto = 7-cetocolesterol

5,6 α -epóxido = colesterol-5,6 α -epóxido

5,6 β -epóxido = colesterol-5,6 β -epóxido

25-OH = 25-hidroxicolesterol

20-OH = 20-hidroxicolesterol

Triol = Colestanotriol

HMG-CoA redutase = Hidroximetilglutaril-CoA redutase

LDL = Lipoproteínas de baixa densidade

HDL = Lipoproteínas de alta densidade

CNNPA-MS = Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, do
Ministério da Saúde

DINAL-MS = Divisão Nacional de Alimentos do Ministério da Saúde

UN.I.P.I. = Unione Industriali Pastai Italiani

Luz UV = Luz Ultravioleta

HPLC = High-performance liquid Chromatographic

TBARS = Substâncias que Reagem com o Ácido Tiobarbitúrico

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

r = Coeficiente de correlação

M = Média

DV = Desvio-padrão

CV = Coeficiente de variação

p = Nível de significância

Lista de símbolos

KOH = hidróxido de potássio

$^1\text{O}_2$ = oxigênio singlete

$^3\text{O}_2$ = oxigênio triplete

O_3 = ozônio

NO_x , NO, NO_2 = óxidos de nitrogênio

Introdução

1. Introdução

Os estudos sobre a oxidação do colesterol em alimentos têm sido motivados principalmente pelas características biológicas de óxidos formados, que interferem na morfologia e função da membrana celular, inibem a biossíntese do próprio colesterol e são aterogênicos, citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. A oxidação do colesterol é favorecida pelo oxigênio atmosférico, radiação, temperatura, radicais livres, íons metálicos, além de outros fatores, que podem estar presentes durante o processamento e na estocagem de alimentos.

O ovo é importante como alimento e também como matéria-prima industrial. O seu conteúdo em colesterol é um dos mais elevados entre os alimentos, 300 a 450mg/100g. O processo de obtenção do ovo integral em pó ou gema em pó é feito por atomização, concentrando os teores de colesterol, 928 a 1918mg/100g.

Em geral é considerado que em alimentos frescos não são detectados óxidos de colesterol (OsC) e que sua ocorrência pode se dar durante o processamento (doméstico inclusive) e/ou estocagem.

Os produtos desidratados de ovos são extensivamente utilizados como matéria-prima para outros alimentos de largo consumo, como o macarrão, em razão de suas propriedades funcionais e nutricionais. No presente caso, existe a possibilidade de oxidação do colesterol durante a obtenção e armazenamento de ovo integral ou gema em pó, na produção e estocagem do macarrão contendo ovos e, ainda, como consequência do preparo deste último para o consumo.

Evidentemente é oportuno que questões como estas sejam elucidadas através de estudos específicos. Neste trabalho o ovo integral em pó e o macarrão contendo ovos foram estudados em relação a esta problemática.

Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1. Oxidação do colesterol

O colesterol está sujeito à oxidação. Sua estrutura química é formada por núcleos policíclicos (ciclopentano-per-hidrofenantreno) com quatro anéis fundidos entre si e uma cadeia alifática ramificada a partir do carbono 17 (C-17). Um grupamento hidroxila está fixado ao C-3, no anel A, e entre os carbonos 5 e 6, no anel B, ocorre uma dupla ligação (Maerker, 1987) (Figura 1).

Figura 1: Molécula de colesterol (Paniangvait et al., 1995)

O C-4 (anel A) e C-7 (anel B) estão no mesmo plano e possuem igual oportunidade de ataque oxidativo, mas é no C-7 a posição mais comum onde se dão as reações de oxidação. O ataque raramente ocorre no C-4 por causa do efeito de proteção vindo do C-3, através do grupo hidroxila, devido sua capacidade de esterificação com os ácidos graxos e alguma afinidade com o meio aquoso, e do grupo triacil substituído no C-5. Os carbonos terciários da cadeia lateral, C-20 e C-25, também são susceptíveis à oxidação (Maerker, 1987; Smith, 1990; 1996).

A oxidação do colesterol pode ser por reações enzimáticas e não-enzimáticas. As enzimáticas ocorrem no organismo; as reações não-enzimáticas em alimentos, pelos processos de autooxidação, peroxidação lipídica ou oxidação fotoquímica (Smith, 1987; 1990; Guardiola et al., 1995).

2.1.1. Autoxidação

O estudo da oxidação não-enzimática do colesterol foi realizado por modelos experimentais, onde o esterol é encontrado na forma cristalina em solução ou dispersão aquosa. As duas últimas são as condições mais próximas na qual o colesterol é encontrado nos alimentos (Guardiola et al., 1995; Smith, 1987; 1990).

O processo de iniciação no qual o colesterol reage com o oxigênio formando o radical livre não está totalmente esclarecido. O radical livre é sensível à oxidação pela molécula do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) ou triplete ($^3\text{O}_2$), por superóxidos, peróxidos, radical hidroxila e ozônio (O_3). A autoxidação é a forma de oxidação do colesterol mais importante e melhor conhecida (Maerker, 1987; Smith, 1987; 1996).

Na maioria dos casos, a autoxidação do colesterol ocorre no C-7 alílico, na dupla ligação (C-5, do anel B), e na cadeia lateral (C-20 e C-25), estando o colesterol no estado sólido. Por outro lado, a oxidação da cadeia lateral não têm sido observada no estado líquido ou em dispersão aquosa (Smith, 1987; Maerker, 1987; Nourooz-Zadeh et al., 1990; Ansari et al., 1994).

A autoxidação quando ocorre no C-7, pela abstração do hidrogênio, forma o colesterol 7-radical, que reage com o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), formando o colesterol 7-radical peroxila. Este último é estabilizado pela fixação de um hidrogênio, formando hidroperóxidos nas posições α e β , sendo o 7 β -hidroperóxido mais estável termodinamicamente que 7 α -hidroperóxido. Os hidroperóxidos α e β , sob aquecimento, formam o 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OH) e 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH) (Smith, 1990; 1996). O 7-cetocolesterol (7-ceto) pode ser formado pela subtração do grupo OH dos 7-hidroperóxidos, por desidratação, ou por desidrogenação do 7 α -OH e 7 β -OH (Smith, 1990; 1996) (Figura 2).

Figura 2: Formação de óxidos de colesterol comumente encontrados em alimentos (Paniangvait et al., 1995)

A epoxidação se dá ao nível da dupla ligação, nos C-5 e C-6, como processo secundário dependente do 7-hidroperóxido ou outros produtos gerados na oxidação, formando os isômeros epóxidos 5,6α- e 5,6β- (Smith, 1987; Maerker, 1987). A autooxidação dos epímeros 5,6α- e 5,6β-epóxido do colesterol são formados no estado cristalino, solução ou dispersão (Maerker, 1987). Por hidratação dos epóxidos dá-se a formação do Triol (Smith, 1987) (Figura 2), um dos óxidos de maior toxicidade.

A autooxidação na cadeia lateral do colesterol ocorre com a participação do colesterol 7-radical, produzindo o colesterol 25-radical que, na presença do oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), concorre para a formação do colesterol 25-hidroperóxido que por aquecimento, transforma-se em 25-hidroxicolesterol (25-OH). Essa reação ocorre igualmente no C-20 (Maerker, 1987) (Figura 2).

2.1.2. Peroxidação lipídica

A autooxidação do colesterol é similar à oxidação que ocorre nos lípides. Pode ser pelo contato com o oxigênio ou devido a altas temperaturas, promovendo uma série de reações envolvendo radicais livres, formando peróxidos e outros produtos de degradação (Maerker, 1987; Smith, 1987).

O colesterol é oxidado por hidroperóxidos ou peróxidos cíclicos, produzidos durante a oxidação dos lípides, formando os mesmos OsC característicos da autooxidação do anel B do colesterol (7α -OH, 7β -OH, 7-ceto, $5,6\alpha$ -epóxido, $5,6\beta$ -epóxido e Triol) (Figura 2) (Guardiola et al., 1995).

Segundo Smith (1987) a oxidação do colesterol em alimentos e em sistemas biológicos pode ser inter ou intramolecular. Na oxidação intermolecular o hidrogênio é extraído do colesterol por radicais oxil e peroxil de ácidos graxos polinsaturados (fosfolípides), iniciando o processo oxidativo. Na oxidação intramolecular, está se dá pelo ataque da porção acil sobre a colesteril, na mesma molécula do éster de colesterila.

Para demonstrar a interação entre os triacilgliceróis e o colesterol, Li et al. (1994) estudaram a estabilidade oxidativa dos triacilgliceróis utilizando óleo de sardinha. Demonstraram que a estabilidade oxidativa estava relacionada com o grau de insaturação dos triacilgliceróis. O acúmulo de OsC coincidia com a diminuição dos ácidos graxos polinsaturados. A redução do grau de insaturação foi efetiva no prolongamento do período de indução da oxidação do colesterol. Após esta fase não foi observado nenhum efeito.

Li et al. (1996) compararam a formação dos OsC em óleos de peixe, girassol e palma, todos adicionados com quantidades conhecidas de colesterol. Após 35 dias de estocagem foi observada maior formação de óxidos no óleo de peixe (133,1µg/g de OsC totais), rico em ácidos graxos polinsaturados, comparado com o de palma (4,1µg/g de OsC totais), rico em ácidos graxos saturados. Para o óleo de girassol foram encontradas 25,5µg/g de OsC totais. A diferença na formação dos OsC foi atribuída aos diferentes graus de insaturação dos triacilgliceróis dos óleos analisados.

Kim, Nawar (1991) avaliaram o efeito dos triacilgliceróis ou ácidos graxos misturados com colesterol puro. Aqueceram (130°C) por períodos variáveis, e observaram que a presença do triacilglicerol, a gordura do leite, o ácido esteárico e o ácido linoleico aceleraram a oxidação do colesterol, sendo que os óxidos produzidos variaram quantitativamente entre os sistemas.

Osada et al. (1993), estudaram o mesmo efeito na formação de OsC na presença de lípides (100°C/24 horas). Observaram que o colesterol era estável e essencialmente não produzia nenhum óxido quando aquecido isoladamente. O colesterol quando adicionado aos lípides tornava-se instável, principalmente se aquecido com os insaturados. Neste caso, o conteúdo de colesterol era reduzido e os óxidos gerados rapidamente.

Ohshima et al. (1993) prepararam amostras de colesterol com triacilgliceróis comparando com o colesterol puro. As amostras foram estocadas à temperatura ambiente (25°C) por 104 dias. Os autores observaram que para o colesterol puro nenhum óxido foi encontrado; nas misturas preparadas, a partir do 24º dia de estocagem ocorria a formação de OsC.

Kim, Nawar (1991), Osada et al. (1993) mencionados anteriormente, e Ohshima et al. (1993), concluíram que a peroxidação lipídica favorece a oxidação do colesterol, sugerindo que o grau de insaturação dos lípides presentes nos alimentos pode influenciar nos tipos de óxidos formados.

2.1.3. Oxidação fotoquímica

A oxidação fotoquímica ocorre quando o colesterol é exposto à luz, na presença de oxigênio, levando à formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), espécie eletronicamente excitada, gerado a partir do oxigênio molecular triplete ($^3\text{O}_2$), produzindo hidroperóxidos que iniciam o processo oxidativo (Smith, 1990).

A oxidação fotoquímica com a participação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) produz hidroperóxidos nos C-5 e C-6. As reações fotosensitizadoras ocorrem em alimentos envolvendo, por exemplo, pigmentos naturais com estrutura porfirínica (clorofilas, mioglobinas) ou flavinas, absorvendo a energia (Smith 1987; 1990). Pode ocorrer também a oxidação fotoquímica no C-7, formando hidroperóxidos que se decompõem dando lugar ao $7\alpha\text{-OH}$ e 7-ceto (Guardiola et al., 1995).

O colesterol presente na pele ou no cabelo exposto à luz e ao ar atmosférico pode ser oxidado fotoquimicamente como nos alimentos, produzindo OsC também a partir do C-5 e C-6 (anel B) (Smith, 1990) (Figura 2).

Van de Bovenkamp et al. (1988) demonstraram, em gema de ovo em pó irradiada com luz UV (254nm), por três semanas, aumento no total de OsC, de 121,8 a 4.151 $\mu\text{g/g}$, quando o produto foi estocado em condições de abuso, por quatro anos, à temperatura ambiente, e então exposto à luz UV. Lugasi et al. (1995) estudaram o efeito da luz UV na peroxidação de lípides. Concluíram que a luz UV gera radicais livres e peróxidos, que decompõem os tocoferóis.

2.2. Efeitos biológicos de óxidos de colesterol

OsC podem atingir a circulação sanguínea como contaminantes através dos alimentos (Lin, Morel 1996), e a consequência toxicológica disso depende da biodisponibilidade individual de cada óxido (Linseisen, Wolfram, 1998a).

Estudos mostram que OsC podem ser absorvidos por animais. Em ratos e coelhos, os óxidos presentes na dieta são absorvidos pelo intestino e encontrados nos quilomícrons e lipoproteínas (Bascoul et al. 1986; Peng et al., 1991; Vine et al., 1997; Osada et al., 1994; 2002).

Em estudos feitos em ratos, Bascoul et al. (1986) constataram uma alta variação na absorção. De 90% para o Triol e 5,6 α -epóxido colesterol, e 6% para o total de óxidos. Osada et al. (1994) avaliaram absorção linfática dos OsC em ratos, 24 horas após sua administração. Encontraram para o total de óxidos uma absorção de 30%, contra 67% verificada para o colesterol puro. Os óxidos que apresentaram maiores taxas de absorção foram o 7 β -OH, 5,6 β -epóxido e 7 α -OH, 42%, 32% e 30%, respectivamente. Os óxidos com menores taxas de foram o 5,6 α -epóxido, Triol e 7-ceto, 27,5%, 15% e 12%, respectivamente.

Vine et al. (1998) estudaram a distribuição de OsC no plasma e lipoproteínas ricas em triglicerídeos, em coelhos. No grupo com colesterol oxidado adicionado à dieta, a quantidade de OsC nas lipoproteínas ricas em triglicerídeos foi duas vezes maior em relação à dieta controle ou dieta enriquecida com colesterol não-oxidado. O 7-ceto e o 5,6 α -epóxido foram encontrados em ambos grupos, mas a maior concentração ocorreu no grupo alimentado com colesterol oxidado. Para o grupo suplementado com colesterol não-oxidado houve o aumento do colesterol plasmático, e para o alimentado com colesterol oxidado ocorreu aumento do colesterol na parede arterial. Os autores sugeriram que OsC sejam pró-aterogênicos por aumentarem a aterogenicidade das lipoproteínas ricas em triglicerídeos.

Os OsC também podem ser absorvidos pelo homem, pelos mesmos mecanismos dos animais, através do intestino, e incorporados ao quilomicrom e demais lipoproteínas (Peng et al., 1991; Osada et al., 1994; Vine et al., 1997).

Linseisen, Wolfram (1998a) analisaram a absorção de OsC em cinco indivíduos, depois do consumo de queijo parmesão e salame ricos nestes compostos. As concentrações dos OsC foram medidas no plasma e

lipoproteínas por 9 horas. Houve variação individual nas quantidades de OsC livres no plasma, com picos entre 3 horas (7-ceto, 5,6 α -epóxido e Triol) e 5 horas (7 α -OH, 7 β -OH, 5,6 β -epóxido e 25-OH) após ingestão. Os OsC totais mostraram pouca variação depois de 6 horas do consumo, e até um máximo de 8 horas, indicando absorção comparável à do colesterol. Para os OsC individuais, tanto livres como esterificados, houve aumento significativo para o 7 α -OH e 7 β -OH, após 8 horas, e 7-ceto depois de 6 horas. Os autores constataram que mais de 90% dos OsC medidos estavam na forma esterificada.

Foi evidenciado que os OsC no organismo são susceptíveis a reações de esterificação. A esterificação regula a associação do colesterol e OsC com proteínas do plasma, e influencia sua distribuição nas células e tecidos. Os OsC esterificados podem ser encontrados em todas lipoproteínas do plasma, enquanto o colesterol e os OsC livres estão mais associados à albumina, estando os últimos facilmente disponíveis em relação à célula (Lin, Morel, 1996).

Vários autores estudaram as consequências toxicológicas dos OsC (Smith, Johnson, 1989; Guardiola et al., 1996), envolvendo processos citotóxicos (Osada, 2002; Sevanian, Peterson, 1986; Othani et al., 1996; 1997; Smith, Johnson, 1989), aterogênicos (Brown, Jessup, 1999; Peng et al., 1991), mutagênicos e carcinogênicos (Guardiola et al., 1996; Sevanian, Peterson, 1986).

Existem evidências de que os óxidos comumente encontrados nos alimentos, 7-ceto, 7 α -OH, 7 β -OH, 5,6 β -epóxido, 5,6 α -epóxido, 25-OH e Triol são citotóxicos e aterogênicos (Imai et al., 1976; Taylor et al., 1979; Imai et al., 1980; Peng et al., 1991). Por apresentarem uma estrutura semelhante a do colesterol, os OsC podem substituí-lo na membrana celular, afetando a fluidez, permeabilidade, estabilidade e função desta última, provocando mudanças na morfologia da célula. Os OsC afetam a estrutura estereoquímica das proteínas e fosfolipídios, alterando as características da membrana (Sevanian, Peterson, 1986; Smith, Johnson, 1989).

A citotoxicidade dos OsC é manifestada, diminuindo as funções de diferentes tipos de células vasculares: células endoteliais, macrófagos, músculo liso, fibroblastos e linfócitos (Smith, Johnson, 1989).

Othani et al. (1996) avaliaram o efeito do 7-ceto e colesterol em hepatócitos de ratos, tratados com 100 μ M de cada substância. Constataram difusão nas membranas do hepatócitos em relação ao 7-ceto; o mesmo não foi observada quanto ao colesterol.

Imai et al. (1976) administraram colesterol oxidado estocado por cinco anos em coelhos, por via oral (0 a 250mg/Kg de peso corpóreo). Verificaram o desenvolvimento de lesões degenerativas e necróticas em células musculares lisas. Taylor et al. (1984) administraram OsC (7-ceto, 5,6 α -epóxido, 5,6 β -epóxido, 25-OH e Triol) individualmente em coelhos, observando a presença do 25-OH e Triol nas células do músculo liso; esses óxidos foram os responsáveis pelo maior número de células mortas observadas.

Sevanian, Peterson (1986) estabeleceram a toxicidade de OsC com base no aumento da esclerose e lise das células de embrião do *hamster* chinês. Os autores verificaram a citotoxicidade do Triol, 7-ceto, 5,6 α -epóxido e 5,6 β -epóxido, sendo o Triol e o 7-ceto foram os mais tóxicos.

A aterogenicidade é o efeito biológico mais estudado. Os OsC alteram a permeabilidade vascular do endotélio, aumentando a penetração de diferentes componentes do plasma, como íons, LDL (lipoproteínas de baixa densidade) ou quilomícrons remanescentes (Peng et al., 1991). Inibem a síntese da prostaciclina, essencial à integridade vascular favorecendo a agregação plaquetária e a formação de trombos (Guardiola et al., 1996). Inibem também a hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), diminuindo a síntese do colesterol endógeno (Smith, Johnson 1989). Além disso, acumulam éster de colessterila em macrófagos e células espumosas, desencadeando o processo aterosclerótico (Peng et al., 1991; Guardiola et al., 1996; Leonarduzzi et al., 2002).

Lyons et al. (1999) avaliaram o metabolismo hepático do 7-ceto em ratos e suas implicações com dietas contendo OsC. Constataram que, após 9 horas da injeção na veia jugular, o éster de [^{14}C] 7-ceto apresentou um decréscimo de 10% no fígado e 36% estava presente no intestino. Em contrapartida, 38% do [^3H]colesterol foi evidenciado no fígado e somente 5% encontrado no intestino. Ficou claro então que o 7-ceto foi rapidamente metabolizado e excretado pelo fígado. Os autores consideraram que a dieta possa não ser a origem dos OsC presentes na placa aterosclerótica, tendo pequena ou nenhuma contribuição na aterogênese.

Staprans et al. (2003) estudaram a oxidação do colesterol em dietas administradas em pessoas (n=6) de uma família Tipo III hiperlipoproteinemia. Usaram o óxido α -epóxido, devido sua facilidade de detecção no plasma humano, estar presente nas lesões ateroscleróticas e ser encontrado em alimentos submetidos ao aquecimento e/ou estocagem. Amostras de sangue foram colhidas a cada 2 horas, num total de 10 horas. Os autores concluíram que o α -epóxido adicionado à dieta foi incorporado nas frações quilomicrons/quilomicrons remanescentes e então transferidos para a LDL e HDL (Lipoproteínas de baixa e alta densidade) contribuindo para a oxidação lipoprotéica. Dietas com OsC podem acelerar a aterosclerose, devido ao aumento dos níveis desses óxidos que circulam com a LDL e os quilomícrons remanescentes.

Quanto à ação mutagênica e carcinogênica de OsC, as pesquisas não evoluíram nos últimos tempos (Linseisen, Wolfram, 1998a; Guardiola et al., 1996). Alguns estudos haviam mostrado que misturas de OsC possuíam efeito mutagênico sobre a *Salmonella typhimurium* (Smith, 1987), não confirmados posteriormente em células bacterianas ou de mamíferos (Smith, Johnson, 1989).

2.3. Estabilidade oxidativa do colesterol em ovo

2.3.1. Conteúdo de colesterol em ovo integral, ovo integral em pó, gema de ovo e gema de ovo em pó

A ocorrência de colesterol é restrita quase que exclusivamente a produtos de origem animal. Um dos alimentos de maior conteúdo em colesterol é o ovo, localizado na gema, em cuja fração lipídica compõe cerca de 5%. Na Tabela 1 consta a composição do ovo integral e em pó e gema integral e em pó. Na Tabela 2 foi medido o colesterol de vários alimentos.

De acordo com Bragagnolo, Rodriguez-Amaya (2003), Pie et al. (1990), Sarantinos et al. (1993) e Tenuta-Filho (2003) foram encontradas quantidades de colesterol de 300 a 370mg/100g em ovo integral, 929 a 1.410 mg/100g de ovo integral em pó e 1.843 a 2.312mg/100g de gema em pó.

Tabela 1: Umidade, proteína, carboidratos, lipídes, colesterol e calorias de ovo e gema de ovo integrais e em pós, e a composição da fração lipídica da gema de ovo (a)

	Ovo integral	Ovo integral em pó	Gema de ovo	Gema de ovo em pó
Umidade (g/100g)	74,9	4,15	52,1	4,66
Proteína (g/100g)	12,0	45,8	16,6	30,5
Carboidrato (g/100g)	0,3	4,78	0	0,39
Lípides (g/100g)	11,8	41,8	28,7	61,3
Colesterol (mg/100g)	300	1918	1315	2028
Energia (Kcal)	156	597	325	687
Fração lipídica: (%)				
Triglicerídeos			71-73	
Colesterol			4-6	
Fosfolípides			23-25	
Lecitina em fosfolípides			70-77	
Ac. Graxos C ₁₆ -C ₁₈			99,5	
Ac. Graxos saturados			44	
Ac. Graxos monoinsaturados			44	
Ac. Graxos polinsaturados			10,2	

(a) Hui, Wiley (1996); Sim, Nakai (1994); FAO (2002).

Tabela 2: Quantidades de colesterol em alguns alimentos de origem animal (mg/100g) (a)

Leite	15
Manteiga	200
Queijo	70 – 100
Ovo inteiro	450
Gema de ovo	1.260
Carne	60 – 80
Pescado	50 – 80

(a) Muller, Tobin (sem data)

2.3.2. Óxidos de colesterol em ovo integral, ovo integral em pó, gema de ovo e gema de ovo em pó

O ovo e seus produtos têm sido estudados extensivamente devido a sua grande quantidade de colesterol e de OsC encontrados por influência do processamento e/ou da estocagem (Huber et al., 1995; Lai et al., 1995; Sander et al., 1989).

Muitos OsC têm sido identificados (Tai et al., 1999), sendo que oito deles são os mais freqüentemente encontrados em alimentos, o 7-cetocolesterol (7-ceto), 20-hidroxicolesterol (20-OH), 25-hidroxicolesterol (25-OH), 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OH), 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH), colesterol-5,6 α -epóxido (5,6 α -epóxido), colesterol-5,6 β -epóxido (5,6 β -epóxido) e colestanoltriol (Triol) (Addis, 1996; Lercker, Rodriguez-Estrada, 2000; Pie et al., 1990; Tai et al., 1999), cuja formação desses óxidos está representada na Figura 2.

Os alimentos frescos de origem animal apresentam traços ou quantidades de óxidos não-detectáveis (Sarantinos et al., 1993; Nourooz-Zadeh, Appelqvist, 1987). A estabilidade do colesterol no caso do ovo fresco deve ser atribuída ao fato dos lípides estarem na gema do ovo, envolvida pela clara, protegidas pela casca, prevenindo o contato com o oxigênio atmosférico, além dos antioxidantes naturais presentes. Em ovo líquido fresco, a maior quantidade de óxido encontrada foi de 2 μ g/g de 7-ceto (Tai et al., 1999; Guardiola, 1994; Zunin et al., 1995). Em gema de ovo líquida

fresca foi de 2,79µg/g em relação ao 7α-OH (Tenuta-Filho et al., 2003; Nourooz-Zadeh et al., 1987; Van de Bovenkamp et al., 1988; Nourooz-Zadeh, 1990; Sarantinos et al., 1993).

O ovo é usado diretamente como alimento (frito, cozido, etc) ou como ingrediente (matéria-prima) na produção de outros alimentos (Tai et al., 1999). Tsai, Hudson (1985) reportaram que ambos os epóxidos (5,6α- e 5,6β-) em ovo em pó e em gema de ovo em pó geralmente são formados em maiores quantidades durante o processamento comercial, por atomização, ao contrário de outros óxidos (7α-OH, 7β-OH, 7-ceto, 25-OH e Triol), ao contrário do observado por Nourooz-Zadeh, Appelqvist (1987).

Segundo Pie et al. (1990), os óxidos mais abundantes em ovo integral em pó foram o 7α-OH e 7β-OH, com resultados entre 21,56 - 34,38µg/g e 23,05 - 43,27µg/g, e em gema de ovo em pó, de 43,15µg/g e 47,35µg/g, respectivamente. Para o 7-ceto foram encontradas 22,43 - 32,73 µg/g e 46,20µg/g em gema de ovo em pó. Quantidades de 5,6α-epóxido e 5,6β-epóxido de 16,58 - 47,27µg/g e 40,27 - 62,67µg/g foram detectadas em ovo integral em pó, enquanto em gema integral em pó de 32,34 e 68,50µg/g, respectivamente.

Tenuta-Filho et al. (2003) avaliaram o 7α-OH, 7β-OH, 7-ceto e 25-OH em gema de ovo, frita e em pó. O 7-ceto ocorreu ao nível de $9,46 \pm 0,15\mu\text{g/g}$ na gema frita, mas não foi confirmada a presença de 25-OH. Para gema de ovo em pó foram encontradas $110,54 \pm 11,82\mu\text{g/g}$ e $112,67 \pm 13,52\mu\text{g/g}$, respectivamente, de 7-ceto e 25-OH.

Sarantinos et al. (1993) quantificaram os OsC em ovo integral em pó e gema integral em pó. No ovo integral em pó relataram $1,4 \pm 0,2\mu\text{g/g}$ de 7α-OH, $2,0 \pm 2,0$ a $4,7 \pm 4,7\mu\text{g/g}$ de 7β-OH, $9,0 \pm 1,8$ a $16,6 \pm 2,2\mu\text{g/g}$ de 5,6α-epóxido + 5,6β-epóxido, $5,9 \pm 0,9$ a $7,8 \pm 1,2\mu\text{g/g}$ de 20α-OH e $1,7 \pm 0,3$ a $2,8 \pm 0,6\mu\text{g/g}$ de 7-ceto. Na gema integral em pó, $12,2 \pm 1,0$ a $19,8 \pm 2,7\mu\text{g/g}$ de 7β-OH, $22,0 \pm 11,8$ a $64,1 \pm 8,2\mu\text{g/g}$ de 5,6α-epóxido + 5,6β-epóxido, $8,5 \pm 1,6$ a $15,6 \pm 3,2\mu\text{g/g}$ de 20α-OH e $3,5 \pm 3,5\mu\text{g/g}$ de 7-ceto.

Sander et al. (1989) quantificaram a presença em ovo em pó de 7 β -OH (22 a 65ppm), 7-ceto (12 a 37ppm), 25-OH (8 a 10ppm), 5,6 α -epóxido (12 a 111ppm), 5,6 β -epóxido (5 a 46ppm) e Triol (2 a 6ppm). Em gema de ovo em pó detectaram 7 β -OH (5ppm), 7-ceto (22ppm), 25-OH (2ppm), 5,6 α -epóxido (79ppm) e 5,6 β -epóxido (28ppm).

Penazzi et al. (1995) determinaram a quantidade de 7-cetocolesterol livre em ovo integral em pó de 20,2 – 61,8 $\mu\text{g/g}$ de lípides. Razzazi-Fazeli et al. (2000) encontraram em ovo em pó os óxidos 7 α -OH (0,47 $\mu\text{g/g}$), 7 β -OH (0,56 $\mu\text{g/g}$), 7-ceto (0,33 $\mu\text{g/g}$), 25-OH (0,065 $\mu\text{g/g}$), Triol (0,058 $\mu\text{g/g}$), 5,6 α -epóxido (0,21 $\mu\text{g/g}$) e 5,6 β -epóxido (0,55 $\mu\text{g/g}$).

Lercker, Rodriguez-Estrada (2000) quantificaram o 7-ceto em diferentes produtos alimentícios; em ovo em pó detectaram 1,3 a 4,6 $\mu\text{g/g}$ de amostra.

Analisando os resultados mencionados, constatou-se que no ovo cru e no ovo processado os níveis de 7-ceto totais relatados pelos diferentes autores foram de não-detectado a 2,0 $\mu\text{g/g}$ e 0,33 a 110,0 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, em relação ao peso da amostra.

2.3.3. Efeito do processamento e/ou estocagem do ovo sobre a estabilidade oxidativa do colesterol

A oxidação do colesterol em alimentos pode ocorrer motivada por vários fatores durante o processamento e/ou estocagem. O grau de formação dos OsC irá depender da temperatura e tempo de exposição ao calor, condições de estocagem e embalagem (Paniangvait et al., 1995; Tai et al., 2000).

Sarantinos et al. (1993) reportaram que o tempo de cocção aumenta a concentração dos OsC em ovos. Submetido à fritura no tempo de 1 e 2 minutos, os OsC totais foram de 84 ± 20 e $124 \pm 21 \mu\text{g/g}$, respectivamente. No ovo cozido em água fervente por 3 e 10 minutos foram quantificados $128 \pm 13 \mu\text{g/g}$ e $203 \pm 31 \mu\text{g/g}$, respectivamente.

Vários produtos alimentícios de baixa umidade são produzidos utilizando altas temperaturas para desidratação, facilitando a formação de OsC, principalmente em produtos com elevado nível de colesterol. A desidratação por liofilização é uma alternativa para a substituição de altas temperaturas em processos que a utilizam, prevenindo assim a formação de OsC. Por causa do seu alto custo, essa técnica não é empregada comercialmente com frequência na produção de alimentos desidratados (Tai et al., 2000).

Diversos estudos têm relatado a formação de OsC em produtos de ovo integral em pó obtido por atomização (Huber et al., 1995; Sander et al., 1989; Guardiola et al., 1997; Zunin et al., 1995; Sarantinos et al., 1993; Lai et al., 1995). Fatores relativos à atomização, à temperatura do processo e tipo de atomizador facilitam a formação do OsC.

Tsai, Hudson (1985) quantificaram o α e β -epóxido, avaliando o efeito da atomização do ovo, submetido ao aquecimento do ar indireto (elétrico) e direto (gás). Constataram que no aquecimento direto ocorreu maior formação dos dois OsC, 8 a 311ppm, e no indireto, de não-detectado a 8ppm. Essa formação de óxidos pelo aquecimento direto, pode ter sido devido à produção de óxidos de nitrogênio (NO, NO₂), durante a combustão do gás, atuando na autooxidação do colesterol.

Morgam, Armstrong (1992) quantificaram o 7 α -OH, 7 β -OH, 5,6 α -epóxido, 5,6 β -epóxido e 7-ceto, em gema de ovo, analisando o efeito da atomização por aquecimento direto do ar (gás). Na temperatura de 150°C a concentração dos óxidos totais foi de 75 e 213 μ g/g, na presença de 5 e 300 μ g/g de NO_x, respectivamente.

Lai et al. (1995) prepararam ovo em pó a partir do ovo líquido por desidratação indireta (aquecimento elétrico) e direta do ar (aquecimento a gás) e embalando os produtos em plástico (*polyethylene-laminated nylon*) sob vácuo. Foram analisados o 5,6 α -epóxido, 5,6 β -epóxido, 7 α -OH, 7 β -OH e 7-ceto. A concentração total dos OsC encontrada no produto obtido por aquecimento indireto do ar foi de 8,57 μ g/g e no submetido ao aquecimento

direto do ar 14,36 μ g/g. Concluíram pela presença de radicais livres gerados durante o processo de combustão (NO_x) como responsáveis pelo aumento dos óxidos formados, confirmando os resultados de Tsai, Hudson (1985) e Morgam, Armstrong (1992).

Guardiola et al. (1997) estudaram a estocagem do ovo integral em pó produzido por atomização equipado com aquecimento elétrico do ar, embalado em sacos plásticos (cinco filmes de polipropileno), submetido ou não a vácuo, protegido ou não da incidência de luz, e à temperatura ambiente. A amostra recém produzida (controle) tinha níveis de 7-ceto e 7 β -OH em maiores quantidades, 10,35 e 12,77 μ g/g, respectivamente, e um somatório de 30,83 μ g/g incluindo o α -epóxido, Triol e 25-OH. As interações entre o tempo de estocagem, embalagem e o processamento influenciaram na formação dos OsC. Com embalagens sem vácuo e exposição à luz a formação de óxidos foi maior em relação ao uso de embalagem a vácuo e sem incidência de luz.

2.4. Estabilidade oxidativa do colesterol em macarrão contendo ovos

2.4.1. Conteúdo de colesterol em macarrão

O teor de colesterol tem sido utilizado como parâmetro da qualidade de macarrão contendo ovos, de acordo com a Resolução 12/78, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, do Ministério da Saúde (Brasil, 1978). A citada resolução, estabelece que “massas com ovos” devem conter no mínimo três ovos por Kg, correspondendo a 0,450g de colesterol. A quantidade mínima requerida pela lei italiana na produção de macarrão contendo ovos é de quatro ovos por Kg (Zunin et al., 1996).

Marsiglia et al. (1994) detectaram 38,1 a 66,0mg de colesterol/100g de macarrão contendo ovos. Das 9 marcas comerciais examinadas, 44% estavam em desacordo com a legislação. Bragagnolo, Rodriguez-Amaya, (1993) encontraram valores de colesterol em 5 marcas de macarrão

contendo ovos, entre 2 a 24mg/100g, bem abaixo do mínimo permitido pela legislação vigente.

2.4.2. Ocorrência de 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos

No processo de fabricação de macarrão os ciclos de secagem envolvem aquecimento a temperaturas entre 70-90°C, por períodos que podem exceder a dez horas (Zunin et al., 1996). Os processos convencionais utilizam temperaturas na faixa de 40-50°C, com períodos de ventilação que podem exceder 14 horas (Ormenese et al., 1998). Na produção do macarrão contendo ovos sob tais condições é possível que a estabilidade oxidativa do colesterol seja afetada.

Zunin et al. (1996) determinaram o 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos. Foram analisadas amostras industrializadas ou preparadas em rostisseria. Nas 12 amostras manufaturadas em rotisseries foram detectadas de 4 a 24µg/g de lípides. No macarrão industrial, em 32 amostras foram encontradas de 6,3 a 30,9µg/g de lípides, sendo que duas delas níveis de 57,0 e 47,9 µg/g, atribuídos à utilização de ovo em pó na produção do macarrão.

Penazzi et al. (1995) quantificaram o 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos, de 15,1 a 16,1 µg/g de lípides. Na consideração dos autores, os valores observados seriam também consequência do uso de ovo integral em pó. Lercker, Rodriguez-Estrada (2000) encontraram valores de 0,2 a 0,5 µg/g de amostra.

Objetivos

3. Objetivos

- Determinar a ocorrência de 7-cetocolesterol livre em ovo integral em pó e em macarrão contendo ovos;
- Avaliar a estabilidade oxidativa do colesterol em ovo integral em pó durante a estocagem; e,
- Avaliar a estabilidade oxidativa do colesterol em macarrão contendo ovos, em função do cozimento que antecede o consumo.

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Reagentes

Reagentes utilizados tiveram grau PA. O isopropanol e o hexano, utilizados na cromatografia possuíam grau HPLC. Os padrões 6-cetocolestanol (*5 α -cholestan-3 β -ol-6one*), 7-cetocolesterol (*5-cholesten-3 β -ol-7-one*) e colesterol (*5-cholesten-3 β -ol*) foram obtidos da marca Sigma e o Florisil (MgO:SiO₂, 15:85), utilizado na separação em fase sólida, da marca Merck.

4.2. Amostras

As amostras comerciais de ovo integral em pó correspondentes a 5 marcas codificadas (A, B, C, D, e E) foram cedidas por indústrias ou fornecedores, em diferentes lotes, dentro do prazo de validade de 180 dias, e analisadas entre 15 a 120 dias da data de fabricação. Detalhes operacionais do processo de atomização não puderam ser obtidos. Uma amostra comercial de gema de ovo em pó foi usada na estabilidade do 7-ceto durante a saponificação.

As amostras de macarrão contendo ovos (11 marcas) foram adquiridas comercialmente em supermercados, com validade entre dezembro de 2003 a julho de 2005.

4.3. Estabilidade oxidativa do colesterol em ovo integral em pó durante a estocagem

Dentre as cinco marcas de ovo integral em pó (A, B, C, D e E). A da marca E foi selecionada, para análise da estabilidade, em três lotes distintos (1, 2 e 3), com datas de fabricação de 24/04/03, 26//04/03 e 30/04/03, respectivamente. Cada lote foi homogeneizado e subdividido em porções de 100g cada, embalados em sacos plásticos de polipropileno, lacrados com auxílio de fita adesiva, tendo havido o cuidado prévio da retirada parcial de ar (expulsão por pressionamento manual). As amostras ficaram estocadas

por até 224 dias, à temperatura ambiente, no período de maio a dezembro de 2003. A temperatura variou entre 12 a 29°C, medida com termômetro de máxima/mínima. Para que a incidência de luz fosse igual para todas as amostras, estas eram movimentadas a cada três dias, de forma que a parte de cima ficasse voltada para baixo, e vice-versa. Durante o período experimental foram analisados os conteúdos de 7-cetocolesterol livre, substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), umidade e lípidos totais, a cada 30 dias na maioria dos casos até o 224 dias. O tempo inicial do experimento correspondeu ao uso de amostras com 7-15 dias de fabricação.

4.4. Estabilidade oxidativa do colesterol em macarrão contendo ovos após o cozimento

Foram selecionadas duas marcas de macarrão contendo ovos (De Cecco e Dona Benta), em três lotes distintos. O cozimento do macarrão em água fervente foi realizado segundo o fabricante, durante 7 e 8 minutos. Na água de fervura foi previamente adicionado cloreto de sódio (2%). Análises de 7-cetocolesterol livre, umidade e lípidos totais foram realizadas nas amostras cozidas e não-cozidas (controle), no prazo máximo de 1 hora após o tratamento térmico.

4.5. Lípidos totais e umidade

Os lípidos totais foram determinados de acordo com Folch et al. (1957), utilizando clorofórmio/metanol (2:1, v/v). O extrato obtido foi evaporado a 40°C, em rotoevaporador sob vácuo, e o resíduo pesado. No caso do macarrão foi empregado o método de Bligh, Dyer (1959). A amostra foi então previamente hidratada com água destilada (1:1), sendo utilizado na extração clorofórmio/metanol na proporção 1:2, v/v. A umidade foi analisada pelo método do Instituto Adolfo Lutz (1985), com base na perda de voláteis a 105°C.

4.6. Quantificação de colesterol e 7-ceto segundo Csallany et al. (1989) com saponificação a frio prévia, de acordo com Chen, Chen (1994) e Sander et al. (1989)

4.6.1. Extração lipídica

A extração lipídica seguiu o que foi descrito no item 4.5 (Folch et al., 1957).

4.6.2. Saponificação a frio segundo Chen, Chen (1994) e Sander et al. (1989)

O extrato lipídico evaporado foi submetido à saponificação a frio (25 a 30°C), por 18 a 20 horas, com 20mL de KOH 1M, em metanol, conforme Chen, Chen (1994). A fração insaponificável foi extraída com 10mL de hexano, por três vezes consecutivas, e o solvente evaporado a 40°C, em rotoevaporador sob vácuo, o resíduo gerado foi usado na quantificação do colesterol (Csallany et al., 1989).

Para quantificação do 7-ceto (Csallany et al., 1989), foi utilizada a saponificação a frio (25 a 30°C) por 18 a 20 horas, com 10mL de KOH 1M, em metanol, conforme Sander et al. (1989). A fração insaponificável foi extraída com 10mL de hexano, por três vezes consecutivas. O “pool” de hexano foi lavado com 5mL de KOH 0,5M aquoso, e por duas vezes consecutivas com 5mL de água destilada. Ao final, o hexano foi evaporado a 40°C, em rotoevaporador a vácuo.

4.6.3. Quantificação

O resíduo da evaporação do extrato lipídico saponificado foi ressuspenso em 2mL da fase móvel hexano/isopropanol, 97:3 para o colesterol e 93:7 para 7-ceto e 7cetocolesterol livre, filtrado em membrana durapore (Millex-Millipore), com 0,45µm de diâmetro e automaticamente injetado em alíquotas de 20µL, no cromatógrafo Shimadzu LC-10ADVP. Foi usada coluna µ-Porasil de sílica, com 10µm de poro, de 30 x 0,39cm

(WATERS Associates), em fase normal com o fluxo de 1mL/min. O monitoramento se deu a 206nm para colesterol e a 233nm para 7-ceto e 7-cetocolesterol livre, utilizando detector de arranjo de fotodiodos.

4.6.4. Teste de recuperação

A validação da metodologia usada baseou-se na recuperação dos analitos e nos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), e na linearidade das curvas de calibração correspondentes, anteriormente estabelecidos em nosso laboratório por Moura (1999) e Morales-Aizpurúa (2001). O LD, definido como o nível de concentração mais baixo que pode ser detectado sendo estatisticamente diferente do branco, foi obtido de 10 leituras do branco, utilizando o valor de três vezes o desvio-padrão, conforme Long, Winefordner (1983). O LQ, definido como o nível acima do qual resultados quantitativos podem ser obtidos com um certo grau de confiança, foi calculado como sendo 10 vezes o valor do desvio-padrão, de acordo com Long, Winefordner (1983). O intervalo de linearidade da curva de calibração foi verificado pelo coeficiente de correlação obtido com os valores de absorbância dos padrões preparados por diluições sucessivas de 5, 10, 20, 30 e 40µg/g, para o colesterol, e de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8µg/g para o 7-ceto (Funk et al., 1995).

4.7. Quantificação de 7-cetocolesterol livre segundo Csallany et al. (1989) com separação prévia em fase sólida (Penazzi et al., 1995)

4.7.1. Extração lipídica

A extração lipídica seguiu o que foi descrito no item 4.5, com adição do padrão interno 6-cetocolesterol (22 a 24µg) (Li et al., 1996; Chen, Chen, 1994; Maerker, Unruh, 1986) e do antioxidante BHT (butil-hidroxitolueno), a 0,02%, calculado em relação aos lípides (Du, 2000).

4.7.2. Separação em fase sólida

A separação em fase sólida consistiu do método A proposto por Penazzi et al. (1995). O resíduo do extrato lipídico, na faixa de 50 a 60mg, foi diluído com 0,5mL da solução n-heptano / isopropanol (98:2, v/v) adicionado em coluna empacotada com Florisil (500mg) e eluído com acetona. O resíduo foi dissolvido em 2mL da fase móvel hexano/ isopropanol (93:7 v/v), depois da evaporação da acetona em rotoevaporador a 40°C.

4.7.3. Quantificação

A quantificação do 7-cetocolesterol livre correspondeu ao que foi descrito ao item 4.6.3.

4.7.4. Teste de recuperação

A recuperação do 7-cetocolesterol livre (53 a 57µg) e do 6-cetocolesterol (22 a 24µg), usado como padrão interno, para as matrizes ovo integral em pó (0,1g) e macarrão contendo ovos (12g). A recuperação do colesterol (29 a 30µg) em ovo integral em pó (0,25g) e macarrão contendo ovos (1,5g) de acordo com o item 4.6.4.

4.7.5. TBARS

As substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico foram quantificadas segundo Vyncke (1970), empregando o antioxidante BHT (0,02%) em relação ao lípidos totais, para medir a extensão de oxidação dos ácidos graxos.

4.8. Análise estatística

Dados obtidos foram submetidos à análise de variância (Anova), segundo o programa Instat versão 2.01 (Graph Pad Software). O coeficiente de correlação linear de Pearson foi empregado segundo Costa Neto (1977).

Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1. Validação do método de quantificação do colesterol e 7-cetocolesterol livre

Na determinação de OsC é comum submeter o extrato lipídico da amostra à saponificação, permitindo a extração subsequente dos analitos de interesse no estado livre (não-esterificado), presentes na fração insaponificável. No entanto, o 7-ceto é particularmente sensível às condições alcalinas empregadas a saponificação, conforme demonstrado por Van de Bovenkamp et al. (1988).

Resultados obtidos confirmaram a destruição do 7-ceto em meio alcalino, nas seguintes condições: KOH em metanol, em solução 1M, temperatura de 25°C, por 18 a 20 horas, segundo Sander et al. (1989). Nas condições apontadas foi obtida uma recuperação de apenas 23%, quando o 7-ceto foi submetido ao meio alcalino (Tabela 3). Baixa recuperação foi demonstrada também quando o 7-ceto foi adicionado à matriz gema de ovo em pó (Tabela 4).

Tabela 3: Recuperação do 7-cetocolesterol (μg) submetido à saponificação

Amostras	Sem tratamento	Com tratamento
Padrão 1	11,87	2,82
Padrão 2	12,05	2,80
Padrão 3	12,07	2,82
Média $\pm$ DP (n=3) (CV)	12,00 $\pm$ 0,11 (0)	2,81 $\pm$ 0,01 (0)
Recuperação (%)	-	23,42

DP= Desvio-padrão; CV=(Coeficiente de variação %)

Tabela 4: Recuperação do 7-ceto ($\mu\text{g/g}$ de lípidos) adicionado à matriz gema de ovo em pó, em função do tempo de saponificação

Amostras	Tempo (horas)		
	1	3	5
7-ceto*+gema	246,55 $\pm$ 5,50(0,02)	227,07 $\pm$ 4,72(0,02)	215,98 $\pm$ 5,66(0,03)
Gema	240,02 $\pm$ 4,62(0,02)	221,49 $\pm$ 3,58(0,02)	212,12 $\pm$ 5,51(0,03)
Recuperação (%)	61,04	52,16	36,08

* 7-ceto adicionado = 10,698 μg ; M $\pm$ DP (n=3); CV= (Coeficiente de variação, %)

Os resultados das Tabelas 3 e 4 concordam com os de Van de Bovenkamp et al. (1988), que relataram a recuperação de 7-ceto de 11 a 40%. São concordantes também com os resultados de Maerker, Unruh (1986), que observaram a destruição completa do óxido submetido à saponificação a quente (110 a 120°C), durante uma hora. Outros autores, no entanto, chegaram a resultados opostos, recuperando o 7-ceto entre 96,1 a 108,9%, em relação a várias matrizes, entre as quais a gema de ovo em pó (Chen, Chen, 1994; Sarantinos et al., 1993; Pie et al., 1990; Park et al., 1996). Não foram encontradas na literatura explicações sobre esta questão conflitante envolvendo a saponificação.

Dutta et al. (1998) relatando análises de 7α -OH, 7β -OH, 7-ceto, α -epóxido, β -epóxido e Triol, realizadas em ovo integral em pó e em leite integral em pó, em 8 diferentes laboratórios (com as mesmas amostras), indicaram coeficientes de variação elevadíssimos entre os resultados obtidos em cada um desses laboratórios. No caso do ovo integral em pó, o coeficiente de variação foi de 36 a 51%. No caso do leite integral em pó, muito mais, de 76 a 196%, motivado pela ocorrência menor de cada óxido neste produto. O coeficiente de variação observado entre os resultados do 7-ceto analisado em ovo integral em pó foi de 51%, em relação ao qual eventualmente não pode ser descartada a contribuição negativa da saponificação.

Ficou evidente na questão apontada por Dutta et al. (1998) a dificuldade analítica existente em relação à quantidade de OsC em alimentos, principalmente pelos baixos teores encontrados. A inevitável sugestão pela necessidade de padronização e validação analíticas tem como principal objetivo a segurança dos resultados obtidos.

Com base nos resultados relatados por Van de Bovenkamp et al. (1988) e no fato de que a maior parte do 7-ceto ocorre na forma livre, segundo Penazzi et al. (1995), foi feita então a opção para quantificá-lo neste estado, ou seja, não-esterificado. Em função disso a saponificação do extrato lipídico da amostra foi omitida. Em consequência, o 7-cetocolesterol

livre foi separado, e em seguida eluído de coluna de Florisil, de acordo com Penazzi et al. (1995).

O método de quantificação do colesterol e 7-ceto nas matrizes camarão-rosa e maionese foi validado em nosso laboratório (Moura, 1999; Morales-Aizpurúa, 2001). Os limites de quantificação e de detecção e a linearidade das curvas de calibração obtidas (Tabela 5) foram considerados adequados para o presente trabalho. A recuperação do colesterol e do 7-cetocolesterol livre foi utilizada então como parâmetro adicional de validação (Tabela 6)

A recuperação do 6-cetocolesterol (padrão interno), colesterol e 7-cetocolesterol foram de 95 a 99% (Tabela 6). Vários autores empregaram colunas de sílica na separação de 7-cetocolesterol livre. Os resultados de recuperação obtidos, de 92,8 a 101,8%, foram em relação às matrizes gema de ovo em pó, toicinho, macarrão (*egg noodle*), biscoito, ovo integral em pó, leite integral em pó, queijo, *snacks* e manteiga (Van de Bovenkamp et al., 1988; Chen, Chen, 1994; Penazzi et al., 1995; Razzazi-Fazeli et al., 2000).

Tabela 5: Limites de detecção (LD), de quantificação (LQ) e linearidade das curvas de calibração, dada pelos coeficientes de determinação (R^2), do colesterol e 7-ceto (a)

Padrão	LD (g)	LQ (g)	R^2
Colesterol	$1,09 \times 10^{-8}$	$3,62 \times 10^{-8}$	0,998
7-ceto	$2,02 \times 10^{-9}$	$6,73 \times 10^{-9}$	0,997

(a) Moura (1999) e Morales-Aizpurúa (2001)

Tabela 6: Recuperação (%) do 6-cetocolesterol (padrão interno), colesterol e 7-cetocolesterol livre, adicionados ao ovo integral em pó e ao macarrão contendo ovos

Matrizes	6-cetocolesterol	Colesterol	7-cetocolesterol livre
Ovo integral em pó	$94,82 \pm 0,03$ (0)	$95,71 \pm 2,84$ (0,03)	$99,03 \pm 0$ (0)
Macarrão com ovos	$91,81 \pm 1,10$ (0)	$96,17 \pm 1,35$ (0,01)	$96,62 \pm 0,106$ (0)

M $\pm$ DP (n=5); CV= (Coeficiente de variação, %)

5.2. Ocorrência do 7-cetocolesterol livre em ovo integral em pó

O colesterol foi quantificado em amostras de ovo integral em pó. O conteúdo médio de $1.111,71 \pm 11,44\text{mg}/100\text{g}$ (Tabela 7), foi concordante com os resultados de Sarantinos et al. (1993), de 928,9 a $1.110,3\text{mg}/100\text{g}$, mas abaixo dos obtidos por Pie et al. (1990), de 1.330 a $1.410\text{mg}/100\text{g}$.

Tabela 7: Valores encontrados de colesterol em ovo integral em pó, em base seca

Concentração	Colesterol (mg/100g)
Mínima	991,40
Máxima	1.137,63
Média (n=3)	1.111,71
Desvio-padrão	11,44
Coeficiente de Variação (%)	1,03

Nos três lotes de cada uma das cinco marcas de ovo integral em pó, que estavam dentro do prazo de validade comercial, de 15 a 120 dias de fabricação, foi detectada a presença de 7-cetocolesterol livre em quantidades que variaram de 63,74 a $112,80\mu\text{g}/\text{g}$ de lípidos (Tabela 8).

Tabela 8: 7-cetocolesterol livre, TBARS , lípides totais (base seca) e umidade , em três lotes diferentes de cinco marcas de ovo integral em pó.

Marca	7-cetocolesterol livre*($\mu\text{g/g}$ de lípides)	TBARS* (mg AM/Kg)	Lípides totais (g/100g)	Umidade (g/100g)
A-1	94,19	1,18	$39,12 \pm 0,08$ (0,20)	$2,27 \pm 0,15$ (6,60)
A-2	76,11	1,21	$38,40 \pm 0,01$ (0,03)	$1,39 \pm 0,51$ (3,67)
A-3	87,65	1,13	$38,06 \pm 0,01$ (0,03)	$3,16 \pm 0,03$ (0,95)
B-1	112,80	1,10	$37,35 \pm 0,51$ (1,37)	$2,55 \pm 0,17$ (6,66)
B-2	73,73	1,14	$37,36 \pm 0,01$ (0,03)	$2,14 \pm 0,02$ (0,93)
B-3	84,71	1,03	$37,63 \pm 0,13$ (0,34)	$3,50 \pm 0,12$ (3,43)
C-1	77,63	1,40	$37,45 \pm 0,33$ (0,88)	$1,26 \pm 0,09$ (7,14)
C-2	73,07	1,44	$38,97 \pm 0,26$ (0,66)	$1,64 \pm 0,09$ (5,49)
C-3	77,19	1,10	$36,99 \pm 0,01$ (0,02)	$1,13 \pm 0,03$ (2,65)
D-1	76,30	0,73	$39,49 \pm 0,65$ (1,65)	$1,83 \pm 0,11$ (6,01)
D-2	74,65	0,75	$41,91 \pm 0,25$ (0,59)	$2,36 \pm 0,04$ (1,69)
D-3	105,12	0,81	$41,27 \pm 0,18$ (0,44)	$3,52 \pm 0,14$ (3,99)
E-1	73,64	0,74	$31,52 \pm 0,67$ (2,13)	$2,67 \pm 0,19$ (7,11)
E-2	63,74	0,76	$38,46 \pm 0,29$ (0,75)	$1,72 \pm 0,04$ (2,33)
E-3	109,68	0,99	$32,39 \pm 0,69$ (2,13)	$2,72 \pm 0,06$ (2,21)

* Analisado em duplicata; $M \pm DP$ (n=3); CV= (Coeficiente de variação, %)

A presença de 7-cetocolesterol livre denuncia a instabilidade oxidativa do colesterol, que pode ter ocorrido durante o processamento do produto e/ou na estocagem subsequente a que foi submetido. A oxidação medida aparentemente está subestimada, já que outros óxidos frequentemente presentes em ovo integral em pó que são citados na literatura não constam do objetivo do trabalho.

Os resultados obtidos (Tabela 8) sugerem conteúdos maiores de 7-cetocolesterol livre quando comparados com os relatados por diferentes autores (Tabela 9).

Tabela 9: Teores de 7-cetocolesterol livre (*) e 7-cetocolesterol total (**) em ovo integral em pó relatados na literatura

7-ceto ($\mu\text{g/g}$ de lípides)	Referências
20,2 - 58,0 (*)	Penazzi et al., 1995
22,2 - 61,8(*)	Penazzi et al., 1995
38,4 - 83,7(**)	Sarantinos et al., 1993
30,2 - 44,1(**)	Pie et al., 1990
29,0 - 104,0(**)	Lercker, Rodriguez-Estrada, 2000
63,74 - 112,80(*)	Presente trabalho (Tabela 8)

As TBARS, quantificadas entre 0,73 a 1,14mg de AM/Kg de amostra (Tabela 8), indicam ter havido oxidação de ácidos graxos. Produtos intermediários dessa oxidação poderiam ter contribuído para oxidação do colesterol por peroxidação, expressada pelo 7-cetocolesterol livre (Tabela 8). De acordo com a Tabela 8, a presença de lípides em ovo integral em pó é bastante significativa, cuja quantidade total atingiu 31,52 a 41,91g/100g. A insaturação dos ácidos graxos desta fração lipídica é também significativa. Segundo a literatura, cerca de 60% de ácidos graxos insaturados (palmitoleico C16:1, 2,6%; oléico C18:1, 35,6%; linoleico C18:2, 12,9% e linolênico C18:3, 10,3%) formam a fração lipídica do ovo (Sim, Nakai, 1994). Entretanto nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de 7-cetocolesterol livre e os das TBARS.

De acordo com as informações dos fabricantes de ovo em pó, o conteúdo mínimo de lípides totais deveria ser de 38g/100g e umidade máxima de 4g/100g. Conforme a Tabela 8, quase 50% das amostras analisadas tinham teor de lípides abaixo do indicado.

5.3. Avaliação da estabilidade oxidativa do colesterol em ovo integral em pó

Amostras de ovo integral em pó foram estocadas em sacos plásticos de polipropileno, à temperatura ambiente, durante 224 dias, e os resultados da avaliação feita quanto à estabilidade do colesterol estão indicados na Tabela 10.

Tabela 10: Teores de 7-cetocolesterol livre ($\mu\text{g/g}$ de lípidos) em ovo integral em pó estocado à temperatura ambiente, em até 224 dias

Amostras	Tempo de estocagem (dias)							
	0	30	60	90	120	150	180	224
1	73,67	69,30	69,03	86,52	89,87	112,11	78,41	84,85
2	83,34	65,48	66,42	79,02	95,63	97,69	81,81	82,92
3	73,65	59,94	65,32	73,97	82,72	85,19	80,45	80,42
M	76,88 ^a	64,91 ^a	66,92 ^a	79,84 ^{a,b}	89,41 ^b	98,33 ^b	80,22 ^b	82,73 ^b
DP	5,59	4,71	1,91	6,31	6,46	13,47	1,71	2,22
CV	7,28	7,25	2,84	7,90	7,23	13,70	2,13	2,68

Letras superescritas iguais indicam diferenças estatísticas não-significativas; M = Média (n=3); DP = Desvio-padrão ($\pm$); CV= Coeficiente de variação, (%).

Os resultados da Tabela 10, expostos também na Figura 3, não permitiram visualizar clara formação de 7-cetocolesterol livre em relação com o tempo de estocagem considerado de 224 dias, como consequência da oxidação do colesterol do ovo integral em pó estudado. Entre o tempo inicial e o 60º dia de estocagem houve uma aparente redução nos níveis do citado óxido, sem que causa justificável pudesse ser apontada. A partir do 90º dia, os resultados poderiam estar indicando um aumento até o 150º dia, para depois então registrar uma diminuição.

A evolução das TBARS durante o experimento expressou tendência de aumento consistente indicando oxidação lipídica (Tabela 11; Figura 3), foi o suficiente para estabelecer correlação com o 7-cetocolesterol livre (Tabela 10), com coeficiente de correlação $r = 0,8093$ ($p < 0,01$), (equação da reta: $y = 0,0483x - 2,7098$).

Tabela 11: Teores de TBARS (mg AM/Kg) em ovo integral em pó estocado à temperatura ambiente, até 224 dias, em base seca

Amostras	Tempo de estocagem (dias)							
	0	30	60	90	120	150	180	224
1	0,35	0,19	0,45	1,3	1,27	1,64	2,01	2,25
2	0,35	0,17	0,42	1,27	1,54	1,61	1,83	2,07
3	0,40	0,17	0,42	1,12	1,41	1,68	1,75	1,86
M	0,37 ^a	0,17 ^b	0,43 ^a	1,23 ^c	1,40 ^{c,d}	1,64 ^d	1,86 ^d	2,06 ^d
DP	0,15	0,07	0,04	0,41	0,45	0,11	0,67	0,19
CV	10,34	13,28	3,25	10,79	10,54	2,23	11,98	9,47

Letras superescritas iguais indicam diferenças estatísticas não-significativas; M = Média (n=3); DP = Desvio-padrão ($\pm$); CV= Coeficiente de variação, (%).

Figura 3: Representação entre os resultados de 7-cetocolesterol livre ($\mu\text{g/g}$ de lípidos) e TBARS (mg de AM/Kg), observados durante a estocagem do ovo integral em pó em até 224 dias.

Os resultados das análises de umidade e lípidos totais das amostras de ovo integral em pó mantidas estocadas em até 224 dias foram incluídos na Tabela 12, estando indicado que não houve modificação lipídica quantitativa ao longo do tempo. Uma tendência no aumento foi observada em relação a umidade.

Lai et al. (1995) verificaram o efeito do tempo de estocagem do ovo em pó em relação ao colesterol, trabalhando com o produto obtido por sistema de aquecimento indireto do ar (elétrico), embalado em bolsa plástica (*polyethylene-laminated nylon*) sob vácuo, e avaliando os óxidos epóxidos, α e β , e os derivados do C-7 ($7\alpha\text{-OH}$, $7\beta\text{-OH}$ e 7-ceto). O total de óxidos quantificados no tempo inicial era de $8,57\mu\text{g/g}$; aos 6 meses de estocagem aumentou para $42,54\mu\text{g/g}$, cerca de cinco vezes mais. Quanto à participação dos óxidos, os do C-7, que no início do experimento correspondia a 65,5% do total, foi reduzida para 42,1%; a dos óxidos epóxidos aumentou, de 34,5% para 57,9%.

A tendência de redução na formação do 7-cetocolesterol livre observada após o 150º dia de estocagem (Tabela 10; Figura 3),

eventualmente poderia ser explicada com base nestes resultados de Lai et al. (1995).

Tabela 12: Umidade e lípidos totais (g/100g) em ovo integral em pó, estocado à temperatura ambiente.

		Tempo de estocagem (dias)							
		0	30	60	90	120	150	180	224
Umidade (g/100g)									
Amostras									
1	2,27±0,05	2,27±0,06	3,77±0,09	4,27±0,03	3,68±0,19	5,0±0,15	5,44±0,24	5,93±0,09	
	2,20	2,64	2,30	0,70	5,16	3,0	4,41	0,16	
2	2,50±0,01	1,29±0,07	4,21±0,06	4,20±0,05	4,45±0,15	5,96±0,18	5,64±0,14	6,57±0,59	
	0,40	5,42	1,43	1,19	3,37	3,02	2,48	0,90	
3	2,67±0,07	2,69±0,06	4,25±0,03	4,88±0,04	4,5±0,01	5,19±0,19	6,06±0,14	5,96±0,10	
	2,62	2,23	0,71	0,82	0,22	3,66	2,31	0,17	
M	2,48 ^a	2,08 ^a	4,07 ^b	4,45 ^b	4,21 ^b	5,38 ^c	5,71 ^c	6,16 ^c	
DP	0,20	0,72	0,27	0,37	0,46	0,51	0,32	0,36	
CV	8,09	6,53	6,53	8,40	10,92	9,44	5,60	5,82	
Lípides (g/100g)									
Amostras									
1	35,15±0,04	34,69±0,06	35,39±1,74	33,03±2,5	38,70±0,02	36,23±0,54	36,52±0,77	33,90±0,14	
	0,11	0,17	4,92	7,57	0,05	1,49	2,11	0,04	
2	29,59±0,05	29,49±0,06	34,46±2,00	34,66±2,35	33,63±0,24	34,99±0,71	32,4±1,92	30,99±0,14	
	0,16	0,20	5,80	6,78	0,71	2,03	5,92	0,05	
3	30,68±0,07	31,99±0,08	31,98±1,57	32,67±1,57	33,38±0,46	34,16±0,24	30,18±0,17	28,25±0,36	
	0,23	0,25	4,91	4,81	1,38	0,70	0,56	0,13	
M	31,81 ^a	32,06 ^a	33,94 ^a	33,45 ^a	35,2 ^a	35,13 ^a	33,04 ^a	31,05 ^a	
DP	1,10	1,46	1,31	1,0	1,0	0,52	1,50	2,82	
CV	3,48	4,56	3,85	2,99	2,83	1,49	4,54	9,09	

Letras superescritas iguais indicam diferenças estatísticas não-significativas; M = Média (n=3); DP = Desvio-padrão (±); CV= Coeficiente de variação, (%).

A concentração média do 7-cetocolesterol livre verificada no tempo inicial do experimento realizado correspondeu a $76,88 \pm 5,59 \mu\text{g/g}$ de lípidos (Tabela 10). Este nível é menor que o da maioria das amostras representadas na Tabela 8.

O tempo inicial do experimento que ensaiou a estocagem do ovo integral em pó correspondeu às amostras com tempo de fabricação de 7 a 15 dias. Por isso, é bem provável que a oxidação do colesterol registrada já

no início do experimento tenha se dado mais acentuadamente durante o processamento, conforme apontado anteriormente.

A suspeita recai sobre o processo, pelos antecedentes conhecidos indicados na literatura, e em razão de a matéria-prima, no caso o ovo, não apresentar oxidação do colesterol estando no estado fresco, (Sarantinos et al., 1993; Nooroz-Zadeh, Alppelqvist, 1987; Tai et al., 1999; Guardiola, 1994; Zunin et al. 1995).

Em condições de aquecimento do ar com chama direta (gás), uma das formas empregadas no processo de atomização do ovo (integral ou gema), tem sido apontada formação significativa de óxidos de colesterol. Essa formação de óxidos é em decorrência da produção de óxidos de nitrogênio (NO, NO₂) gerados na combustão do gás, que podem atuar como iniciadores da autooxidação do colesterol (Lai et al., 1995; Tsai, Hudson, 1985; Morgan, Armstrong, 1992).

Em condições de aquecimento indireto do ar (elétrico) no processo de atomização, foi verificado que a alteração das temperaturas (de entrada/saída) de 170/117°C para 225/140°C promovia acréscimo na formação de óxidos de colesterol: 71,82% de α -epóxido, 51,43% de 7 β -OH, 52,36% de Triol, 35,27% de 7-ceto e 25,32% de 25-OH (Guardiola et al., 1997).

Com base no exposto, é importante considerar a sugestão para que o processamento, assim como os equipamentos usados na fabricação de ovo em pó ou gema em pó, sejam avaliados em relação à oxidação do colesterol. O objetivo é o de tornar nula, ou reduzir a um mínimo inevitável, a formação de óxidos de colesterol.

5.4. Ocorrência de colesterol e 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos

Onze marcas de macarrão contendo ovos, disponíveis no mercado local, com validade entre dezembro de 2003 a julho de 2005, foram examinadas quanto ao conteúdo de colesterol (Tabela 13). Níveis entre

11,06 a 155,88mg/100g de produto (base seca) foram constatados. Em quatro amostras os teores eram relativamente elevados, de 72,50 a 155,88mg/100g. Em sete (64%) das 11 marcas estudadas a concentração de colesterol estava abaixo do valor declarado pelo fornecedor. No caso mais crítico (Nissin-Miojo), apenas 22% de colesterol foi encontrado tendo por base as informações do fabricante.

Os níveis relativamente elevados das quatro das marcas indicadas não estariam atendendo a tendência atual de consumo de alimentos com baixos teores de colesterol. O macarrão é um alimento de largo consumo (inclusive infantil) e de importância fundamental. Os principais consumidores eram, em 2001, a Itália e Venezuela, com 28 e 12,7Kg/pessoa/ano, respectivamente. O consumo registrado no Brasil (13º colocado) era de 5,7Kg/pessoa/ano (UN.I.P.I., 2002).

O teor de colesterol tem sido utilizado como parâmetro da qualidade do macarrão com ovos. Segundo as normas vigentes, o produto deve conter no mínimo 3 ovos ou 0,450g de colesterol/Kg (Brasil, 1978). Pelos resultados da Tabela 13, 7 (64%) das 11 marcas analisadas não atendem a essa recomendação legal, significando fraude.

O método oficial, para quantificação de colesterol em macarrão contendo ovos pela Legislação do Estado de São Paulo é colorimétrico (Inst. Adolfo Lutz, 1985) e, por medir esteróis totais, tem sido criticado. Marsiglia et al. (1994) empregaram o método oficial, com modificações visando melhoria nos resultados. Encontraram que 4 (44%) das 9 amostras analisadas estavam em desacordo com a legislação vigente, semelhantemente ao indicado na Tabela 13. Bragagnolo, Rodriguez-Amaya (1993) compararam o método oficial (Inst. Adolfo Lutz, 1985) com um método envolvendo a quantificação por HPLC. Observaram que o colorimétrico superestimava os resultados em 23,68 a 95,24%. Os teores de colesterol verificados em macarrão contendo ovos, por Bragagnolo, Rodriguez-Amaya (1993), foram de 2 a 24mg/100g, abaixo da exigência legal.

Foi verificada a ocorrência de 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos, entre 30,49 a 157,25µg/g de lípides (Tabela 13). Os resultados de literatura estão bem abaixo, 6,3 a 57µg/g de lípides (Zunin et al.,1996), sendo que 87,5% das amostras apresentaram quantidades menores que 20µg/g de lípides. Nos resultados do presente trabalho, 90,91% das marcas apresentaram teores superiores a 50µg/g de lípides. De acordo com Zunin et al. (1996), níveis altos de 7-cetocolesterol livre podem ser devido à utilização de ovo em pó na fabricação do macarrão e, baixos, pelo o uso de ovo líquido (cru).

Tabela 13: Colesterol e 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos, em base seca

Marcas	Colesterol (mg/100g)		7-cetocolesterol livre	
	Encontrado*	Declarado**	µg/g de amostra*	µg/g de lípides*
Renata	26,14	45	0,22	94,23
Carrefour	23,94	45	0,24	106,81
Petybon	22,35	45	0,12	54,40
Adria	72,50	50	0,37	157,25
Paty	43,76	45	0,07	30,49
Dona Benta	19,75	45	0,16	71,28
De Cecco	155,88	95	0,36	156,55
Barilla	107,91	100	0,24	105,31
Mazzarella	29,57	45	0,20	87,98
Cadoro Di	97,36	105	0,24	106,42
Venezi				
Nissin – Miojo	11,06	50	0,23	101,84
M ± DP	55,47 ± 46,78	60,91 ± 25,28	0,22 ± 0,09	97,51 ± 37,99
CV	8,43	4,15	4,01	3,89

M = Média (n=3); DP = Desvio-padrão (±); CV= Coeficiente de variação, (%), *Resultados em duplicata, ** Informação contida no rótulo do produto.

Os teores de lípides totais e de umidade verificados na Tabela 14 definem a existência de homogeneidade entre as amostras analisadas, principalmente quanto aos lípides totais, entre 4,87 a 5,97g/100g. Níveis de lípides nas amostras de macarrão com ovos são maiores que os relatados por Zunin et al. (1996), 3 a 4g/100g, e Lercker, Rodriguez-Estrada (2000), 0,8 a 2,9g/100g.

Tabela 14: Lípidos totais (base seca) e umidade na amostra de macarrão contendo ovos.

	Lípidos totais (g/100g)	Umidade (g/100g)
Renata	5,97 ± 0,02 (0,34)	8,74 ± 0,56 (6,41)
Carrefour	5,36 ± 0,43 (8,04)	10,42 ± 0,59 (5,66)
Petybon	5,52 ± 0,39 (7,07)	10,32 ± 0,69 (6,69)
Adria	5,42 ± 0,01 (0,18)	7,92 ± 0,04 (0,51)
Paty	5,63 ± 0,22 (3,91)	8,63 ± 0,85 (9,85)
Dona Benta	5,24 ± 0,20 (3,82)	7,23 ± 0,04 (0,55)
De Cecco	5,74 ± 0,01 (0,17)	7,90 ± 0,49 (6,20)
Barilla	5,20 ± 0,42 (8,08)	7,86 ± 0,06 (0,76)
Mazzarella	5,25 ± 0,07 (1,33)	9,57 ± 0,15 (1,57)
Cadoro Di Venezi	4,87 ± 0,01 (0,21)	11,16 ± 0,94 (8,42)
Nissin - Miojo	5,76 ± 0,21 (3,64)	10,62 ± 0,90 (8,47)

M±DP (n=3); CV= Coeficiente de variação, %

A presença de colesterol oxidado, verificada no produto examinado (Tabela 13), não permite uma avaliação toxicológica conclusiva, a não ser pelo reconhecimento do que poderia estar sendo ingerido em relação ao 7-cetocolesterol livre.

Se o consumo brasileiro, por exemplo, fosse somente de macarrão com ovos, contendo o produto 0,22µg de 7-cetocolesterol livre/g (Tabela 13), através das 15,83g diárias (5,7Kg/pessoa/ano; UN.I.P.I., 2002), haveria uma contribuição para a ingestão desse óxido de 3,48µg/pessoa/dia. Considerando também, que se o 7-cetocolesterol livre representasse 50% dos óxidos formados, a contribuição do macarrão com ovos na ingestão do total de OsC seria de 6,98µg/pessoa/dia. Esta ingestão de 7-cetocolesterol livre pode ser representativa, se comparada à ocorrência do 7-ceto no plasma de sujeitos saudáveis - 0,022 a 4,45mg/L – valores, estes reunidos na literatura por Linseisen, Wolfram (1998b).

Os conhecimentos atuais, no entanto, não permitem ainda reconhecer as quantidades dos OsC presentes em alimentos que possam representar risco ao consumidor. Entre as dificuldades estão o perfil variável dos óxidos quando formados nos diferentes alimentos, e a biodisponibilidade de cada um deles, de difícil avaliação, considerando as diferenças individuais observadas na absorção (Linseisen, Wolfram, 1998a).

5.5. Avaliação da estabilidade oxidativa do colesterol em macarrão contendo ovos

Duas marcas de macarrão contendo ovos foram utilizadas na avaliação da estabilidade oxidativa do colesterol, com a comparação dos resultados entre os produtos que não sofreram cozimento e os cozidos. O aquecimento imposto correspondeu ao proposto pelo fabricante, executado antes do consumo.

Os resultados originalmente foram obtidos expressos em $\mu\text{g/g}$ de lípides. Como os níveis lipídicos das duas marcas ensaiadas eram bastante próximos (Tabela 14), os resultados foram calculados e expressos também em $\mu\text{g/g}$ de produto (Tabela 15).

De acordo com a Tabela 15, houve um aumento (aparente) não significativo estatisticamente de 6,7% e 20,2%, respectivamente, nos conteúdos de 7-cetocolesterol livre nas duas marcas de macarrão tratadas termicamente. No entanto, estes resultados, analisados em relação ao teor de colesterol, indicam a mesma formação de 7-cetocolesterol livre, cerca 0,06%, nos dois produtos.

Tabela 15: 7-cetocolesterol livre em macarrão contendo ovos em base seca, não-cozido e cozido.

Marcas	7-cetocolesterol livre ($\mu\text{g/g}$)		7-cetocolesterol livre ($\mu\text{g/g}$ de lípides)	
	Não-cozido	Cozido	Não-cozido	Cozido
De Cecco*				
1	0,35	0,39	161,21	174,44
2	0,33	0,35	153,93	161,33
3	0,28	0,31	131,01	140,24
M $\pm$ DP	0,32 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,04	148,72 ^a $\pm$ 15,76	158,67 ^a $\pm$ 7,25
CV	11,26	11,43	10,59	10,87
Dona Benta**				
1	0,16	0,20	76,06	93,42
2	0,12	0,19	68,35	85,07
3	0,13	0,15	62,76	70,56
M $\pm$ DP	0,14 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,03	69,06 ^a $\pm$ 6,68	83,02 ^a $\pm$ 11,57
CV	15,23	14,69	9,67	13,93

Teor de colesterol: (*) 155,88mg/100g; (**) 19,75mg/100g; Letras superescritas iguais indicam diferenças estatísticas não-significativas; M = Média (n=3); DP = Desvio-padrão ($\pm$); CV= Coeficiente de variação, (%).

Os resultados obtidos sugerem estudos adicionais para melhor avaliar a estabilidade do colesterol nas condições indicadas principalmente quando este último está presente em grandes quantidades, como foi observado em algumas amostras (Tabela 13).

Conclusões

6. Conclusões

- O 7-cetocolesterol livre ocorreu em ovo integral em pó e em macarrão contendo ovos, indicando a presença de colesterol oxidado.
- O emprego do 7-cetocolesterol livre não permitiu indicar com clareza a oxidação do colesterol em ovo integral em pó durante a estocagem.
- Os resultados de 7-cetocolesterol livre e TBARS observados durante a estocagem do ovo integral em pó, guardaram entre si correlação significativa.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas¹

ADDIS, P.B.; PARK, P.W.; GUARDIOLA, F.; CODONY, R. Analysis and health effects of cholesterol oxides. In: McDONALD, R.E.; MIN, D.B.J. ed: **Food lipids and Health**. Marcel Dekker, 1996. p.99-240.

ANSARI, A.S.; SMITH, L.L. Assay of cholesterol autoxidation, *Methods in Enzymology*. ed. Copyright, **Academic**, London, v.233, 1994, cap. 35, p.332-338.

BASCOUL, J.; DOMERGUE, N.; MOUROT, J.; DEBRY, G.; CRASTES DE PAULET, A. Intestinal absorption and fecal excretion of 5,6 α -epóxy-5 α -cholesta-3 β -ol by the male wister rat. **Lipids**, Champaign, v.21, n.12, p.744-747, 1986.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, Montreal, v.37, p.911-917, 1959.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Avaliação do teor de colesterol como parâmetro de controle de qualidade para massas com ovos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.53, n.1/2, p.21-26, 1993.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Comparison of the cholesterol of Brazilian chicken and quail eggs. **J. Food Compos. Anal.**, Roma, v.16, p.147-153, 2003.

BRASIL 1978. Resolução nº12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padões para Alimentos. **Diário Oficial da União**, 24 jul. 1978. Seção 1, p.11499-577. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, relativas a alimentos. Corrigidas pelo Comunicado nº37/80 da Divisão Nacional de Normas de Vigilância Sanitária de alimentos.

BROWN, O.; JESSUP, W. Oxysterols and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Shannon, v.142, p.1-28, 1999.

¹ Referências bibliográficas de acordo com a norma ABNT – NBR 6023/2000

CHEN, B.H.; CHEN, Y.C. Evaluation of the analysis of cholesterol oxides by liquid chromatography. **J. Cromatogr., A**, Amsterdam, v.661, p.127-136, 1994.

COSTA NETO, P.L.O. Estatística. Ed. Edgard Bucher Ltda, São Paulo, 1ªed, 1977, 264p.

CSALLANY, A.S.; KINDOM, S.E.; ADDIS, P.B.; LEE, J. HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Lipids**, Champaign, v.24, n.7, p.645-651, 1989.

DU.M.; AHN,D.U. Effects of antioxidantes and packaging on lipid and cholesterol oxidation and color changes of irradiated egg yolk powder. **J. Food Sci.**, Chicagi, v.65, n.4, p.625-629, 2000.

DUTTA, P.C.; CABONI, M.F.; DICZFALUSY, V.; DIONISI, F.; DZELETOVIC, S.; GRANDGIRARD, A.; GUARDIOLA, F.; KUMPULAINEN, J; LBOVICS, V.K., PHILAVA, J-M.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; ULBERT, F. **Measurement of cholesterol oxides in foods: results of an interlaboratory comparison study**. In: KUMPULAINEN, J.T.;SALONEN, J.T. Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, p.309-315.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Organization de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Out 2002. Disponível <http://www.rlc.fao.org>. acesso em: bases de datos , 2002.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lípides from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.726, p. 497-509, 1957.

FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. **Quality assurance in analytical chemistry**, Weinheim: VCH, 1995, 238p.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P.B; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Biological effects of oxysterols: current status. **Food Chem. Toxic.**, Osford, v.34, n.2, p.193-211, 1996.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; MISKIN,D.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Oxysterol formation in egg powder and relationship with other quality parameters. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.1903-1907, 1995.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Formación de derivados oxidados del colesterol en alimentos. **Graxas Aceites**, Sevilla, v.45, n.3, p.164-192, 1994.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; GRAU, A.; JORDÁN, A.; BOATELLA, J. Oxysterol formation in spray-dried egg processed and stored under various conditions: prevention and ralationship whith other quality parameters. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, p.2229-2243, 1997.

HUBER, K.C.; PIKE, O.A.; HUBER, C.S. Autioxidant inhibition of cholesterol oxidation in a spray-dried food system during accelerated storage. **J. Food Sci.**, Chicago, v.60, n. 5, p.909-916, 1995.

HUI, Y.H.; WILEY, L.J.; & SONS. INC, Bailey's Industrial Oil & Fat Products; v:1, Edible Oil & Fat Products, General aplications, 1996, p.441-503.

IMAI, H.; WERTHESSEN, N.T.; SUBRAMANYAM, V.; LEQUESNE, P.W.; SOLOWAY, A.H.; KANISAWA, M. Angiotocity of oxigenated sterols and possible precursors. **Science**, London, v.207, p.651-653, 1980.

IMAI, H.; WERTHESSEN, N.T.; TAYLOR, C.B.; LEE, K.T. Angiotoxicity and atherosclerosis due to contaminants of U.S.P. grade cholesterol. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.100, p.565-572, 1976.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Inst. Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3d., São Paulo, 1985. 533p.

KIM, S.K.; NAWAR, W.W. oxidative interaction of cholesterol with triacylglycerols. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.68, p.931-933, 1991.

LAI, S.; GRAY, J.I.; BUCKLEY, D.J.; KELLY, P.M. Influence of free radicals and other factors on formation of cholesterol oxidation products in spray-dried whole egg. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p. 127-1131, 1995.

LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and protherosclerotic effects (review). **J. Nutrit. Biochem.**, v.13, p.700-710, 2002.

LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T., Cholesterol oxidation: presence of 7-ketocholesterol in different food products. **J. Food Compos. Anal.**, Roma, v.13, p.625-631, 2000.

LI, N.; OHSHIMA, T.; SHOZEN, K.-I.; USCHIO, H. KOIZUMI, C. Effects of degree of unsaturation of coexisting triacylglycerols on cholesterol oxidation. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.71, n.6, p.623-627, 1994.

LI, S.X.; CHERIAN, G.; AND SIM, J.S. Cholesterol oxidation in egg yolk powder during storage and heating as affected by dietary oils and tocopherols. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 61, n. 4, p.721-725, 1996.

LIN, C-Y.; MOREL, D.W. Esterification of oxysterols in human serum: effects on distribution and cellular uptake. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.37, p.168-178, 1996.

LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans. **Ann. Nutr. Metab.**, Basel, v.42, p.221-230, 1998a.

LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Origin, metabolism, and adverse health effects of cholesterol oxidation products. **Fett/Lipid**, Weinheim, v.100, n.6, p.211-218, 1998b.

LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. Limit of detection. A closer look at the IUAPAC definition. **Anal. Chem.**, Washington, v. 55, n. 7, p.712-724, 1983.

LUGASI, A.; HÓVÁRI, J.; DWORSCHÁK, E.; NESZLÉNYI, K.; LEBOVICS, V.; ZSINKA, J. N. Effect of UV irradiation on lipid peroxidation in edible fats. **Acta Aliment.**, Budapest, v.24, n. 3, p.269-276, 1995.

LYONS, M.A.; SAMMAN, S.; GATTO, L.; BROW, J.A. Rapid hepatic metabolism of 7-ketocolesterol in vivo: implications for dietary oxysterols. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.40, p.1846-1857, 1999.

MAERKER, G., Cholesterol autoxidation-current status'. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.64, n.3, p.388-392, 1987.

MAERKER, G; UNRUH JR, J. Cholesterol oxides I. Isolation and determination of some cholesterol oxidation products. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.63, n.6, p.767-771, 1986.

MARSIGLIA, D.A.P.; GARBELLOTTI, M.L.; FLORA, C.; ZENEBON, O.; LEONARDO, M.V. Colesterol: modificações da metodologia oficial do Instituto Adolfo Lutz e sua quantificação em massas alimentícias, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.54, n.1, p.51-54, 1994.

MORALES-AIZPURÚA, I.C. **Formação de óxidos de colesterol em maionese mantida em diferentes condições de estocagem.** São Paulo, 2001. 127p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciência Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2001.

MORGAN, J.N.; ARMSTRONG, D.J. Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powders spray-dried with direct heating. **J. Food Sci.**, Chicago, v.57, n.1, p.43-45, 1992.

MOURA, A. F. P. **Efeito do processamento térmico sobre a ocorrência do 7-cetocolesterol em camarão-rosa (*Penaus brasiliensis* + *Penaus paulensis*).** São Paulo, 1999. 87p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

MULLER, H.G.; TOBIN, G. Nutricion y ciencia de los alimentos, **Ed. Acribia**, Zaragoza,(sem data), p.321.

NOUROOZ-ZADEH, J. Determination of the autoxidation products from free or total cholesterol: A new multistep enrichment methodology including the enzymatic release of esterified cholesterol. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, p.1667-1673, 1990.

NOUROOZ-ZADEH, J.; APPELQVIST, L.A. Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: fresh eggs and dehydrated egg products. **J. Food Sci.**, Chicago, v.52, n.1, p.57-67, 1987.

OHSHIMA, T.; LI, N.; KOIZUMI, C. Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.70, n.6, p.595-600, 1993.

OHTANI, K.; MIYABARA,K.; OKAMOTO, E.; KAMEI, M.; MATSUI-YUASA, I. Citotoxicity of 7-cetocholesterol toward cultured rat hepatocytes and the effect of vitamin E. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.60, n.12, p. 989-1993, 1996.

OHTANI, K.; TERADA, E.; KAMEI, M.; MATSUI -YUASA, I. Cytotoxicity of cholestane 3 β ,5 α ,6 β -trol on cultured intestinal crypt cells (IEC-6). **Biosci., Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.61, n.4, p.573-576, 1997.

ORMENESE, R.C.S.C.; LEITÃO, R.F.F.; SILVEIRA, N.F.A.; BALDINI, V.L.S. influência da secagem à alta temperatura nas características das massas com ovos. **Cien. Technol. Aliment.**, Campinas, v. 18, n.1, p.7-12, 1998.

OSADA, K. Cholesterol oxidation products other biological effects. In: : GUARDIOLA, F. DUTTA, P.C., CODONY, R., SAVAGE, G.P., **Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products Analysis, Occurrence, and Biological Effects**, Champaign: AOCS, 2002. cap.14, p.279-318.

OSADA, K.; KODAMA, T.; CUI, L.; YAMADA, K., SUGANO, M. Levels and formation of oxidized cholesterol in processed marine. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.41, p.1893-1998, 1993.

OSADA, K.; SASAKI, M. Lymphatic absorption of oxidized cholesterol in rats. **Lipids**, Champaign, v.29, n.8, p.555-559, 1994.

PANIANGVAIT, P.; KING, A.J.; JONES, A.D.; GERMAN, B.G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **J. Food Sci.**, Chicago, v.60, n.6, p.1159-1174, 1995.

PARK, P.W.; GUARDIOLA, F.; PARK, S.H.; ADDIS, P.B. Kinetic evaluation of 3 β -hydroxycholest-5-en-7-one (7-ketocholesterol) stability during saponification. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.73, n.5, p.623-629, 1996.

PENAZZI, G.; CABONI, M. F.; ZUNIN, P.; EVANGELISTI, F.; TISCORNIA, E.; TOSCHI, T.G.; LERCKER, G. Routine high-performance liquid chromatographic determination of free 7-ketocholesterol in some foods by two different analytical methods, **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.72, n.2, p.1523-1527, 1995.

PENG, S.; HU, B.; MORIN, R.J. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.5, p.144-152, 1991.

PIE, J.E.; SPAHIS, K.; SEILLAN, C. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, p.973-979, 1990.

RAZZAZI-FAZZELI, E.; KLEINEISEN, S.; LUF, W. Determination of cholesterol oxides in processed food using high-performance liquid chromatograph-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.896, p.321-334, 2000.

SANDER, B.D.; ADDIS, P.B.; PARK, S.W.; SMITH, D.E. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v. 52, n.2, p.109-114, 1989.

SARANTINOS, J.; O'DEA, K.; SINCLAIR, A.J. Cholesterol oxides in Australian foods identification and quantification. **Food Aust.**, North Sydney, v.45, n.10, p. 485-490, 1993.

SEVANIAN, A.; PETERSON, A.R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.24, n.10/11, p. 1103-1110, 1986.

SIM, J.S.; NAKAI, S. Egg uses and processing technologies. New Developments, **Cab Internat.**, Wallingford, 1994, 436p.

SMITH, L.L., Cholesterol autoxidation 1981-1986, **Chem. and Phys. Lipid**, Shannon, v.44, p.87-125, 1987.

SMITH, L.L., Mechanisms of formation of oxysterols: a general survey. In: CRASTES DE PAULET, A.; DOUTÉ-BLAZY, L. PAOLETTI, R. eds: **Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids**, New York: Plenum Press, 1990. p. 115-132. (NATO ASI series. Séries A, Life Sci., v.189). (Proceedings of free radicals and active forms of origin on lipoproteins and membrane lipids: cellular interactions and atherogenesis, 1988, Bandol, France).

SMITH, L.L. Cholesterol autoxidation. Plenum, p.49-123, 1981. Apud: SMITH, L. L. Review of progress in sterol oxidation: 1987 – 1995. **Lipids**, Champaign, v. 31, n. 5, p.453 – 487, 1996.

SMITH, L.L.; JOHNSON, B.H. Biological activities of oxysterols. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.7, p.285-332, 1989.

STAPRANS, I.; PAN, X.-M.; RAPP, L.H.; FEINGOLD, K.R. Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum. **J. Lipid Res.** Bethesda, v.44, n.4, p.705-715, 2003.

TAI, C.Y.; CHEN, Y.C.; CHEN, B.H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (Part I). **J. Food Drug Anal.**, Nankang, v.7, n.4, p.243-257, 1999.

TAI, C.Y.; CHEN, Y.C.; CHEN, B.H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (Part II). **J. Food Drug Anal.**, Nankang, v.8, n.1, p.1-15, 2000.

TAYLOR, C.B.; PENG, S.K.; WERTHESEN, N.T.; THAM, P. LEE, K.T. Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.32, p.40-57, 1979.

TAYLOR, F.R.; SAUCIER, S.E.; SHOWN, E.P.; PARISH, E.J.; KANDUTSCH, A.A. Correlation between oxysterol binding to a cytosolic binding protein and potency in the repression of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.259, p.12382-12386, 1984.

TENUTA-FILHO, A.; MORALES-AIZPÚRUA, I.C.; MOURA, A.F.P.; KITAHARA, S.E., Óxidos de colesterol em alimentos. **Rev. Brás. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v.39, n.3, p.319-325, 2003.

TSAI, L.S.; HUDSON, C.A. Cholesterol oxides in commercial dry egg products: quantitation. **J. Food Sci.**, Chicago, v.50, p.229-231, 1985.

UN.I.P.I. UNIONE INDUSTRIALI PASTAI ITALIANI. Disponível em <http://www.unipi-pasta.it>, acesso em: economia & impresa, última modificação: 12 dez. 2002.

VAN DE BOVENKAMP, P.; KOSMEIJER-SCHUIL, T.G.; KATAN, M.B. Quantification of oxysterols in dutch foods: egg products and mixed diets. **Lipids**, Champaign, v.23, n.11, p.1079-1085, 1988.

VINE, D.F.; CROFT, K.D.; BEILIN, L.J.; MANO, J.C.L. A. Absorption of dietary cholesterol oxidation products and incorporation into rat lymph chylomicrons. **Lipids**, Champaign, v.32, n.8, p.887-893, 1997.

VINE, D.F.; MANO, J.C.L.A.; BEILIN, L.J.; MORI, T.A.; CROFT, K.D. Dietary oxysterols are incorporated in plasma triglycerid-rich lipoproteins, increase their susceptibility to oxidation and increase aortic cholesterol concentration of rabbits. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.39, p.1995-2004, 1998.

VYNCKE, B.W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittl**, Leinfelden, v.72, n.12, p.1084-1087, 1970.

ZUNIN, P.; EVANGELISTI, F.; CABONI, M.F.; PENAZZI, G.; LERCKER, G.; TISCORNIA, E. Cholesterol oxidation in Baked foods containing fresh and powdered eggs. **J. Food Sci.**, Chicago, v.60, n.5, p.913-916, 1995.

ZUNIN, P.; EVANGELISTI, F.; CALCAGNO, C.; TISCORNIA, E. Cholesterol oxidation in dried egg pasta: detecting 7-ketocholesterol content. **Cereal Chem.**, St. Paul, v.73, n.6, p.691-694, 1996.