

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

**Efeito do processamento e da estocagem sobre a formação de
óxidos de colesterol em ovos**

Sandra Emi Kitahara

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientador:
Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho**

**São Paulo
2004**

19069

DEDALUS - Acervo - CQ



30100010387

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

K62e Kitahara, Sandra Emi
Efeito do processamento e da estocagem sobre a formação
de óxidos de colesterol em ovos / Sandra Emi Kitahara -- São
Paulo, 2004.
80p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Tenuta Filho, Alfredo

I. Ovos : Colesterol : Ciência dos alimentos I. T. II
Tenuta Filho, Alfredo, orientador.

641.375 CDD

Sandra Emi Kitahara

**Efeito do processamento e da estocagem sobre a formação de
óxidos de colesterol em ovos**

**Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho
orientador/presidente**

**Profa. Assoc. Carmen Cecília Tadini
1º. examinadora**

**Profa. Assoc. Elizabeth Aparecida Ferraz Torres
2º. examinadora**

**Prof. Assoc. Luiz Antônio Gioielli
3º. examinador**

**Prof. Tit. Jorge Mancini Filho
4º. examinador**

São Paulo, 27 de Outubro de 2004.

***Aos meus pais, que sempre me apoiaram e
incentivaram, tornando possível mais esta
realização.***

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.

Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Alfredo Tenuta Filho pelo apoio e orientação;

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP pela oportunidade da realização deste curso;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo suporte financeiro e concessão de bolsa de estudo;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, na pessoa do relator, pelas importantes sugestões realizadas ao longo do curso;

Aos professores Carmen Cecília Tadini, Elizabeth Aparecida Ferraz Torres, Luiz Antônio Gioielli e Jorge Mancini Filho, pela participação e importantes sugestões dadas na defesa de tese;

À Ito Avicultura Ind. E Com. S.A., na pessoa de Paulo Barreto, pelo fornecimento das amostras de ovos analisadas;

Ao Laboratório Semi-industrial, pela liofilização das amostras de ovos analisadas;

Ao Laboratório de Lípidos, na pessoa de Rosângela, pela análise do perfil de ácidos graxos;

À Mônica, Tânia e Rogério, da secretaria do B-14, por todo auxílio dispensado;

À Elaine e Jorge, da secretaria de pós-graduação, por todo auxílio dispensado, sempre com muita solicitude e bom humor;

Aos professores Lúcia Pereira Barroso e Rinaldo Artes e também a aluna Paula Matiko Yamakawa, do Departamento de Estatística do IME - USP, pela assessoria estatística prestada;

À Adriana, da biblioteca do conjunto das Químicas, pela extrema simpatia e solicitude no auxílio com as Referências Bibliográficas;

À profa. Inar Alves de Castro, pela análise estatística dos resultados e pela extrema solicitude na realização da mesma;

À Joaquina, por me mostrar que nunca é tarde para aprender e por tantos momentos alegres e descontraídos;

À Lurdinha, por proporcionar um ambiente agradável e por tantos cafezinhos;

Aos amigos do laboratório Andréa, Luciene, Álvaro, Cláudia, Marliz e Jocimar, pelo auxílio e pela amizade;

Aos amigos Angelita, Antonieta, Cida, Henrique, Janice, Marcos, Mariana e Oswaldo por todo incentivo, preocupação e, acima de tudo, pela amizade;

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1- Colesterol e óxidos de colesterol	3
2.1.1- Colesterol	3
2.1.2- Óxidos de colesterol	4
2.2- Oxidação do colesterol	6
2.3- Absorção dos óxidos de colesterol	8
2.4- Efeitos Biológicos	10
2.5- Ovo	12
2.5.1- Aspectos nutricionais	12
2.5.2- Processamento do ovo	16
2.5.2.1- Pasteurização	16
2.5.2.2- <i>Spray-drying</i> - Atomização	16
2.5.2.3- <i>Freeze-drying</i> - Liofilização	17
2.5.3- Oxidação do colesterol no ovo	17
3- OBJETIVOS	19
3.1- Objetivo geral	19
3.2- Objetivos específicos	19
4- MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1- Material	20

4.1.1- Reagentes	20
4.1.2- Amostras - Obtenção e preparo	21
4.1.3- Equipamentos	24
4.2- Métodos	24
4.2.1- Processamentos - Pasteurização, <i>Spray-Drying</i> e <i>Freeze-Drying</i>	24
4.2.2- Determinação da umidade	25
4.2.3- Quantificação de ácidos graxos	25
4.2.4- Quantificação de colesterol e óxidos de colesterol	27
4.2.5- Determinação de lípides totais	31
4.2.6- Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS	31
4.2.7- Validação da metodologia de quantificação de colesterol e óxidos de colesterol	32
4.2.7.1- Precisão	32
4.2.7.2- Recuperação	32
4.2.7.3- Limites de detecção e quantificação	32
4.2.7.4- Intervalo de linearidade da curva de calibração	33
4.2.8- Análise estatística	33
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1- Validação do método de quantificação de colesterol e óxidos de colesterol	34
5.2- Umidade	36
5.3- Lípides totais	39
5.4- Colesterol	42
5.5- Óxidos de colesterol	49
5.6- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS	57
5.7- Perfil de ácidos graxos	60
6- CONCLUSÃO	63
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de colesterol encontradas em alimentos	4
Tabela 2: Composição química do ovo	13
Tabela 3: Condições de análise utilizada para a quantificação de ácidos graxos	25
Tabela 4: Fórmula abreviada, nomenclatura e classificação dos ácidos graxos identificados e quantificados	26
Tabela 5: Condições utilizadas para a análise de colesterol e óxidos de colesterol	28
Tabela 6: Curva de calibração do TEP	31
Tabela 7: Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Precisão e Linearidade das curvas de calibração do colesterol e óxidos de colesterol	36
Tabela 8: Percentagem de recuperação de colesterol e 7-cetocolesterol adicionados ao ovo	36
Tabela 9: Umidade em amostras de ovos e produtos derivados estocados	37
Tabela 10: Umidade em amostras de gema e produtos derivados e Estocados	38
Tabela 11: Concentrações de lípides totais em amostras de ovos e produtos derivados estocados	40
Tabela 12: Concentrações de lípides totais em amostras de gema e produtos derivados estocados	40
Tabela 13: Dados de literatura de percentagem de lípides totais em ovos e produtos derivados	41
Tabela 14: Concentrações de colesterol (mg/100g) em ovo, gema e seus produtos derivados ao longo da estocagem	44

Tabela 15: Concentrações de óxidos de colesterol ($\mu\text{g/g}$) em ovo, gema e seus produtos derivados ao longo da estocagem	49
Tabela 16: Concentrações de TBARS em ovo	58
Tabela 17: Concentrações de TBARS em gema	58
Tabela 18: Percentagens de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados de ovos e gemas	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do colesterol	3
Figura 2a: Produtos formados da oxidação do colesterol	7
Figura 2b: Produtos formados da oxidação do colesterol	8
Figura 3: Valores de vitaminas e minerais encontrados por 100g e a relação % da IDR do ovo	13
Figura 4: Consumo anual per capita de ovos e derivados	14
Figura 5: Planejamento experimental	23
Figura 6a: Cromatograma dos picos dos padrões utilizados para identificação de ácidos graxos	26
Figura 6b: Cromatograma dos picos dos padrões utilizados para identificação de ácidos graxos	27
Figura 7: Espectro UV dos óxidos de colesterol	29
Figura 8a: Cromatograma com os picos de colesterol e 25-hidroxicolesterol	29
Figura 8b: Cromatograma com os picos de 7α-hidroxicolesterol e 7β-hidroxicolesterol	30
Figura 8c: Cromatograma do pico de 7-cetocolesterol	30
Figura 9: Umidade (valores médios dos lotes) das amostras de ovos e gemas frescos e processados ao longo da estocagem	38
Figura 10: Lípides totais (valores médios dos lotes) das amostras de ovos e gemas frescos e processados ao longo da estocagem	41
Figura 11: Teores de colesterol em ovos frescos e estocados sob refrigeração (8 °C)	44
Figura 12: Teores de colesterol em ovos pasteurizados estocados sob refrigeração (8 °C)	45

Figura 13: Teores de colesterol em ovos com colesterol reduzido estocados sob refrigeração (8 °C)	45
Figura 14: Teores de colesterol em ovos liofilizados estocados (28 °C)	45
Figura 15: Teores de colesterol em ovos atomizados estocados (28 °C)	46
Figura 16: Teores de colesterol em gema fresca estocada sob refrigeração (8 °C)	46
Figura 17: Teores de colesterol em gema pasteurizada estocada sob refrigeração (8 °C)	46
Figura 18: Teores de colesterol em gema liofilizada estocada (28 °C)	47
Figura 19: Teores de colesterol em gema atomizada estocada (28 °C)	47
Figura 20: Colesterol (valores médios dos lotes) das amostras de ovos e gemas frescos e processados ao longo da estocagem	48
Figura 21: Correlação entre Lípides Totais e Colesterol	48
Figura 22: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de ovo fresco estocado sob refrigeração (8 °C)	52
Figura 23: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de ovo pasteurizado estocado sob refrigeração (8 °C)	53
Figura 24: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de ovo com teor de colesterol reduzido estocado sob refrigeração (8 °C)	53
Figura 25: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de ovo liofilizado estocado a 28 °C	53
Figura 26: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de ovo atomizado estocado a 28 °C	54
Figura 27: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de gema fresca estocada sob refrigeração (8 °C)	54

Figura 28: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de gema pasteurizada estocada sob refrigeração (8°C)	54
Figura 29: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de gema liofilizada estocada a 28°C	55
Figura 30: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de gema atomizada estocada a 28°C	55
Figura 31: Somatório dos óxidos de colesterol (valores médios dos lotes) das amostras de ovos e gemas frescos e processados ao longo da estocagem	56
Figura 32: Correlação entre Somatório dos óxidos de colesterol e Colesterol	57
Figura 33: TBARS (valores médios dos lotes) das amostras de ovos e gemas frescos e processados ao longo da estocagem	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Atom	Atomizado
CG	Cromatógrafo gasoso
CG-MS	Cromatógrafo gasoso-espectrômetro de massa
Col	Colesterol
Col Red	Colesterol reduzido
COPS	Óxidos de colesterol
DP	Desvio-padrão
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph
LD	Limite de detecção
Liof	Liofilizado
LQ	Limite de quantificação
LT	Lípides totais
MA	Malonaldeído ou aldeído malônico
MONO	Monoinsaturado
Past	Pasteurizado
POLI	Poliinsaturado
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
SAT	Saturado
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
U	Umidade
ω -3	Ômega 3
ω -6	Ômega 6
Σ COPS	Somatório dos óxidos de colesterol

O colesterol é um importante esterol do corpo humano. Faz parte das membranas celulares, sendo portanto encontrado em todos os tecidos. É precursor de inúmeros compostos imprescindíveis ao organismo, como sais biliares e hormônios esteróides. A importância do colesterol no nosso organismo é, portanto indiscutível. Esse composto pode ser sintetizado pelos tecidos humanos ou então obtido através da dieta, sendo amplamente distribuído nos alimentos de origem animal. Alimentos como o ovo, a manteiga e alguns frutos do mar são exemplos de alimentos com relativamente altas concentrações de colesterol.

Sendo um lípide insaturado, o colesterol está susceptível à oxidação formando compostos denominados óxidos de colesterol. Presença de oxigênio, luz e temperatura são alguns fatores predisponentes para a oxidação do colesterol.

A preocupação em relação aos produtos formados pela oxidação do colesterol vem crescendo, pois inúmeros trabalhos demonstram uma atividade biológica associada ao desenvolvimento de doenças como a coronariana e o câncer.

O ovo é um alimento rico em nutrientes e bastante versátil, consumido tanto na sua forma natural como na forma processada, sendo a pasteurização e a desidratação por atomização os principais processamentos utilizados. A estocagem desses produtos durante os seus respectivos prazos de validade poderia acarretar na formação de óxidos de colesterol.

Considerando os fatores predisponentes e a crescente preocupação em relação aos óxidos de colesterol, o presente trabalho teve como objetivo identificar e quantificar esses compostos em um alimento de grande importância nutricional e largamente consumido no Brasil e no mundo.

Para tanto, foram analisadas amostras de ovo integral e gema frescos e processados, estocados durante seus prazos de validade.

Em relação aos processamentos, a atomização e a liofilização tiveram influência na formação de óxidos de colesterol, quantificados com o auxílio de um HPLC. A atomização, assim como a liofilização, influenciou a estabilidade oxidativa, avaliada na forma de concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Já em relação à estocagem, ao longo da vida de prateleira, nenhum parâmetro avaliado apresentou diferença significativa.

The cholesterol is an important sterol of the human body. It is a component of the cellular membranes, therefore being found in all tissues. It is the forerunner of several compounds vital to the organism, as biliar salts and steroid hormones. The importance of cholesterol in our organisms is, therefore unquestionable. This compound could be synthesized by the human tissues or acquired from the diet, being widely distributed in foods of animal origin. Egg, butter and some sea foods are examples of foods with high concentrations of cholesterol.

As an unsaturated lipid, cholesterol is susceptible to oxidation, forming compounds known as cholesterol oxides. Presence of oxygen, light and temperature are some of the pre-conditioning factors for cholesterol oxidation.

The concern in relation to these products formed by the oxidation of cholesterol is growing, because several works show a biological activity associated to the development of diseases, as coronarian disease and cancer.

The egg is a food rich in nutrients and very versatile, consumed so much on its natural form, as on its processed form, being pasteurization and desidratation by atomization the main utilized processes. The storage of these products through their shelf lives could lead to the cholesterol oxides formation.

Considering the pre-conditioning factors and the raising worry related to the cholesterol oxides, the present work had as objective identify and quantify these compounds in a food of great nutritional importance and largely consumed in Brazil and in the world.

Therefore, fresh and processed eggs and egg yolks were analyzed during each shelf life.

In relation to the process, the spray-drying and the freeze drying had influence on cholesterol oxides formation, quantified with a HPLC. The spray drying, as well as the spray drying had influence on oxidation stability, availed as TBARS concentration form.

In relation to the storage during the shelf life, no significant difference was noticed.



INTRODUÇÃO

É de conhecimento geral que o colesterol tem um papel fundamental no desenvolvimento de doenças, especialmente as coronarianas. Muitos estudos demonstram a relação direta entre colesterol da dieta e desenvolvimento destas doenças. Estudos mais recentes têm demonstrado que é o colesterol oxidado que participa diretamente no processo de aterogênese, não havendo evidência experimental indicando a participação do colesterol não-oxidado. Os produtos resultantes da oxidação do colesterol, são compostos formados a partir da reação enzimática ou não-enzimática. Em alimentos, os óxidos de colesterol são formados por processos não-enzimáticos, especialmente por autooxidação.

Inúmeros estudos caracterizam ainda os óxidos de colesterol como sendo citotóxicos, mutagênicos, cancerígenos e inibidores da síntese do colesterol. Considerando então os danos à Saúde Pública, tem sido grande a preocupação dos pesquisadores em identificar e quantificar esses compostos em alimentos, visando desvendar o mecanismo desta formação.

O ovo é o grande vilão na história do colesterol. Tem sido considerado um alimento a ser evitado, ou seja, não consumido, devido ao seu elevado teor de colesterol, em relação aos outros alimentos. Porém, trata-se de um alimento que fornece proteínas de mais alta qualidade nutricional a um baixo custo, além de prover uma distribuição balanceada de minerais e vitaminas (com exceção da vitamina C).

O ovo é um produto bastante versátil, podendo ser consumido na sua forma natural - onde a fritura e o cozimento são comumente utilizados; e na forma processada - como matéria-prima de muitos alimentos industrializados. Dentre esses, destacam-se massas, biscoitos, bolos e maionese.

Em relação ao processamento, alguns parâmetros têm grande influência na oxidação do colesterol. A temperatura é, sem dúvida, um dos mais importantes. Cabe ressaltar que produtos que foram processados-pasteurizados, desidratados por atomização (*spray-dried*) e liofilização (*freeze-dried*) - sofrerão tratamento térmico adicional no preparo do produto final, concorrendo potencialmente para maior formação de óxidos.

A estocagem é outro parâmetro importante. Cada produto é estocado em condições adequadas durante um período de tempo que corresponde ao seu prazo de validade. As condições de estocagem que incluem presença de oxigênio e luz podem favorecer a oxidação do colesterol.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

REVISÃO DA LITERATURA

2.1- COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL

2.1.1- Colesterol

O colesterol é um dos compostos orgânicos biologicamente ativos mais importantes sendo também o principal esteroide do corpo humano (Figura 1). Sendo um esteroide, apresenta a estrutura básica do ciclopentanoperidrofenantreno (quatro anéis condensados A, B, C e D). É encontrado em todos os tecidos, sendo o componente estrutural das membranas celulares e das lipoproteínas plasmáticas. Além disso, é importante na síntese de ácidos biliares e de hormônios esteróides (FAUST & JASSAL, 1993; PINEIRO-AVILA, 1998). Uma parte do colesterol presente no organismo está esterificada no grupo hidroxílico com ácidos graxos com número variável de carbono e de insaturação.

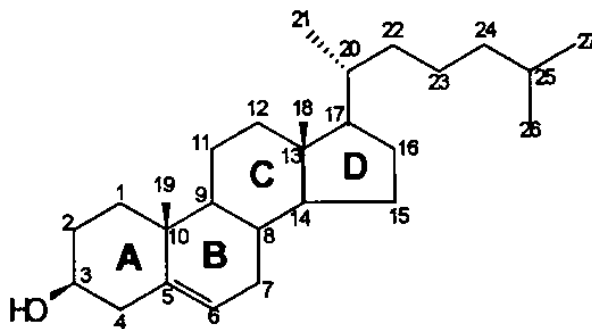


Figura 1: Estrutura do colesterol (GUARDIOLA *et al.*, 2002).

O colesterol pode ser sintetizado pelos tecidos humanos ou então obtido através da dieta. Nos alimentos de origem animal, o colesterol está amplamente distribuído, sendo encontrado em concentrações variadas (Tabela 1) (SWEENEY & WEIHRAUCH, 1976; KING, 1995).

Tabela 1: Concentrações de colesterol encontradas em alimentos

Alimento	Colesterol (mg/100g)
Ovo integral	250 - 385
Manteiga	230 - 307
Leite Integral	9,6 - 17,6
Carne Bovina	41,8 - 88
Carne de Frango c/ pele	57,7 - 99
Carne de porco	33,5 - 105
Salmão	60 - 95
Bacalhau	20 - 46
Truta	40 - 68
Sardinha (fresca/enlat.)	42 /140
Ostras	38 - 63
Mexilhão	26 - 77
Lula	80 - 340
Lagosta	52 - 200
Caranguejo	40 - 140
Camarão	90 - 203

Fonte: SWEENEY & WEIHRACH, 1976; KING, 1995.

Há algum tempo o colesterol tem sido alvo de muitos estudos e discussões, já que sua concentração plasmática foi relacionada com o desenvolvimento de doenças coronarianas e aterosclerose (DVORKIN & NARINOVA, 1990; FENTON, 1992). Dados estatísticos apresentados pela Organização Mundial da Saúde - OMS mostram que as doenças cardiovasculares foram responsáveis por cerca de 5,8 milhões de mortes no ano de 1990 (RINCON, 1997).

2.1.2- Óxidos de colesterol

O colesterol, sendo um lípide insaturado, evidentemente está sujeito à oxidação. Inúmeros compostos são formados, sendo denominados de produtos da oxidação do colesterol ou simplesmente óxidos de colesterol. Dezenas desses óxidos já foram identificados (TAI, 1999a).

Os óxidos de colesterol presentes no organismo podem ser de origem endógena, ou seja, formados no próprio organismo através de reações enzimáticas e não-enzimáticas, ou então obtidos através da dieta (LEONARDUZZI *et al.*, 2002).

A oxidação enzimática do colesterol ocorre por ação de várias enzimas do citocromo P-450 do fígado, como a colesterol-7 α -hidroxilase, 26-hidroxilase, 7-ceto desidrogenase e 5 α , 6 α -epoxidase (LEONARDUZZI *et al.*, 2002).

A formação não-enzimática dos óxidos de colesterol pode ser induzida pela ação de espécies reativas de oxigênio como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido (ROO^{\cdot}) e hidroxila (HO^{\cdot}) (LINSEISEN & WOLFRAM, 1998a).

Pode-se dizer que os alimentos contendo colesterol são potenciais fontes de óxidos de colesterol pela susceptibilidade à oxidação. A extensão da oxidação do colesterol nos alimentos vai depender de sua composição (conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, antioxidantes), do processamento utilizado na sua produção e do seu tempo de estocagem. Por exemplo, o ovo desidratado e leite em pó são alimentos que contém colesterol e que sofreram processamento térmico para sua desidratação. Além de terem relativamente longa vida-de-prateleira, servem de matéria-prima na manufatura de outros produtos, sofrendo portanto novos processamentos. Essas condições tomam esses alimentos altamente susceptíveis à oxidação.

2.2- OXIDAÇÃO DO COLESTEROL

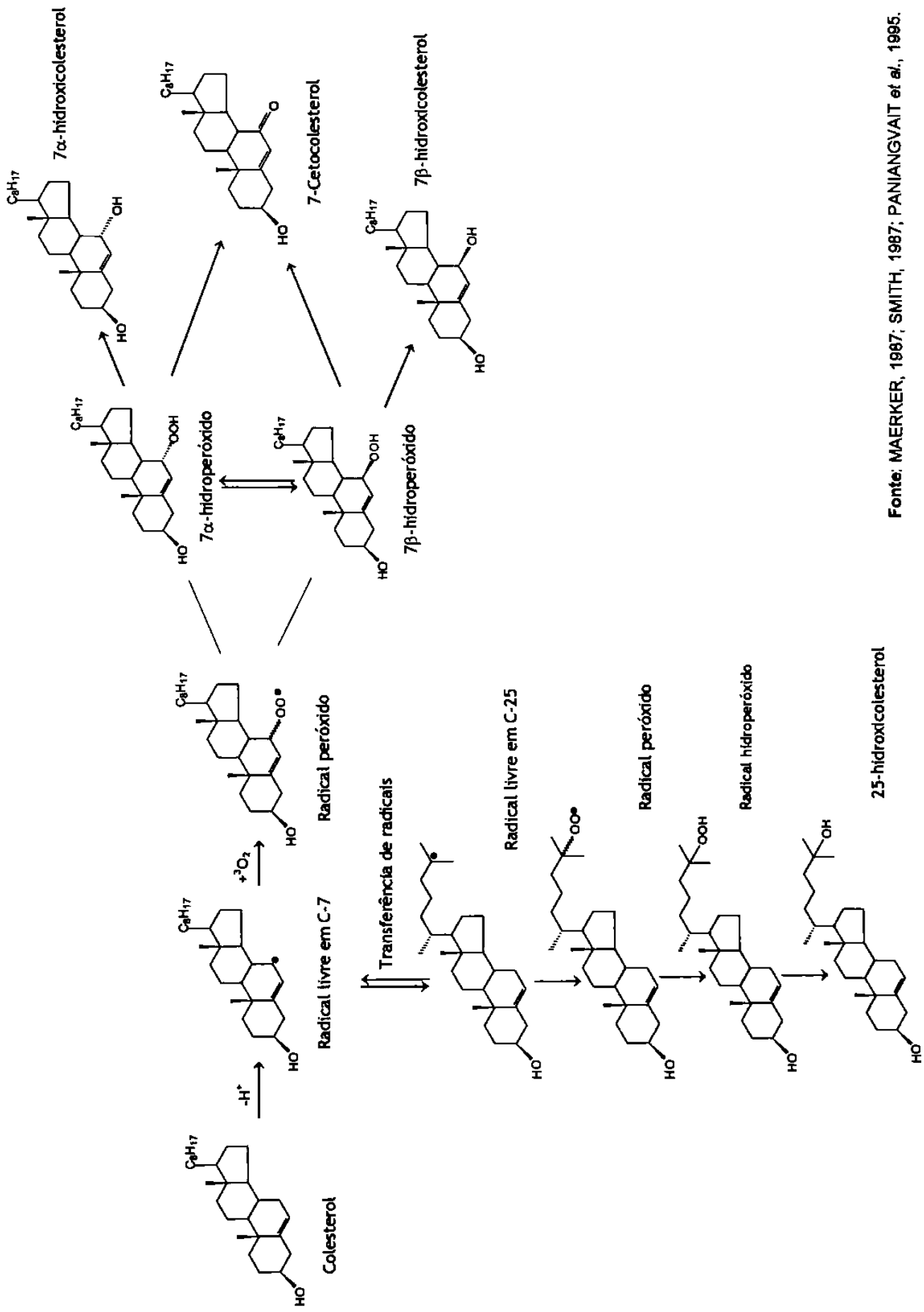
A oxidação do colesterol pode ser iniciada pela retirada do hidrogênio, predominantemente no C-7, formando um radical livre que reage rapidamente com o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) levando à formação de 7α -Colesterol-hidroperóxido (7α -OOH) ou 7β -Colesterol-hidroperóxido (7β -OOH), produtos primários da oxidação do colesterol (Figura 2).

A posterior desidratação do 7α -OOH e 7β -OOH resulta na formação de 7α -hidroxicolesterol, 7β -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol, os produtos secundários da oxidação do colesterol. O 7-cetocolesterol também pode ser formado pela desidrogenação do 7α e 7β -hidroxicolesterol na presença de radicais (Figura 2a).

A interação do colesterol com o 7α -OOH ou 7β -OOH em presença de peróxido de hidrogênio causa a formação de 5α e 5β -epoxicolesterol, os quais, por sua vez, em meio aquoso podem resultar na formação de colestanoltriol (SMITH, 1987; 1990) (Figura 2b).

Após a abstração do hidrogênio e formação do radical livre em C-7, este poderá sofrer uma transferência de radicais, gerando um radical livre em C-25. Este último reage rapidamente com o oxigênio triplete formando o radical peroxila em C-25 e em seguida o 25-hidroperóxido que por desidratação resulta no 25-hidroxicolesterol (Figura 2a).

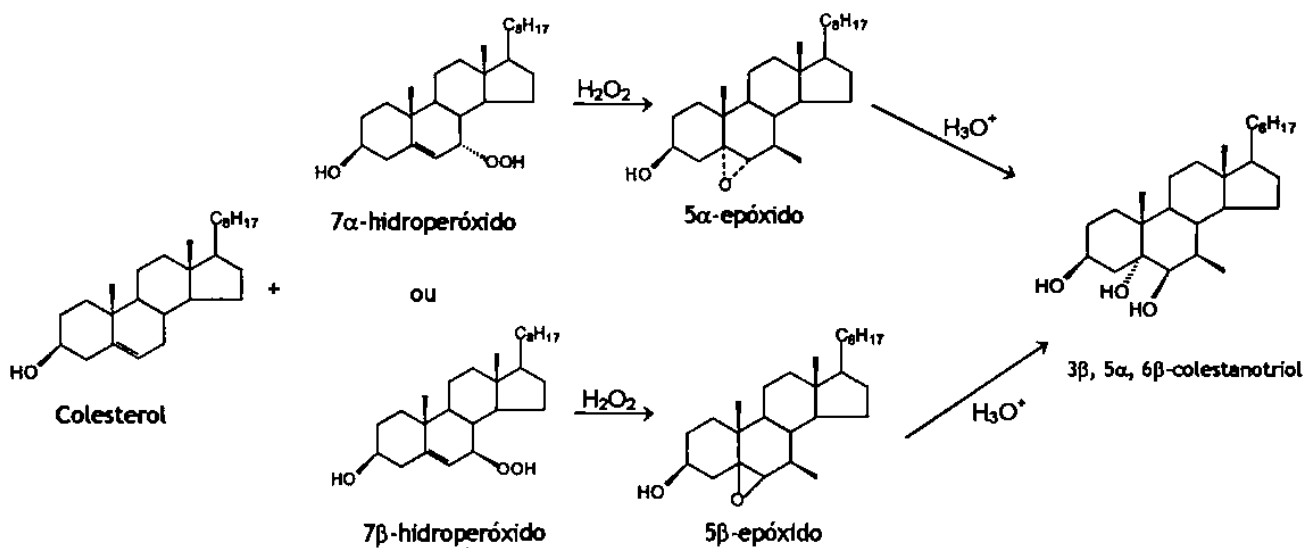
Os óxidos de colesterol mais freqüentemente encontrados em alimentos são o 7-cetocolesterol, 7α - e 7β -hidroxicolesterol, $5,6\alpha$ - e $5,6\beta$ -epoxicolesterol, 20-hidroxicolesterol, triol e 25-hidroxicolesterol (TAI, 1999a).



Fonte: MAERKER, 1987; SMITH, 1987; PANIANGVAIT et al., 1995.

Figura 2a: Produtos formados na oxidação do colesterol.

Luz, oxigênio, radiação, calor, ácidos graxos poliinsaturados e metais de transição são considerados fatores predisponentes, ou seja, fatores que desencadeiam a oxidação do colesterol (KUMAR & SINGHAL, 1991; KIM & NAWAR, 1993; RANKIN & PIKE, 1993; PANIANGVAIT *et al.*, 1995).



Fonte: MAERKER, 1987; SMITH, 1987; PANIANGVAIT *et al.*, 1995.

Figura 2b: Produtos formados na oxidação do colesterol.

2.3- ABSORÇÃO DOS ÓXIDOS DE COLESTEROL

Vários estudos demonstram que os óxidos de colesterol originários da dieta podem ser absorvidos e transportados pelas lipoproteínas plasmáticas. A extensão da absorção encontrada nos diferentes estudos foi bastante variável (BROWN & JESSUP, 1999).

Estudos em humanos e em animais demonstraram que os óxidos de colesterol formados na dieta são absorvidos principalmente no intestino delgado, sendo então transportados pelas lipoproteínas exógenas, quilomícrons (QM) e remanescentes de quilomícron (RQ) (LINSENSEN & WOLFRAM, 1998a,b).

OSADA e colaboradores (1994) observaram que, em ratos, aproximadamente 30% do óxido de colesterol ingerido fora absorvido.

EMANUEL e colaboradores (1991) estudaram a absorção de óxidos de colesterol, comparando indivíduos que consumiram dietas com ovo em pó contendo altas concentrações de óxidos de colesterol, com indivíduos que ingeriram ovos frescos com baixas concentrações de óxidos. Foi verificado um aumento na concentração de óxidos de colesterol no QM e no plasma dos indivíduos do primeiro grupo.

STAPRANS e colaboradores (2003) demonstraram que o consumo de lipídios oxidados resultava na presença de lipídios oxidados nas lipoproteínas plasmáticas de roedores, entre os quais coelhos. Os pesquisadores verificaram que a absorção do colesterol oxidado da dieta, em humanos, é semelhante a de outras espécies, ou seja, o colesterol oxidado é absorvido no intestino delgado e então incorporado por lipoproteínas exógenas (QM e RQ) e endógenas (LDL e HDL). Neste estudo, nos indivíduos controle houve aumento de colesterol oxidado nos QM e RQ logo após a ingestão de uma dieta contendo o colesterol oxidado. Após 10 horas, houve redução e após 24 horas não foi detectada a presença do colesterol oxidado. Semelhantemente, no outro grupo também foi observada a presença de colesterol oxidado na LDL e HDL logo após a ingestão, mas ao contrário do QM e RQ, a presença do colesterol oxidado na LDL e na HDL pôde ser observada durante vários dias.

2.4- EFEITOS BIOLÓGICOS

Uma preocupação maior em relação aos óxidos de colesterol é bastante recente. Pesquisas demonstraram que esses compostos apresentam citotoxicidade, angiotoxicidade e mutagenicidade, e desde então novos estudos têm sido realizados, não só para identificá-los, mas também para quantificá-los, tentando entender como são formados (FINOCCHIARO & RICHARDSON, 1983; FONTANA, 1992; GUARDIOLA, 1995c).

Muitos óxidos de colesterol têm efeitos biológicos potentes que não são observados em relação ao colesterol. Várias pesquisas têm sido realizadas a fim de elucidar as conseqüências toxicológicas da presença de óxidos de colesterol no organismo.

Inúmeros estudos caracterizam os óxidos de colesterol como sendo citotóxicos (OHTANI *et al.*, 1996; 1997), mutagênicos (SEVANI & PETERSON, 1986), cancerígenos (KENDALL *et al.*, 1992), inibidores da síntese do colesterol (GUARDIOLA *et al.*, 1996; LINSEISEN & WOLFRAM, 1998a, b) e aterogênicos (PENG *et al.*, 1991), sendo esta última a propriedade mais referida na literatura.

Várias pesquisas vêm demonstrando que os óxidos de colesterol têm vários efeitos biológicos adversos especificamente nas funções celulares, o que pode levar ao desenvolvimento de doenças como a aterosclerose e o câncer (OHTANI *et al.*, 1997).

As evidências relatadas por OSADA e colaboradores (1994) e EMANUEL e colaboradores (1991), de que ratos e seres humanos têm a capacidade de absorver óxidos de colesterol a partir da dieta, sugerem que uma vez na corrente sanguínea os óxidos de colesterol exerceriam os mesmos efeitos citotóxicos observados *in vitro*.

O processo de desenvolvimento da aterosclerose inicia-se com uma lesão no endotélio vascular levando à modificação de sua fluidez, permitindo a penetração de lipoproteínas plasmáticas como o RQ e a LDL e outros constituintes plasmáticos. Fatores de crescimento induzem a proliferação e migração de células musculares lisas para as áreas com lesões endoteliais. Monócitos invadem essa área e tornam-se macrófagos. Esses macrófagos são internalizados degradando então a LDL, resultando na formação de células espumosas (GUARDIOLA *et al.*, 1996; BROWN & JESSUP, 1999).

Em estudo realizado por IMAI e colaboradores, em 1980, foi observada a importância dos óxidos de colesterol no desenvolvimento de injúria na parede arterial, dando início a essas lesões ateroscleróticas. O colesterol teria um papel secundário no desenvolvimento da aterosclerose, ou seja, ele apenas se depositaria no interior e entre as células espumosas dos vasos sanguíneos após a formação da lesão.

O mesmo resultado foi observado em estudo realizado por HENNIG & BOISSONNEAULT (1987). Nesse referido estudo, houve o aumento da permeabilidade da membrana vascular, em consequência da exposição ao $3\beta,5\alpha,6\beta$ -colestanoetriol.

O acúmulo de colesterol e seus ésteres, a proliferação de células musculares lisas, a síntese de colágeno e elastina e o depósito de cálcio levam à formação de placas ateromatosas (GUARDIOLA *et al.*, 1996).

Os óxidos de colesterol estariam relacionados a outras alterações : inibição da síntese do colesterol endógeno, através da inibição da atividade da enzima 3-hidroxi, 3-metilglutaril Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) (KANDUTSCH & CHEN, 1973; SMITH & JOHNSON, 1989.), redução da fluidez das membranas e modificação no fluxo de componentes do

plasma (cálcio e LDL) (ADDIS, GUARDIOLA, CODONY, 1996; GUARDIOLA *et al.*, 1996; MOREL & LIN, 1996). Essas alterações explicam a ocorrência de angiotoxicidade e subsequente aterogenicidade (PENG *et al.*, 1991).

Em relação à mutagenicidade, alguns estudos sugerem os prováveis efeitos mutagênicos dos óxidos de colesterol, porém sem muito sucesso (LINSEISEN & WOLFRAM, 1998). SEVANI & PETERSON (1986) observaram fraca atividade mutagênica do colesterol α -epóxido em células do pulmão de hamsters. GUARDIOLA e colaboradores (1996) relataram resultados não conclusivos em relação à mutagenicidade dos óxidos de colesterol.

Também em relação à carcinogenicidade, assim como à mutagenicidade, nenhum estudo relevante foi divulgado nos últimos anos, deixando claro a necessidade de mais esforços nesta área (GUARDIOLA *et al.*, 1996).

2.5- OVO

2.5.1- Aspectos nutricionais

Apesar da imagem negativa causada pelas relativamente altas concentrações de colesterol encontradas em ovos, não há dúvida quanto ao valor nutritivo desse alimento. Fornece vitaminas, minerais e proteínas em quantidades e qualidade elevadas, a um baixo custo (SIM, 1998).

Na Tabela 2 é apresentada a composição química do ovo (FRANCO, 1992; SCHERZ, SENSER, SOUCI, 2000; INSTITUTO DE ESTUDIOS DEL HUEVO, 2003) e na Figura 3 os valores de diversos componentes em termos de % da IDR - Ingestão Diária Recomendada para adultos.

Tabela 2: Composição química do ovo

COMPONENTE	Conteúdo/100g
UMIDADE	71,94 - 75,00 g
CINZAS	0,94 - 1,12 g
CARBOIDRATOS TOTAIS	0,70 - 1,42 g
PROTEÍNAS	12,5 - 13,86 g
LÍPIDES	10,7 - 11,66 g
Saturados	3153 mg
Monoinsaturados	4669 mg
Poliinsaturados	1830 mg
COLESTEROL	372 - 680 mg

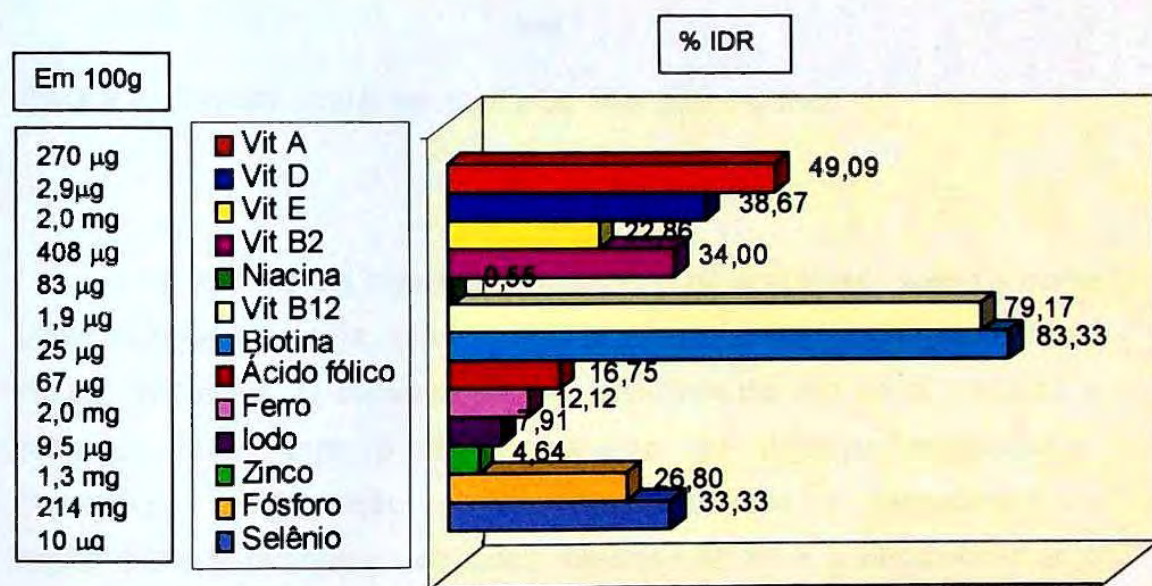


Figura 3: Valores de vitaminas e minerais encontrados por 100 g e a relação % da IDR do ovo (valores para 2500 kcal).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 1987 o consumo brasileiro per capita de aves e ovos era de 22,170 kg/ano. Já, em 1996, esse consumo diminuiu para 21,816 kg/ano (IBGE, 2003). Também foi observada uma diminuição do consumo mundial de ovos e derivados, em decorrência da propaganda negativa em função do alto teor de colesterol (SIM, 1998; ANUALPEC, 2001) (Figura 4).

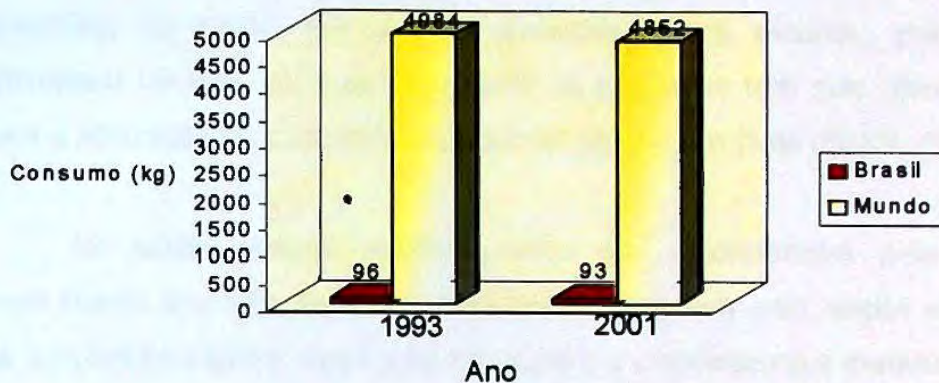


Figura 4: Consumo anual per capita de ovos e derivados.

A dieta contribui com 1/3 do colesterol do organismo, sendo a maior parte endógena, ou seja, 2/3 é fornecido pelo próprio organismo através da síntese endógena. O consumo de ovo isoladamente não seria portanto o principal fator para o desenvolvimento de doenças coronarianas. Obesidade, predisposição genética, sedentarismo e tabagismo são importantes parâmetros associados diretamente com o desenvolvimento dessas doenças (SIM, 1998).

A fim de melhorar a imagem do ovo em relação ao colesterol, visando o aumento de seu consumo, foram desenvolvidos ovos com teor reduzido de colesterol ou ovos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) também chamados de ovos PUFA. No Brasil esses ovos eram inicialmente comercializados com a alegação de que seu consumo reduziria os níveis plasmáticos de colesterol. Em 2003, o Ministério da Agricultura, através da Instrução Normativa n.3, proibiu a comercialização desses ovos até que houvesse comprovação científica da alegação apresentada no rótulo (BRASIL, 2003). Esses ovos são atualmente comercializados sem a referida alegação, mas apenas com a informação "Ovos enriquecidos com ômega-3".

Vários estudos foram realizados no sentido de diminuir a concentração de colesterol em ovos através da dieta fornecida às galinhas poedeiras ou então por seleção genética. Esses estudos, porém não obtiveram sucesso. Mais recentemente as pesquisas têm sido direcionadas para a alteração da composição de ácidos graxos dos ovos (BORN, 1998).

Os ácidos graxos poliinsaturados são reconhecidos pela grande importância que têm na saúde humana. Influenciam uma ampla variedade de funções biológicas sendo essenciais para o crescimento e manutenção do organismo humano. Apresenta um importante efeito benéfico na redução dos riscos de desenvolvimento e no tratamento de doenças cardiovasculares (aterosclerose), na hipertensão, na diabetes e no câncer (SALEM et al., 1996; UAUY & VALENZUELA, 2000).

Por essa razão, o consumo de alimentos com alto teor desses compostos vem sendo incentivado (SIMOPOULOS, LEEF, SALEM, 1999). Os principais ácidos graxos poliinsaturados são pertencentes as classes ω -3 e ω -6. Para a obtenção dos benefícios proporcionados por esses compostos deve-se ter um consumo equilibrado de PUFA ω -3 e ω -6, já que eles possuem funções metabólicas diferentes além de funções fisiológicas opostas. Porém, atualmente, a dieta de muitos países (principalmente os ocidentais) fornece mais PUFA da série ω -6 do que ω -3, dessa forma, têm sido desenvolvidos alimentos enriquecidos com ácidos graxos da série ω -3 como óleo de canola, maionese, margarina, molhos de salada, leite e ovos (SIMOPOULOS, LEAF, SALEM, 1999; SIMOPOULOS, 2000).

Para a obtenção de ovos enriquecidos com ω -3 têm sido realizadas manipulações nutricionais da dieta fornecida às galinhas poedeiras (ELSWYK, 1997). Dessa forma, têm sido acrescentadas à dieta diferentes fontes de ω -3 incluindo produtos marinhos como óleos de peixes e algas marinhas (ELSWYK, 1997; ABRIL & BARCLAY, 1998; GRUNE et al., 2001; BAUCCELLS et al., 2003) e óleos de sementes oleaginosas como linhaça e canola (AYMOND

& VAN ELSWYK, 1995; ELSWYK, 1997; BAUCCELLS *et al.*, 2000; GALOBART *et al.*, 2002; BEAN & LEESON, 2003).

2.5.2- Processamento do ovo

O ovo é um produto bastante versátil. Pode ser consumido na sua forma natural ou então após processamento, como matéria-prima em diversos produtos industrializados, como por exemplo massas alimentícias e maionese.

Os principais processamentos utilizados em ovos são a pasteurização e a secagem por atomização (*spray-drying*).

2.5.2.1- Pasteurização

Trata-se do aquecimento do produto em temperaturas em torno de 70 °C, com redução posterior da temperatura. Tem o objetivo da destruição de microrganismos patogênicos eventualmente presentes nos ovos.

2.5.2.2- *Spray-drying* - Atomização

Trata-se da secagem do produto por atomização. É um processo contínuo onde um líquido ou pasta é transformado em produto seco. O processo consiste basicamente na atomização do líquido, ou seja, na transformação do líquido em gotículas de 10 a 200 µm de tamanho numa câmara, geralmente cônica, que recebe um fluxo de ar quente (180 a 230 °C). A operação está dividida em quatro fases: 1) Atomização do líquido; 2) Contato do líquido atomizado com o ar quente; 3) Evaporação da água; 4) Separação do produto em pó do ar de secagem (EVANGELISTA, 1989; BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998; RAHMAN, 1999).

Além de conferir uma longa vida-de-prateleira ao produto, esse processo de secagem mantém as características sensoriais assim com as propriedades do alimento praticamente inalteradas.

2.5.2.3- Freeze-drying - Liofilização

Nesse processo controla-se a temperatura e a pressão para que ocorra a sublimação da água contida no alimento, ou seja, ocorre a passagem da água do estado sólido (gelo) diretamente para o estado de vapor. Trabalha-se portanto com baixas temperaturas e baixas pressões. A liofilização ocorre em 3 fases: 1) Congelamento; 2) Sublimação e 3) Secagem à vácuo da água ligada ou não-congelável (EVANGELISTA, 1989; BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998).

A grande vantagem deste processo de desidratação é a manutenção da estrutura do alimento, já que ocorre pequena perda do volume e também a manutenção dos compostos voláteis. Em contrapartida, seu alto custo é a principal desvantagem deste processo.

2.5.3- Oxidação do colesterol no ovo

O ovo e os produtos derivados de ovos vêm sendo estudados essencialmente devido a suas altas concentrações de colesterol. Em artigos de revisão, PANIANGVAIT e colaboradores (1995) e TAI, CHEN & CHEN (1999b) citam inúmeros estudos realizados. Os valores relatados são bastante variáveis. Concentrações de 15,6 até 1240 µg/g foram relatadas para o mesmo tipo de matriz.

VAN DE BOVENKAMP, KOSMEIJER-SCHUIL, KATAN (1988) apresentaram concentrações de óxidos de colesterol de 1,2 µg/g em amostras de gema fresca.

A maior parte da literatura concentra-se no estudo de amostras de ovo e gema desidratados e estocados.

NOURROZ-ZADEHL & APPELQVIST (1987), PIE, SAPHIS, SEILAN (1990) e SARANTINOS, O'DEA, SINCLAIR (1993) quantificaram óxidos de colesterol em gema desidratada e estocada. Os valores encontrados variaram de 7,3 a 1132 µg/g.


Já para amostras de ovo desidratado, FONTANA e colaboradores (1993), SARANTINOS, O'DEA, SINCLAIR (1993) e SANDER e colaboradores (1989) relataram valores de 65,3 a 557 µg/g

Apesar dos efeitos benéficos da ingestão de alimentos com alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, esses compostos são altamente susceptíveis à oxidação (PAPAS, 1999) e, além disso, alguns estudos demonstram que a presença desses compostos, uma vez oxidados, favorece a oxidação do colesterol.

KIM & NAWAR (1991) e OHSHIMA, FUJITA, KOIZUMI (1993) avaliaram as interações oxidativas que ocorrem entre diferentes lipídios presentes nos alimentos. A oxidação do colesterol ocorreria de uma forma complexa e seria acelerada pela presença de insaturações na cadeia carbônica de lipídios assim como pela presença de triacilgliceróis, como a trioleína, a trilinoleína e a triestearina

GUARDIOLA e colaboradores (1995b) e LI, CHERIAN, SIM (1996) avaliaram a oxidação do colesterol de ovos desidratados e estocados. Os resultados encontrados indicaram que a temperatura, a estocagem e a presença de ácidos graxos poliinsaturados aceleram a oxidação do colesterol.

OBJETIVOS

 **BIBLIOTECA**
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

3.1- OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de processamentos do ovo integral e da gema, assim como os da estocagem dos produtos processados, sobre a estabilidade do colesterol.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1- Determinar a percentagem de umidade e lípidos totais de ovo integral e gema frescos e ao longo da estocagem;

3.2.2- Quantificar colesterol e óxidos de colesterol em ovo integral e gema frescos;

3.2.3- Avaliar os efeitos da pasteurização, atomização e liofilização do ovo integral e da gema, sobre a formação de óxidos de colesterol;

3.2.4- Avaliar a influência da estocagem sobre a formação de óxidos de colesterol;

3.2.4- Avaliar a estabilidade oxidativa de ácidos graxos insaturados do ovo e da gema em decorrência dos processamentos: pasteurização e desidratação (atomização e liofilização) e durante a estocagem correspondente.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1- MATERIAL

4.1.1- Reagentes

Todos os reagentes utilizados tinham o grau de pureza necessário para as análises realizadas.

Os reagentes utilizados, assim como os respectivos graus de pureza e outras especificações são descritos a seguir :

- ✓ Clorofórmio - PA ACS - Synth - Cód. C1062.01.BJ
- ✓ Metanol - PA ACS - Synth - Cód. M3641
- ✓ Ácido sulfúrico - PA ACS - Synth - Cód. 31190
- ✓ Ácido tricloroacético - PA ACS - Cód. A106601AG
- ✓ Ácido tiobarbitúrico - PA ACS - Sigma-Aldrich - Cód. T-5500
- ✓ 1,1,3,3-tetraetoxipropano - PA ACS - Sigma-Aldrich - Cód. T9889
- ✓ Hidróxido de potássio - PA ACS - Synth - Cód. P6310
- ✓ Sulfato de sódio anidro - PA ACS - Synth - Cód. S1.071.01.AH
- ✓ Hexano - grau HPLC - Aldrich - Cód. 110-54-3
- ✓ Isopropanol - grau HPLC - Sigma-Aldrich - Cód. 67-63-0
- ✓ Cloreto de sódio - PA ACS - Nuclear - Cód. 3100
- ✓ Padrão de colesterol (colest-5-ene-3 β -ol) - Sigma Chemical Co - Cód. C8667
- ✓ Padrão de 7-cetocolesterol (3 β -hidroxicolest-5 α -ene-7-one) - Sigma Chemical Co - Cód. C2394
- ✓ Padrão de 7 α -hidroxicoolesterol (colest-5-ene-3 β , 7 α -diol) - Steraloids - Inc. - Cód. C6420
- ✓ Padrão de 7 β -hidroxicoolesterol (colest-5-ene-3 β , 7 β -diol) - Steraloids - Inc. - Cód. C6430
- ✓ Padrão de 25-hidroxicoolesterol (colest-5-ene-3 β , 25-diol) - Steraloids - Inc. - Cód. C6510

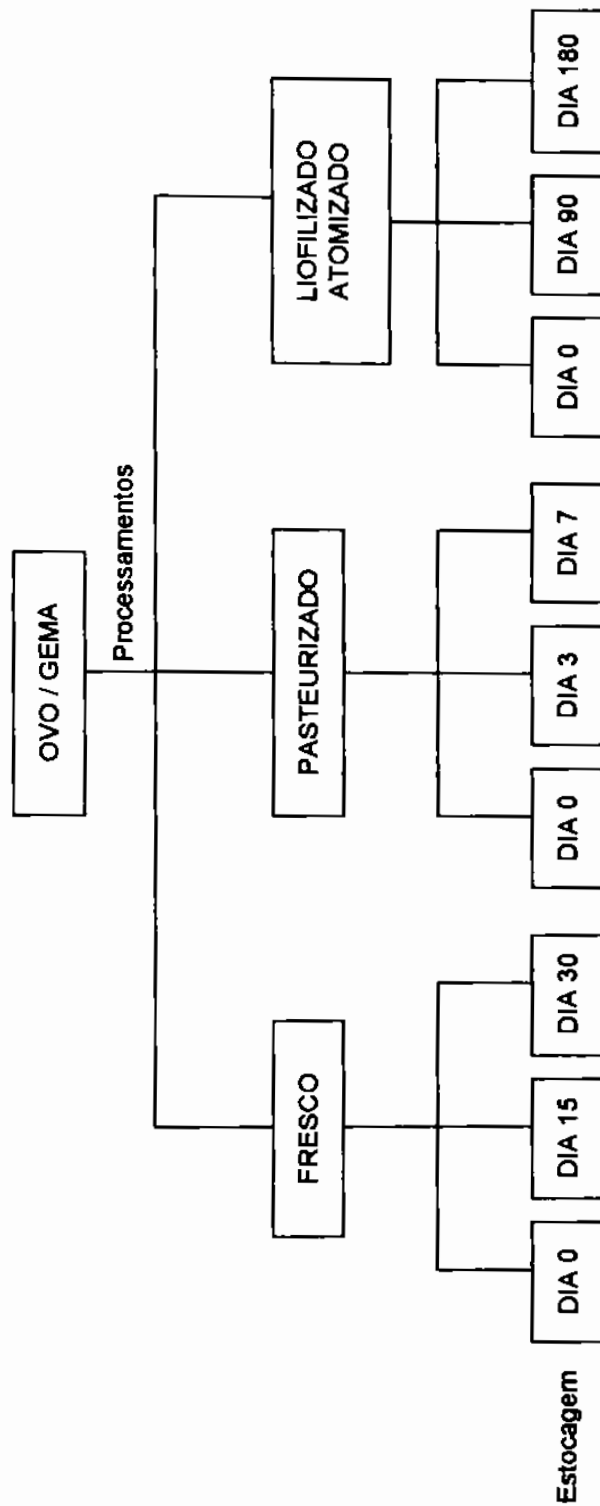
4.1.2- Amostras - Obtenção e preparo

Foram utilizadas amostras frescas (ovo integral e gema), pasteurizadas (ovo integral e gema), e desidratadas por atomização (ovo integral e gema) obtidas da Ito - Avicultura Ind. e Com. S.A. O ovo com teor reduzido de colesterol foi adquirido comercialmente. Uma parte das amostras pasteurizadas foi liofilizada. Todos os ovos estavam de acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) do Ministério da agricultura (BRASIL, 1991).

No presente trabalho, cada tipo de amostra foi analisado em três tempos que eram dependentes do prazo de validade de cada amostra. Portanto, imediatamente após obtenção das amostras, estas foram divididas em três grupos, sendo o primeiro submetido às análises e os outros dois grupos, estocados adequadamente e submetidos às análises posteriormente.

As amostras de ovos integrais frescos, ovos com colesterol reduzido e gemas frescas foram analisadas imediatamente após obtenção, após 15 e 30 dias de estocagem. As amostras de ovos integrais pasteurizados e gemas pasteurizadas foram analisadas imediatamente após obtenção, após 3 e 7 dias de estocagem. Já as amostras de ovos integrais atomizados e liofilizados assim como as amostras de gemas atomizadas e liofilizadas foram analisadas imediatamente após obtenção, após 90 e 180 dias de estocagem (Figura 5).

Em relação à estocagem, as amostras de ovos integrais frescos e pasteurizados assim como as amostras de gemas frescas e pasteurizadas foram estocada sob refrigeração, ou seja, a temperatura de aproximadamente 8 °C. Já as amostras de ovos integrais atomizados e liofilizados assim como as amostras de gemas atomizadas e liofilizadas foram estocadas a temperatura ambiente, ou seja, próxima a 28 °C.



Amostras frescas e pasteurizadas - estocadas sob refrigeração (8 °C)

Amostras liofilizadas e atomizadas - estocadas a 28 °C

Figura 5: Planejamento experimental.

4.1.3- Equipamentos

Para as análises de TBARS foi utilizado um espectrofotômetro UV/VIS da Milton Roy Company modelo 20D.

Para as análises de quantificação de ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu 17A Class GC 10, equipado com detetor de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida (Supelcowax 10), com 30m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno.

Para as análises de colesterol e óxidos de colesterol, foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu, modelo SCL-10A_{VP}, equipado com detetor de fotodiodos (UV-VIS) SPD-M10AD_{VP}, duas bombas LC-10AD_{VP} e injetor automático SIL-10AD_{VP}. A coluna utilizada foi a de sílica, μ -Porasil de 30 x 0,39 cm, da marca Water Associates, com diâmetro de poro de 10 μ m.

4.2- MÉTODOS

4.2.1- Processamentos - Pasteurização, Atomização e Liofilização

A pasteurização e a secagem por atomização ou *spray-drying* foram realizadas na planta da indústria Ito - Avicultura Ind. e Com. S.A., em Diadema - SP, em condições industriais.

A liofilização ou *freeze-drying* foi realizada em nível laboratorial, com liofilizador da marca Edwards modelo L4KR 118 no Laboratório de Física Industrial do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (FBT) da FCF/USP.

4.2.2- Determinação do conteúdo de água (umidade)

Através da secagem da amostra em estufa a 105 °C, até peso constante, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.2.3- Quantificação de ácidos graxos

Inicialmente para a extração lipídica foi utilizado o método desenvolvido por FOLCH, LEES & STANLEY (1957). Nesse método, metanol e clorofórmio são utilizados para a extração da fração lipídica. Em seguida foi utilizado o método desenvolvido por HARTMAN & LAGO (1973) para a obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos. Nesse referido método é utilizada uma solução de esterificação constituída de cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico concentrado. Os ésteres de ácidos graxos foram então extraídos com hexano e quantificados por cromatografia gasosa (CG). As condições da análise utilizada constam na Tabela 3.

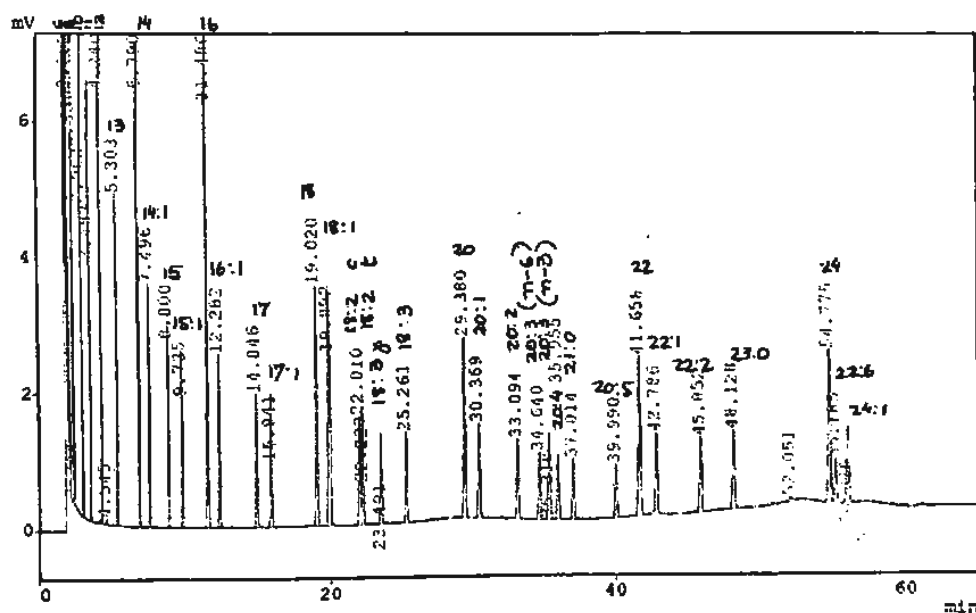
Tabela 3: Condições de análise utilizada para a quantificação de ácidos graxos

Parâmetro	Condição
Programação da temperatura da coluna	De 170 a 225 °C ⇒ Aquecimento a 1°C/min
Temperatura do vaporizador	250 °C
Temperatura do detetor	270 °C
Gás de arraste	Hélio
Fluxo do gás de arraste	1 mL/min

Os ésteres de ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. Os cromatogramas dos padrões utilizados para a identificação dos ácidos graxos das amostras são apresentados nas Figuras 6a e 6b. Dos 37 ácidos graxos, quinze foram identificados nas amostras (Tabela 4).

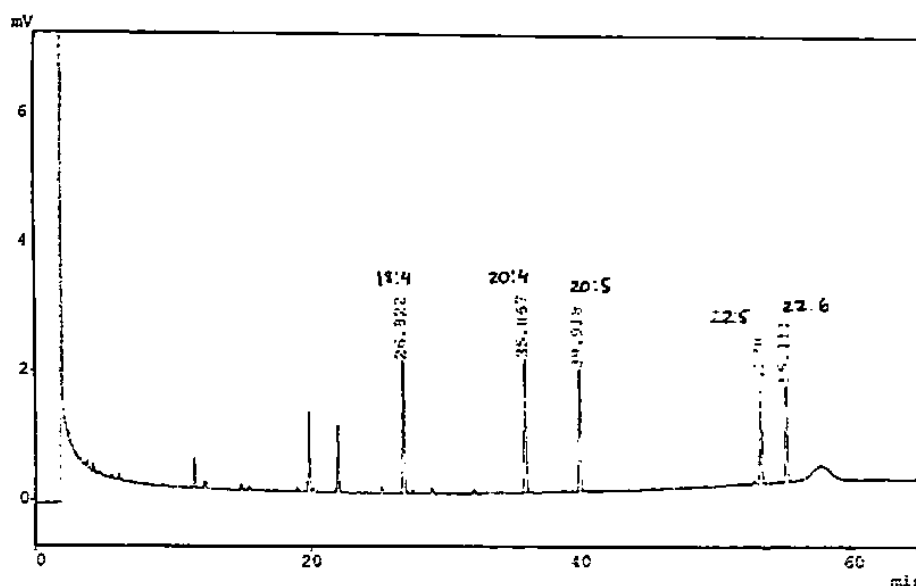
Tabela 4: Fórmula abreviada, nomenclatura e classificação dos ácidos graxos identificados e quantificados

Classificação	Fórmula	Nome
Saturados	14:0	Mirístico
	16:0	Palmítico
	17:0	Margárico
	18:0	Esteárico
Monoinsaturados	16:1 (ω -7)	Palmitoléico
	17:1	Heptadecanóico
	18:1 (ω -9)	Oléico
	20:1 (ω -9)	Eicosenóico
Polinsaturados	18:2 (ω -6)	Linoléico
	18:3 (ω -3)	γ -Linolênico
	18:3 (ω -3)	α -linolênico
	18:4 (ω -3)	Octadecatetraenóico
	20:3 (ω -6)	Eicosatrienóico
	20:4 (ω -6)	Araquidônico
	22:6 (ω -3)	Docosahexaenóico



Condições cromatográficas: coluna Supelcowax 10 (30 x 0,39 cm; 10 μ m), gás de arraste hélio; fluxo do gás de arraste 1,0 mL/min.

Figura 6a: Cromatograma dos padrões utilizados para identificação de ácidos graxos.



Condições cromatográficas: coluna Supelcowax 10 (30 x 0,39 cm; 10 μ m), gás de arraste hélio; fluxo do gás de arraste 1,0 mL/min.

Figura 6b: Cromatograma dos padrões utilizados para identificação de ácidos graxos.

4.2.4- Quantificação de colesterol e óxidos de colesterol

Para a extração lipídica foi utilizado o método desenvolvido por FOLCH, LEES & STANLEY (1957) e adaptado por CSALLANY *et al.* (1989). O referido método utiliza uma solução de clorofórmio:metanol na proporção 2:1. O extrato lipídico foi então submetido à saponificação a frio (25-28 °C) durante 18 horas, utilizando-se uma solução metanólica de KOH 1M, segundo método desenvolvido por CHEN & CHEN (1994).

Após a saponificação, a fase orgânica foi extraída com hexano. O colesterol (colest-5-ene-3 β -ol) e os seguintes produtos de sua oxidação: 7-cetocolesterol (3 β -hidroxicolest-5-ene-7-one), 7 α -hidroxicoesterol (colest-5-ene-3 β , 7 α -diol), 7 β -hidroxicoesterol (colest-5-ene-3 β , 7 β -diol) e 25-hidroxicoesterol (colest-5-ene-3 β , 25-diol), foram quantificados por HPLC, conforme CSALLANY *et al.* (1989). As condições empregadas para o colesterol e para cada óxido constam na Tabela 5.

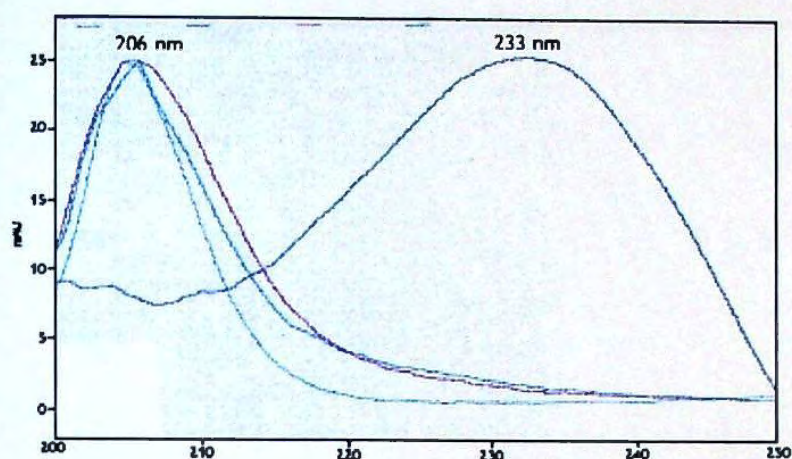
Tabela 5: Condições utilizadas para a análise de colesterol e óxidos de colesterol

COMPOSTO	FASE MÓVEL*	COMPRIMENTO DE ONDA
Colesterol	97:3	206
25-hidroxicolesterol	97:3	206
7-cetocolesterol	93:7	233
7 α -hidroxicolesterol	93:7	206
7 β -hidroxicolesterol	93:7	206

*Fase móvel = hexano:isopropanol

Conforme a Tabela 5, duas fases móveis foram necessárias para a quantificação do colesterol e seus óxidos. A primeira era composta de uma mistura de hexano e isopropanol na proporção de 97:3 para a quantificação do colesterol e o 25-hidroxicolesterol. A outra fase móvel, composta da mesma mistura na proporção de 93:7, serviu para quantificar os demais óxidos de colesterol, ou seja, o 7-cetocolesterol, o 7 α -hidroxicolesterol e o 7 β -hidroxicolesterol.

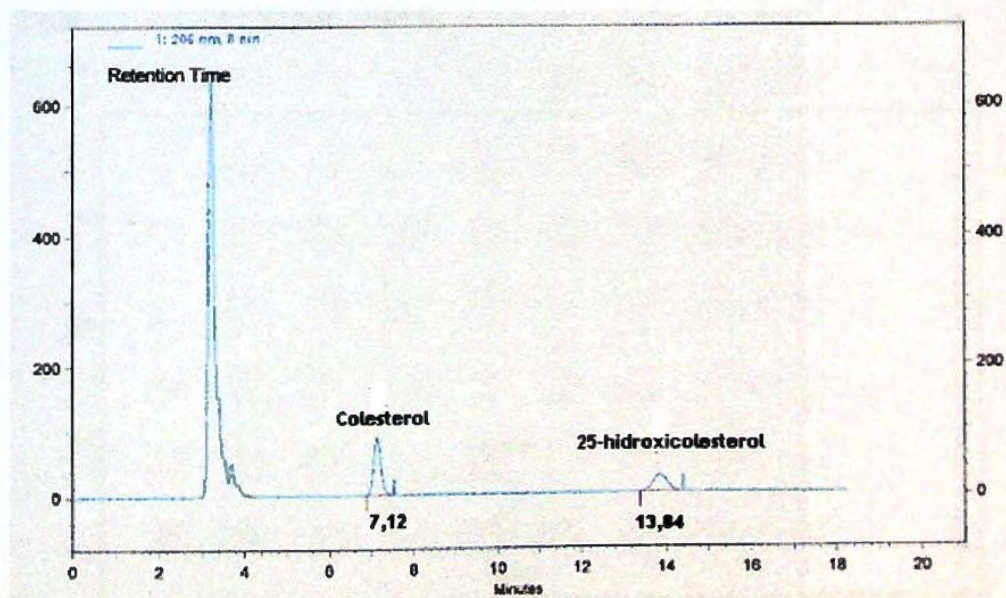
O colesterol e os óxidos estudados foram detectados em 206 nm, com exceção do 7-cetocolesterol, cuja detecção é melhor em 233 nm. Os espectros de absorção dos óxidos de colesterol são mostrados na Figura 7 e os cromatogramas do colesterol e 25-hidroxicolesterol, do 7 α -hidroxicolesterol e do 7 β -hidroxicolesterol, e do 7-cetocolesterol, nas Figuras 8a, 8b e 8c.



206 nm - 25-hidroxicolesterol, 7α -hidroxicolesterol e 7β -hidroxicolesterol
 233 nm - 7-cetocolesterol

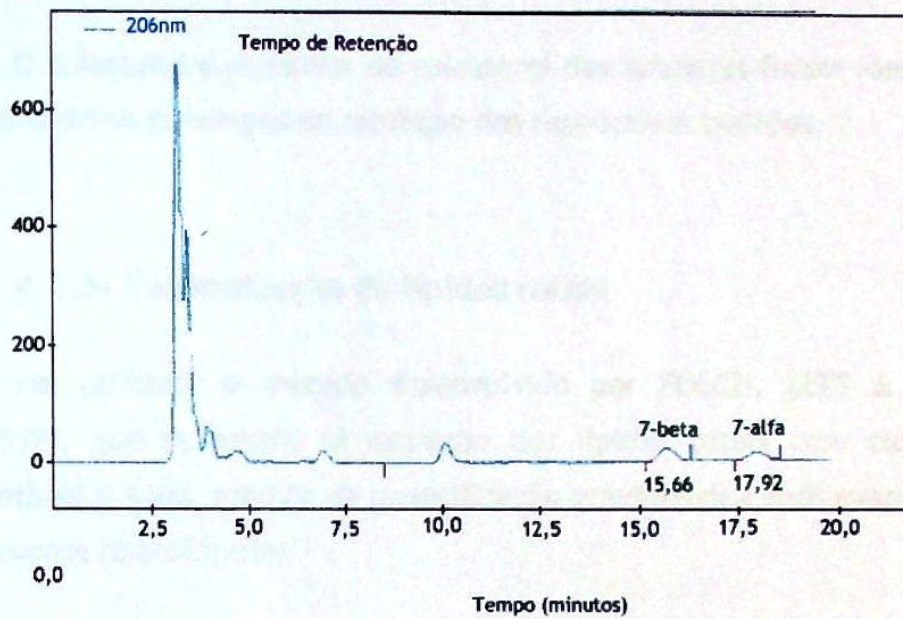
Condições cromatográficas: coluna μ -Porasil (30 x 0,39 cm; 10 μ m), fase móvel hexano/isopropanol (93+7); vazão 1,0 mL/min.

Figura 7: Espectro UV dos óxidos de colesterol.



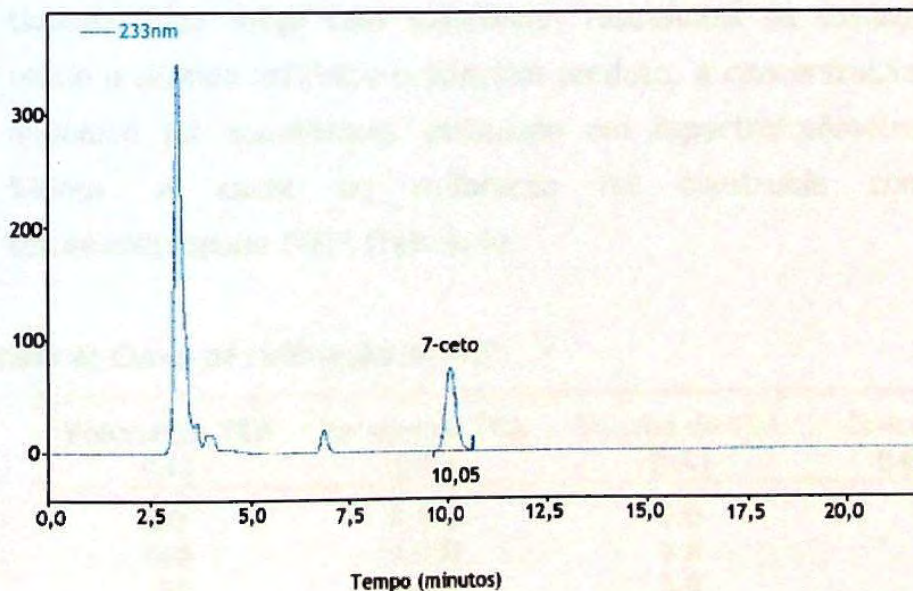
Condições cromatográficas: coluna μ -Porasil (30 x 0,39 cm; 10 μ m), fase móvel hexano/isopropanol (97+3); vazão 1,0 mL/min.

Figura 8a: Cromatograma com os padrões de colesterol e 25-hidroxicolesterol.



Condições cromatográficas: coluna μ -Porasil (30 x 0,39 cm; 10 μ m), fase móvel hexano/isopropanol (93+7); vazão 1,0 mL/min.

Figura 8b: Cromatograma com os padrões de 7 α -hidroxicolesterol e 7 β -hidroxicolesterol.



Condições cromatográficas: coluna μ -Porasil (30 x 0,39 cm; 10 μ m), fase móvel hexano/isopropanol (93+7); vazão 1,0 mL/min.

Figura 8c: Cromatograma com o padrão de 7-cetocolesterol.

O colesterol e os óxidos de colesterol das amostras foram identificados comparando-se os tempos de retenção dos respectivos padrões.

4.2.5- Determinação de lípidos totais

Foi utilizado o método desenvolvido por FOLCH, LEES & STANLEY (1957), que se baseia na extração dos lípidos totais com clorofórmio, metanol e água, seguida de quantificação gravimétrica após evaporação do solvente (clorofórmio).

4.2.6- Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS

Foi empregado o método de VYNCKE (1970). Após a extração ácida (utilizando ácido tricloroacético - TCA) das amostras, o ácido tiobarbitúrico reage com substâncias resultantes da oxidação lipídica, sendo o aldeído malônico o principal produto. A concentração do aldeído malônico foi quantificada utilizando um espectrofotômetro UV/VIS a 538nm. A curva de calibração foi construída com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (Tabela 6).

Tabela 6: Curva de calibração do TEP

Volume de TEP (μ L)	Volume de TCA (mL)	Volume de TBA (mL)	Concentração (μ g/5mL)
50	4,950	5,0	1,1
100	4,900	5,0	2,2
150	4,850	5,0	3,3
200	4,800	5,0	4,4
250	4,750	5,0	5,5
300	4,700	5,0	6,6

4.2.7- Validação da metodologia de quantificação de colesterol e óxidos de colesterol

Para a validação da metodologia utilizada foram considerados os parâmetros precisão, recuperação, limites de detecção e quantificação e linearidade da curva de calibração.

4.2.7.1- Precisão

A precisão descreve o grau no qual um dado gerado pela replicata ou medida repetitiva difere uma da outra. Foi calculada a partir de medidas repetidas de uma mesma amostra (KEITH *et al.*, 1983).

4.2.7.2- Recuperação

Para o cálculo da taxa de recuperação do analito foi usado o método de adição de padrão (10µg para o colesterol e 2µg para o 7-cetocolesterol) (KEITH *et al.*, 1983).

4.2.7.3- Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como o nível de concentração mais baixo que pode ser detectado sendo estatisticamente diferente do branco. Para tanto, foram realizadas integrações do "ruído" de 10 leituras do branco e então considerando o valor de três vezes o desvio-padrão, conforme KEITH *et al.* (1983) e LONG & WINEFORDNER (1983).

O limite de quantificação (LQ) é definido como o nível acima do qual resultados quantitativos podem ser obtidos com um certo grau de confiança. O LQ foi calculado como sendo 10 vezes o valor do desvio-padrão, de acordo com KEITH *et al.* (1983) e LONG & WINEFORDNER (1983).

4.2.7.4- Intervalo de Linearidade da Curva de Calibração

Esse intervalo de linearidade foi verificado através do coeficiente de correlação da curva de calibração, construída pelo método da análise de regressão, após leitura dos valores de absorbância (altura de pico) dos padrões preparados por diluições sucessivas (FUNK, DAMMANN & DONNEVERT, 1995). As concentrações utilizadas foram 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g/L}$ para o colesterol e 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 $\mu\text{g/L}$ para os óxidos de colesterol.

4.2.8- Análise estatística

O planejamento experimental do presente trabalho (Figura 6) foi repetido três vezes. Esse número de repetições foi avaliado e considerado adequado pelo Serviço de Estatística do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática e Estatística/USP.

Em relação à análise das variáveis ao longo da estocagem, esta foi conduzida considerando-se os valores médios de todos os lotes. Foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman ANOVA, após verificação da homogeneidade das variâncias através de análise gráfica e teste de Levene, adotando-se um valor alfa de 0,05 (Statistica v6, Stat Soft Inc., Tulsa, OK).

Para a comparação entre dois grupos no mesmo tempo foi utilizado o teste de Mann Whitney U, uma vez que a maior parte dos dados não apresentou distribuição normal, avaliada de acordo com o teste de Shapiro-Wilk's W, adotando-se um valor alfa de 0,05 (Statistica v6, Stat Soft Inc., Tulsa, OK).

A correlação entre as variáveis foi obtida considerando-se todos os grupos em todos os tempos através de regressão linear (Statistica v6, Stat Soft Inc., Tulsa, OK).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1-VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL

Os baixos valores encontrados para o LD e LQ demonstraram sensibilidade adequada do método utilizado nas análises de colesterol e óxidos de colesterol e a precisão indicou uma dispersão de 2 a 4% ao redor da média, considerada aceitável. Em relação às curvas de calibração construídas, os coeficientes obtidos indicaram forte correlação nos intervalos estudados (Tabela 7). As percentagens encontradas para a recuperação do colesterol foram plenamente satisfatórias. Em relação ao 7-cetocolesterol, a recuperação foi relativamente mais baixa (Tabela 8).

Os óxidos de colesterol são compostos quimicamente mais sensíveis e requerem portanto maiores cuidados na sua quantificação, se comparadas ao colesterol. Além disso, as quantidades encontradas em alimentos são muito baixas e, conseqüentemente, valores de recuperação próximos de 100% não são facilmente atingidos. Dentre os óxidos de colesterol estudados, o 7-cetocolesterol é o mais sensível em relação à saponificação (PARK *et al.*, 1996). Por essa razão, a recuperação para a validação da metodologia foi realizada com esse óxido.

Na literatura, percentagens de recuperação bastante variáveis são relatadas. Alguns trabalhos obtêm percentagens próximas a 100%, enquanto outros citam valores muito aquém.

CSALLANY e colaboradores (1989), quantificando os óxidos de colesterol no extrato lipídico de fígado e músculo suíno sem saponificação obtiveram 88% de recuperação para o 7-cetocolesterol livre.

PIE, SAPHIS, SEILLAN (1990) avaliaram o conteúdo de óxidos de colesterol em manteiga, ovos e massas amanteigadas utilizando cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG-MS). A recuperação, realizada apenas na manteiga foi de 103,5% para o 7-cetocolesterol. CHEN & CHEN (1994) e GRANELLI e colaboradores (1996) também relataram valores próximos a 100%, ou seja, 108,9 e 104%, respectivamente.

Em um trabalho realizado com produtos cárneos BAGGIO & BRAGAGNOLO (2004) obtiveram 91,15% de recuperação de 7-cetocolesterol em amostras de peito de peru.

Valores mais baixos foram encontrados por LAI, GRAY, ZABIK (1995), IBRAHIM, UNKLESBAY, PURI (1990), UBHAYASEKERA *et al.* (2004) e VAN DE BOVENKAMP, KOSMEIJER-SCHUIL, KATAN (1988). Nos dois primeiros trabalhos foram obtidos valores próximos a 80%, ou seja, 84,2 e 80% de recuperação. UBHAYASEKERA *et al.* (2004) apresentaram percentagem de recuperação variando de 61,6% a 80,6%, dependendo da quantidade de padrão utilizada. Já VAN DE BOVENKAMP, KOSMEIJER-SCHUIL, KATAN (1988) relataram percentagens de recuperação bastante baixas, ou seja, 11-40%.

DUTTA e colaboradores (1999) realizaram um estudo interlaboratorial. Ao compararem valores de óxidos de colesterol de uma mesma amostra analisada por diferentes laboratórios, observaram que os resultados eram divergentes. Baseando-se nesses resultados, concluiu-se que a análise de óxidos de colesterol é bastante complexa devido às baixas concentrações encontradas em amostras biológicas.

Tabela 7: Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Precisão e Linearidade das curvas de calibração do colesterol e óxidos de colesterol

Padrão	LD (g)	LQ (g)	Precisão*	R ²
Colesterol	$1,09 \times 10^{-8}$	$3,62 \times 10^{-8}$	$9,87 \pm 0,25$ (2,49%)	0,98
7-cetocolesterol	$2,02 \times 10^{-9}$	$6,73 \times 10^{-9}$	$0,036 \pm 0,0017$ (4,76%)	0,99
7 β -hidroxicolesterol	$6,90 \times 10^{-8}$	$2,30 \times 10^{-7}$	$12,60 \pm 1,48$ (11,75%)	0,99
7 α -hidroxicolesterol	$3,11 \times 10^{-8}$	$1,03 \times 10^{-7}$	$8,20 \pm 0,98$ (11,95%)	0,99
25-hidroxicolesterol	$6,67 \times 10^{-9}$	$2,22 \times 10^{-8}$	$15,58 \pm 1,13$ (7,25%)	0,99

Curva de calibração do colesterol (5 - 25 $\mu\text{g/g}$) e 7-cetocolesterol (0,2 - 0,8 $\mu\text{g/g}$)

*Média \pm DP (Coeficiente de variação)

Tabela 8: Percentagem de recuperação de colesterol e 7-cetocolesterol adicionados ao ovo

	Colesterol (%)	7-cetocolesterol (%)
Média \pm DP	$101,36 \pm 3,53$	$69,86 \pm 4,48$
CV	3,48	6,41

DP = Desvio-padrão; CV = coeficiente de variação

5.2- CONTEÚDO DE ÁGUA - UMIDADE

As percentagens de umidade encontradas para as amostras de ovo e gema frescas (Tabelas 9 e 10) estão de acordo com a literatura. TORRES e colaboradores (2000) encontraram 76,77% em ovo fresco e 50,69% em gema fresca. PIIRONEN, TOIVO & LAMPI (2002) relataram 76,1% para ovo fresco. As amostras frescas não apresentaram diferenças quando comparadas às amostras pasteurizadas e de colesterol reduzido ($p > 0,05$).

Em relação às amostras desidratadas por atomização (Tabelas 9 e 10) os valores encontrados foram menores do que os 4% citados em literatura (FCF/USP, 2003). Essas diferenças são aceitáveis pois os parâmetros utilizados na secagem influenciam diretamente na umidade do produto final. Já para as amostras desidratadas por liofilização observaram-se valores menores. A liofilização é um processo bastante caro portanto utilizado comercialmente para a desidratação de alguns poucos alimentos como por exemplo vegetais e carnes utilizados em sopas instantâneas. Na literatura consultada não foram encontrados valores de umidade em amostras de ovos ou gemas liofilizadas para comparação.

Tabela 9: Umidade* em amostras de ovos e produtos derivados estocados

	Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 90	Dia 180
Lote 1	Fresco	76,5±0,1	-----	-----	76,1±0,0	76,4±0,2	-----	-----
	Pasteurizado	77,0±0,1	76,8±0,2	76,6±0,2	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	2,8±0,3	-----	-----	-----	-----	2,6±0,1	2,4±0,0
	Liofilizado	0,5±0,1	-----	-----	-----	-----	0,8±0,0	0,8±0,0
	Col Red	75,6±0,2	-----	-----	75,7±0,0	75,7±0,0	-----	-----
Lote 2	Fresco	75,5±0,0	-----	-----	74,4±0,2	74,7±0,0	-----	-----
	Pasteurizado	76,5±0,0	76,5±0,3	76,2±0,1	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	2,8±0,0	-----	-----	-----	-----	2,4±0,4	2,7±0,1
	Liofilizado	1,1±0,1	-----	-----	-----	-----	1,2±0,3	1,2±0,2
	Col Red	76,4±0,2	-----	-----	76,3±0,2	76,2±0,0	-----	-----
Lote 3	Fresco	76,5±0,0	-----	-----	76,1±0,1	76,9±0,0	-----	-----
	Pasteurizado	76,5±0,1	76,4±0,0	76,2±0,1	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	2,1±0,2	-----	-----	-----	-----	2,8±0,0	3,8±0,1
	Liofilizado	1,9±0,0	-----	-----	-----	-----	1,9±0,0	1,9±0,1
	Col Red	76,2±0,1	-----	-----	75,8±0,1	75,3±0,0	-----	-----

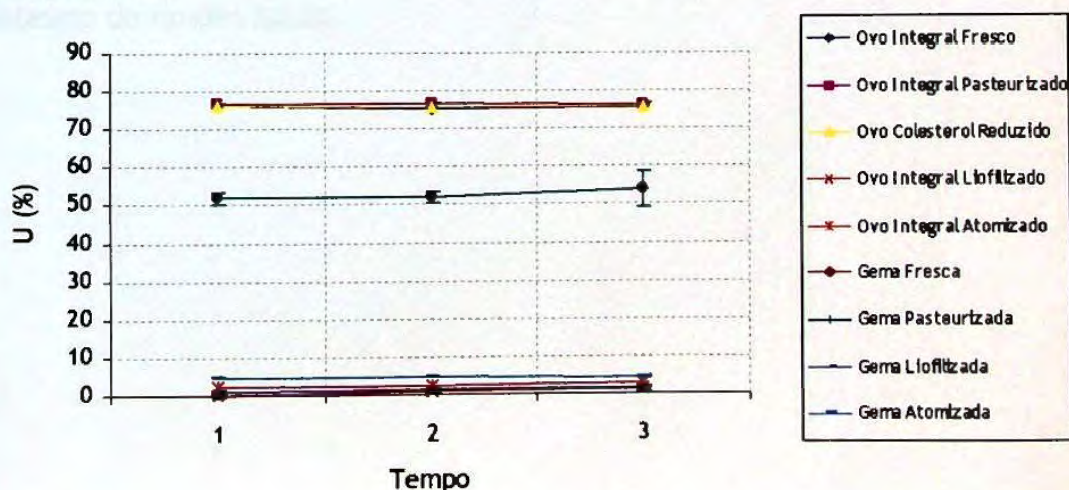
*Valores em % (Média±DP)

Tabela 10: Umidade* em amostras de gema e produtos derivados estocados

	Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 90	Dia 180
Lote 1	Fresco	53,8±0,1	-----	-----	53,4±0,1	59,0±0,1	-----	-----
	Pasteurizado	56,6±0,0	56,4±0,1	56,0±0,2	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	4,8±0,1	-----	-----	-----	-----	4,6±0,0	4,1±0,1
	Liofilizado	1,3±0,1	-----	-----	-----	-----	1,2±0,2	1,2±0,1
Lote 2	Fresco	51,4±0,1	-----	-----	51,9±0,2	53,1±0,2	-----	-----
	Pasteurizado	56,8±0,0	56,9±0,1	56,6±0,0	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	4,6±0,0	-----	-----	-----	-----	4,62±0,0	4,73±0,1
	Liofilizado	0,5±0,0	-----	-----	-----	-----	1,2±0,2	1,4±0,7
Lote 3	Fresco	50,8±0,0	-----	-----	50,8±0,2	50,0±0,2	-----	-----
	Pasteurizado	56,9±0,0	56,8±0,0	56,5±0,1	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	4,9±0,1	-----	-----	-----	-----	4,6±0,0	4,6±0,0
	Liofilizado	0,6±0,0	-----	-----	-----	-----	1,3±0,0	1,3±0,0

*Valores em % (Média±DP)

Analisando a percentagem de umidade ao longo da estocagem verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) (Figura 9). Em relação à estabilidade oxidativa, esse resultado é positivo para as amostras desidratadas.



Tempos: Ovo Integral fresco, Ovo Integral Pasteurizado, Ovo Colesterol Reduzido, Gema Fresca e Gema Pasteurizada - Tempo 1= Dia 0, Tempo 2= Dia 15 e Tempo 3= Dia 30; Ovo Integral Atomizado, Ovo Integral Liofilizado, Gema Liofilizada e Gema Atomizada - Tempo 1= Dia 0, Tempo 2= Dia 90 e Tempo 3= Dia 180.

Figura 9: Umidade (valores médios dos lotes) das amostras de ovos e gemas frescos e processados ao longo da estocagem.

5.3- LÍPIDES TOTAIS

De uma maneira geral, os resultados das análises de lípidos totais nas amostras de ovo (Tabela 11) e gema (Tabela 12) estão de acordo com os encontrados em literatura (Tabela 13), ou seja, são relatados valores os quais variaram de 9,3 a 12%, para os ovos frescos, de 22,6 a 44%, para os ovos desidratados, de 27,63 a 31,88%, para a gema fresca e de 40,7 a 61,3%, para a gema desidratada.

Amostras de ovo fresco e com colesterol reduzido não diferiram entre si em termos de concentração de lípidos totais ($p > 0,05$).

Para os ovos integrais frescos observa-se que os resultados da Tabela 8 estão próximos do limite legal de 10% (BRASIL, 1991). Já em termos de ovos integrais desidratados (Tabela 11), os valores apresentaram-se um pouco baixo do limite legal de 40% (BRASIL, 1991). Para a gema não há normas para a padronização do conteúdo de lípidos totais.

Tabela 11: Concentrações de lípidos totais* em amostras de ovos e produtos derivados estocados

		Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 90	Dia 180
Lote 1	Fresco	9,8±0,2	-----	-----	10,6±0,4	9,7±0,2	-----	-----
	Pasteurizado	9,7±0,0	10,3±0,2	9,8±0,3	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	30,8±0,7	-----	-----	-----	-----	35,9±0,8	34,7±3,4
	Liofilizado	44,0±0,0	-----	-----	-----	-----	43,1±1,2	41,7±0,2
	Col Red	9,0 ± 0,1	-----	-----	9,8 ± 0,1	9,5 ± 0,7	-----	-----
Lote 2	Fresco	10,0±0,4	-----	-----	10,9± 1,2	10,9±0,6	-----	-----
	Pasteurizado	10,2±0,2	9,9±0,2	9,4±0,3	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	40,5±0,1	-----	-----	-----	-----	42,1±1,3	41,3±0,1
	Liofilizado	38,7±0,1	-----	-----	-----	-----	41,0±0,4	39,5±2,1
	Col Red	9,4±0,0	-----	-----	9,0±0,2	9,0±0,4	-----	-----
Lote 3	Fresco	11,1±0,5	-----	-----	11,6±0,3	11,3±0,1	-----	-----
	Pasteurizado	10,8±0,1	10,4±0,3	10,3±0,4	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	37,1±0,1	-----	-----	-----	-----	36,0±0,5	34,8±2,1
	Liofilizado	36,8±0,6	-----	-----	-----	-----	39,8±1,8	37,1±0,1
	Col Red	10,0±0,2	-----	-----	9,7±0,0	9,8±0,1	-----	-----

*Valores em %

Tabela 12: Concentrações de lípidos totais* em amostras de gema e produtos derivados estocados

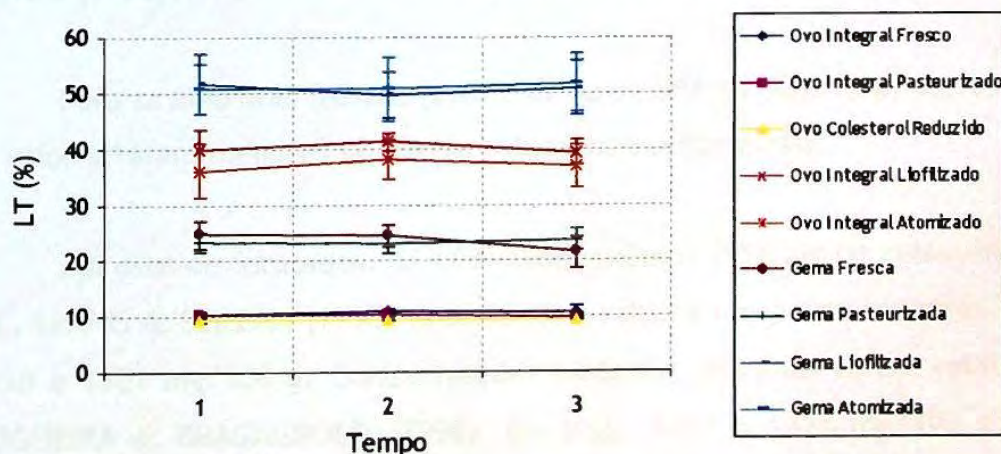
		Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 90	Dia 180
Lote 1	Fresco	22,6±1,8	-----	-----	23,6±1,2	18,3±0,1	-----	-----
	Pasteurizado	23,7±0,3	22,4±1,3	25,0±2,3	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	45,9±4,4	-----	-----	-----	-----	44,8±1,6	46,8±3,1
	Liofilizado	56,8±3,5	-----	-----	-----	-----	52,4±4,1	55,2±2,1
Lote 2	Fresco	24,2±3,0	-----	-----	23,1±0,9	23,1±0,5	-----	-----
	Pasteurizado	21,3±0,7	21,8±0,3	21,7±0,4	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	54,2±4,8	-----	-----	-----	-----	56,3±1,6	57,0±1,1
	Liofilizado	46,3±4,5	-----	-----	-----	-----	44,9±2,0	45,6±0,1
Lote 3	Fresco	27,4±0,6	-----	-----	26,7±0,7	23,1±1,9	-----	-----
	Pasteurizado	24,7±0,4	24,8±1,6	24,6±0,8	-----	-----	-----	-----
	Atomizado	52,8±5,0	-----	-----	-----	-----	51,3±1,0	51,7±0,1
	Liofilizado	52,0±0,8	-----	-----	-----	-----	51,8±0,5	51,9±0,1

*Valores em %

Tabela 13: Dados de literatura de percentagem de lípidos totais em ovos e produtos derivados

Lípides Totais (%)	Autores
Ovos frescos	
9,7	SARANTINOS <i>et al.</i> , 1993
12	KING, 1995
10,54	TORRES <i>et al.</i> , 2000
9,3	PIIRONEN <i>et al.</i> , 2002
11,66	FCF/USP, 2003
Ovos desidratados	
22,6 e 29,9	SARANTINOS <i>et al.</i> , 1993
44	LERCKER & RODRIGUEZ-ESTRADA, 2000
41,8	SCHERZ <i>et al.</i> , 2000
34,15	SOTELO & GONZÁLEZ, 2000
38	FCF/USP, 2003
Gema fresca	
30,9	BAILEY, 1996
27,63	TORRES <i>et al.</i> , 2000
27,63	FCF/USP, 2003
31,88	YANG & CHEN, 2001
Gema desidratada	
61,3	BAILEY, 1996
40,7 e 45,8	SARANTINOS <i>et al.</i> , 1993
54	FCF/USP, 2003

Analisando a percentagem de lípidos totais ao longo da estocagem verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) (Figura 10).



Tempos: Ovo Integral fresco, Ovo Integral Pasteurizado, Ovo Colesterol Reduzido, Gema Fresca e Gema Pasteurizada - Tempo 1= Dia 0, Tempo 2= Dia 15 e Tempo 3= Dia 30; Ovo Integral Atomizado, Ovo Integral Liofilizado, Gema Liofilizada e Gema Atomizada - Tempo 1= Dia 0, Tempo 2= Dia 90 e Tempo 3= Dia 180.

Figura 10: Lípidos totais (valores médios dos lotes) das amostras de ovos e gemas frescos e processados ao longo da estocagem.

5.4- COLESTEROL

As concentrações de colesterol encontradas em ovo, gema e seus produtos derivados foram apresentados na Tabela 14 e nas Figuras 11 a 19.

Em amostras de ovo fresco e gema fresca foram verificadas concentrações de 236,9 a 332,5 mg e 734,5 a 880,3 mg de colesterol/100 g, respectivamente.

Em ovos integrais frescos PIIRONEN, TOIVO, LAMPI (2002) observaram 361 a 370 mg de colesterol/100 g. Níveis semelhantes foram encontrados por BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA (2003), ou seja, 350 a 370 mg/100 g. KING (1995) citou valores entre 250 e 400 mg/100 g, enquanto BEYER (1989), JIANG (1991) e SARANTINOS (1993) relataram níveis em torno de 310 a 405 mg/100g. Quantidades superiores, de 404 a 431 mg/100 g foram encontradas por MARSIGLIA *et al.* (1994). Para amostras de gema fresca HUBBARD e colaboradores (1977) relataram 1012 mg/100 g. Concentrações semelhantes foram relatadas por PASIN, SMITH; O'MAHONY (1998) e ELSWYK, SXCHAKE, HARGIS (1991).

Para as amostras frescas (ovos e gemas) pode-se dizer que, de forma geral os valores foram menores do que os relatados em literatura.

Em ovos desidratados, BAILEY (1996) relatou 1918 mg de colesterol/100 g. PIE, SPAHIS & SEILLAN (1990) encontraram valores um pouco menores, ou seja, 1330 e 1401 mg/100 g. Concentrações bastante próximas foram relatadas por NOGUEIRA & BRAGAGNOLO (1998), ou seja, 1410 a 1573 mg/100 g. Valores menores, 928,9 e 1110 mg/100 g foram citados por SARANTINOS, O'DEA & SINCLAIR (1993). Os dados apresentados na Tabela 11 estão de acordo com os relatados em literatura.

Em relação às amostras de ovo com teor reduzido de colesterol não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) com as de ovo comum. Reduções reais e significativas de colesterol (em torno de 20%) não foram atingidas. Atualmente a comercialização desse tipo de ovo está suspensa por falta de comprovação científica (BRASIL, 2003).

Em um trabalho realizado por MOURTHÉ & MARTINS (2002) com ovos comercializados em Belo Horizonte/MG, o mesmo comportamento pôde ser observado, ou seja, não houve diferença entre os níveis de colesterol dos ovos enriquecidos com ácidos graxos PUFA e os ovos comuns. MENDONÇA-JUNIOR e colaboradores (2000) forneceram às galinhas poedeiras ração acrescida de óleo de peixe rico em PUFA, e não constataram qualquer efeito sobre o colesterol. GRUNE e colaboradores (2001) em estudo semelhante chegaram à mesma conclusão. Além disso, os pesquisadores observaram que era necessário adicionar uma concentração relativamente alta de antioxidante (vitamina E) à ração, para evitar a oxidação lipídica favorecida pela adição de ácidos graxos poliinsaturados.

De acordo com as Figuras 12 a 20 aparentemente houve tendência de diminuição do teor de colesterol ao longo do tempo estudado. Cabe lembrar que os dias das análises das diferentes amostras estão relacionados com sua vida-de-prateleira. Uma provável diminuição dos teores de colesterol poderia ocorrer pois as amostras foram estocadas simulando-se as condições reais, ou seja, as amostras frescas e pasteurizadas foram mantidas sob refrigeração (em torno de 8 °C) e as amostras desidratadas, em temperatura ambiente (em torno de 28 °C). Nessas condições, fatores predisponentes da oxidação do colesterol como o oxigênio, a luz e a temperatura acarretariam na oxidação do colesterol como é demonstrado na literatura.

Tabela 14: Concentrações (mg/100g) de colesterol em ovo, gema e seus produtos derivados ao longo da estocagem

Amostra	Estocagem (Dias)	Ovo			Gema		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Fresco	0	296,9±0,2	332,5±1,1	326,5±4,3	853,5±22,1	880,3±15,0	837,0±25,6
	15	276,6±3,6	313,4±0,5	283,5±13,4	797,1±31,5	833,5±0,9	786,5±11,6
	30	236,9±1,3	309,6±0,3	271,1±0,2	745,5±18,8	738,6±6,9	734,5±2,6
Pasteurizado	0	346,3±17	357,2±4,0	269,85±4,3	635,4±13,2	737,9±28,1	724,0±22,8
	3	342,1±0,2	328,8±3,3	258,43±8,5	573,4±1,5	662,9±25,1	705,6±16,7
	7	323,6±1,0	314,5±1,1	245,36±2,1	555,76±22,0	641,6±14,0	701,9±3,8
Col Red	0	329,8±5,1	301,3±0,8	297,3±4,2	-----	-----	-----
	15	284,4±4,4	292,3±2,4	286,5±1,1	-----	-----	-----
	30	278,9±2,2	249,9±2,9	255,4±0,9	-----	-----	-----
Atomizado	0	1277,5±24	1260,3±5,9	1061,2±12	1500,1±22,8	1627,8±60,0	1694,0±75,2
	90	1207,3±4,7	1227,0±1,0	985,3±0,9	1486,6±5,3	1615,7±8,94	1484,2±21,2
	180	1188,8±76	1102,6±6,8	873,9±19	1350,9±14,6	1571,9±25,5	1327,7±3,2
Liofilizado	0	1428,3±0,9	1340,5±6,8	1278,5±37,8	1839,1±32,9	2050,7±57,9	1986,1±46,0
	90	1358,2±1,2	1238,2±10,3	1242,0±2,4	1548,9±12,9	1839,7±49,4	1774,6±60,6
	180	1205,2±56	1062,3±38,9	1151,4±38,8	1601,7±18,1	1703,2±48,9	1593,3±18,2

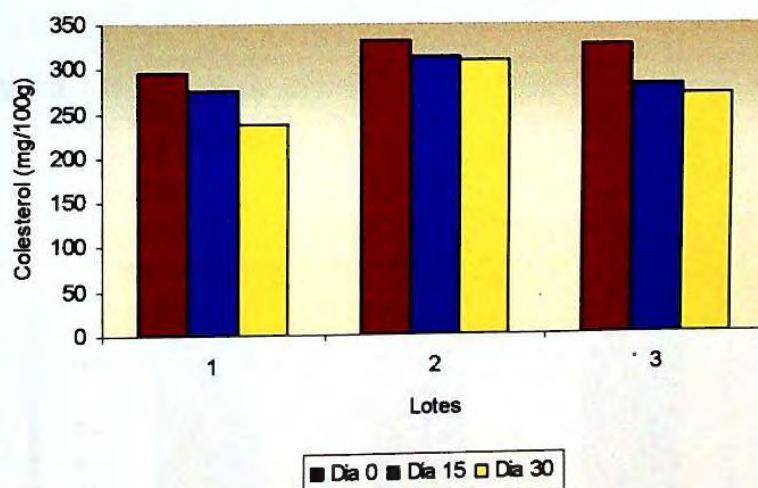


Figura 11: Teores de colesterol em ovos frescos e estocados sob refrigeração (8 °C).

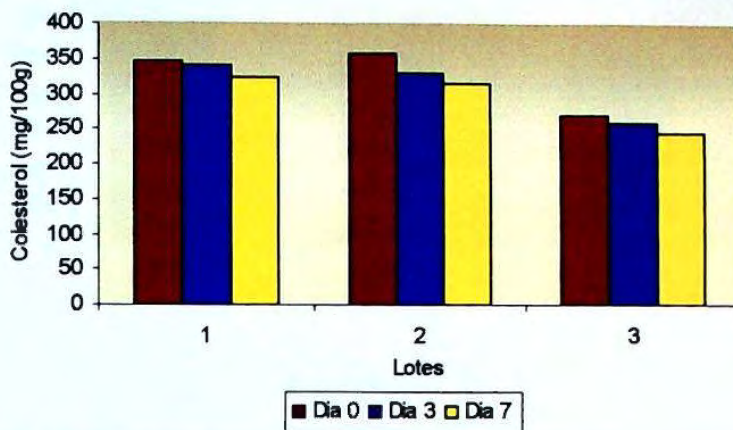


Figura 12: Teores de colesterol em ovos pasteurizados estocados sob refrigeração (8 °C).

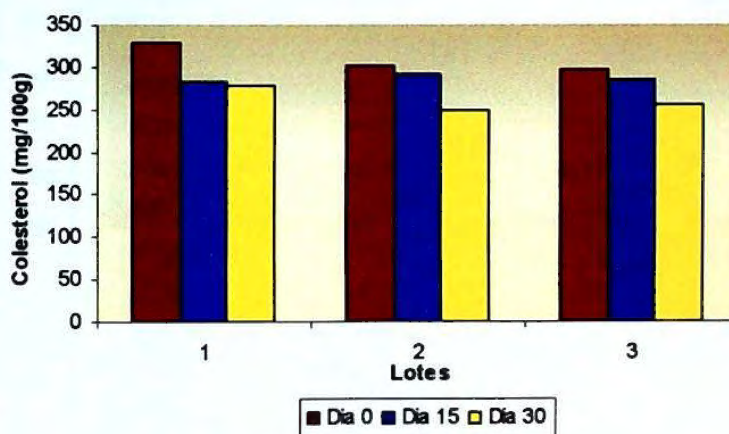


Figura 13: Teores de colesterol em ovos com colesterol reduzido estocados sob refrigeração (8 °C).

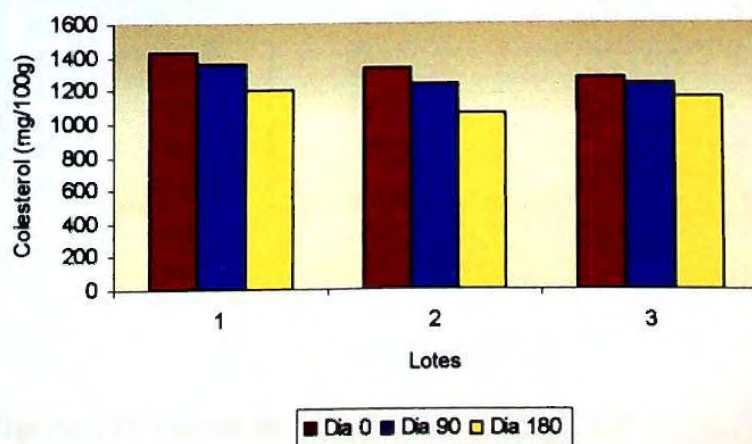


Figura 14: Teores de colesterol em ovos liofilizados estocados (28 °C).

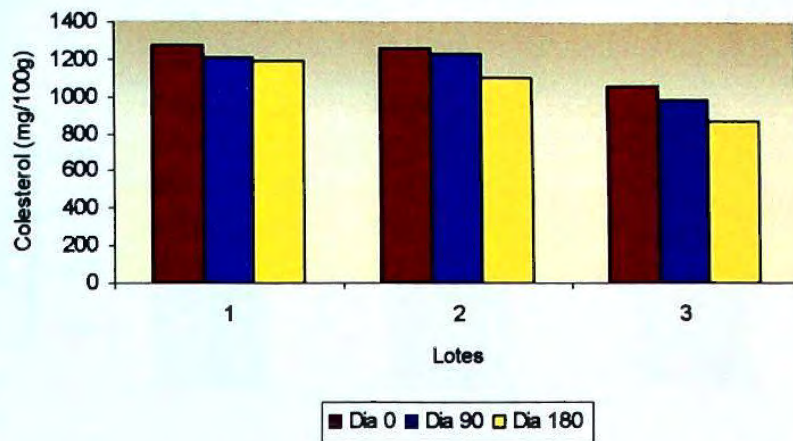


Figura 15: Teores de colesterol em ovos atomizados estocados (28 °C).

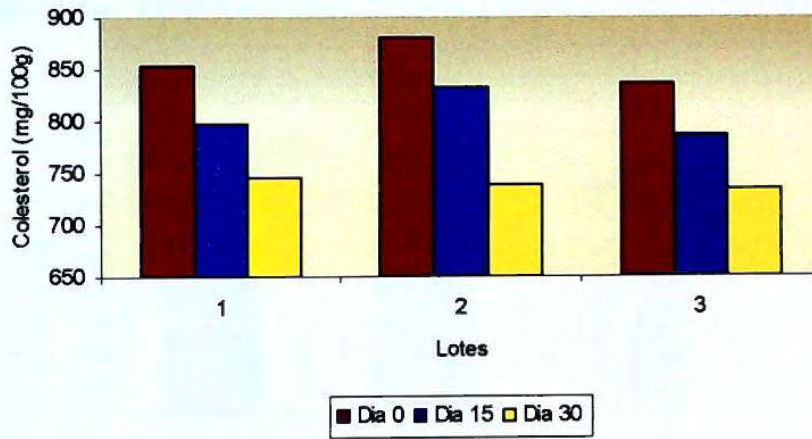


Figura 16: Teores de colesterol em gema fresca estocada sob refrigeração (8 °C).

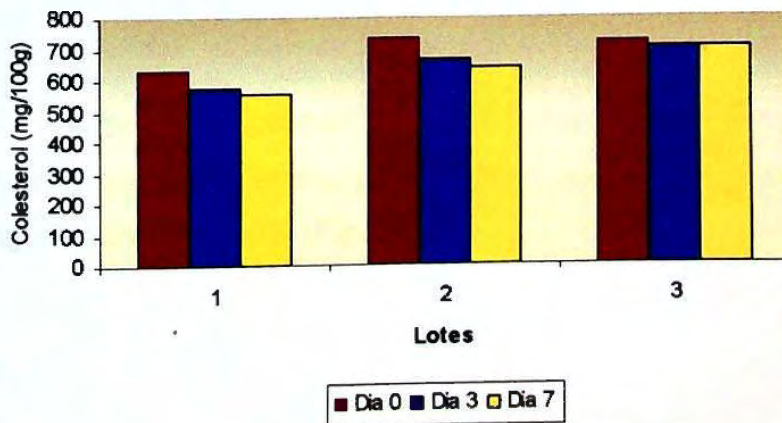


Figura 17: Teores de colesterol em gema pasteurizada estocada sob refrigeração (8 °C).

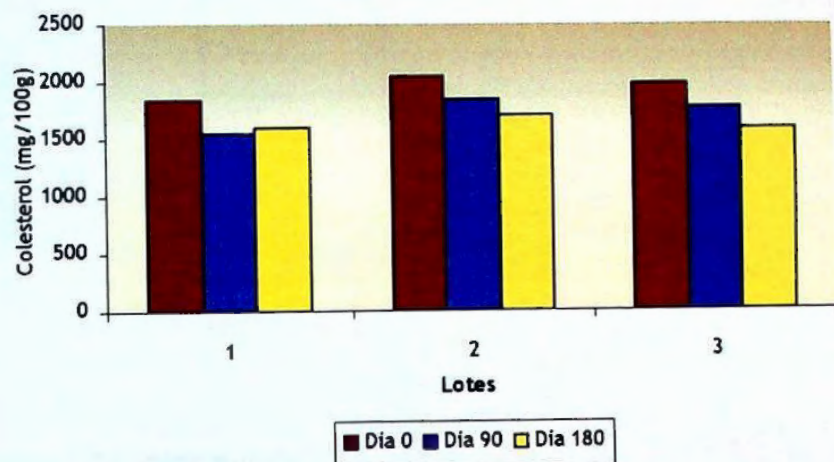


Figura 18: Teores de colesterol em gema liofilizada estocada (28 °C).

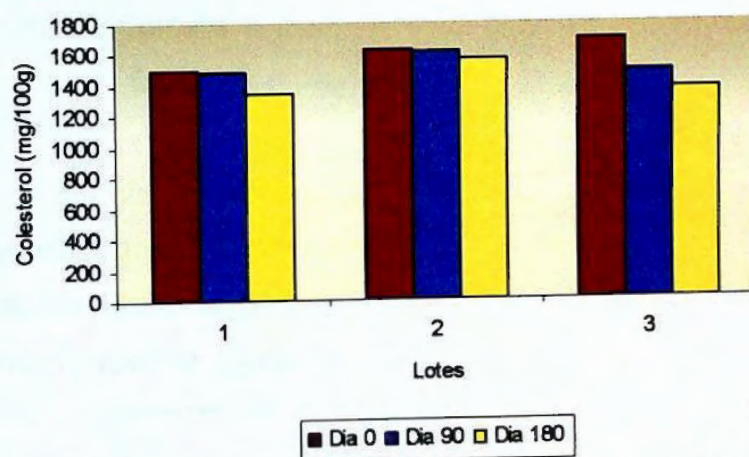
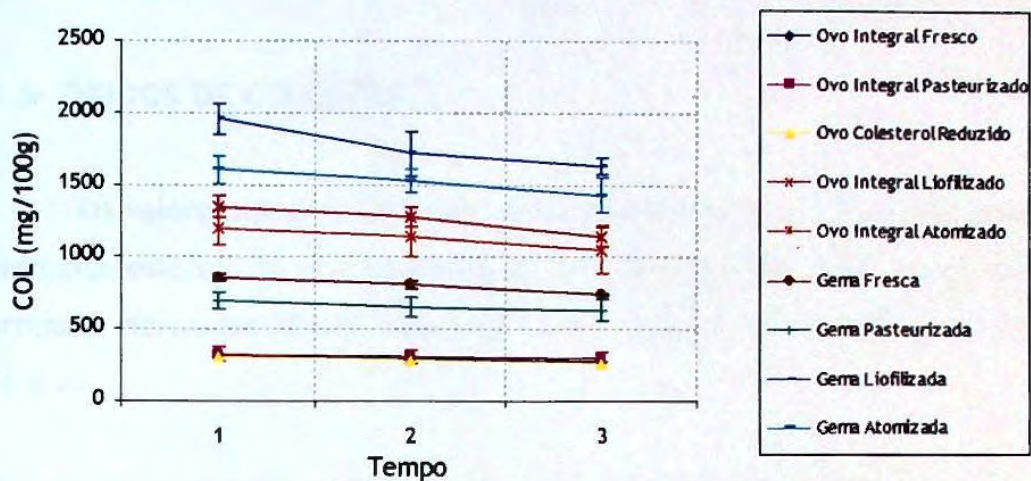


Figura 19: Teores de colesterol em gema atomizada estocada (28 °C).

Embora a concentração de colesterol tenha diminuído ao longo da estocagem, observa-se, após análise estatística, que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) (Figura 20).



Tempos: Ovo Integral fresco, Ovo Integral Pasteurizado, Ovo Colesterol Reduzido, Gema Fresca e Gema Pasteurizada - Tempo 1= Dia 0, Tempo 2= Dia 15 e Tempo 3= Dia 30; Ovo Integral Atomizado, Ovo Integral Liofilizado, Gema Liofilizada e Gema Atomizada - Tempo 1= Dia 0, Tempo 2= Dia 90 e Tempo 3= Dia 180.

Figura 20: Colesterol (valores médios dos lotes) das amostras de ovos e gemas frescos e processados ao longo da estocagem.

Foi observada no presente trabalho uma forte correlação crescente entre a percentagem de lípides totais e a concentração de colesterol. Esse fato parece bastante coerente já que quanto maior a percentagem de lípides totais, maior a concentração de colesterol (Figura 21).

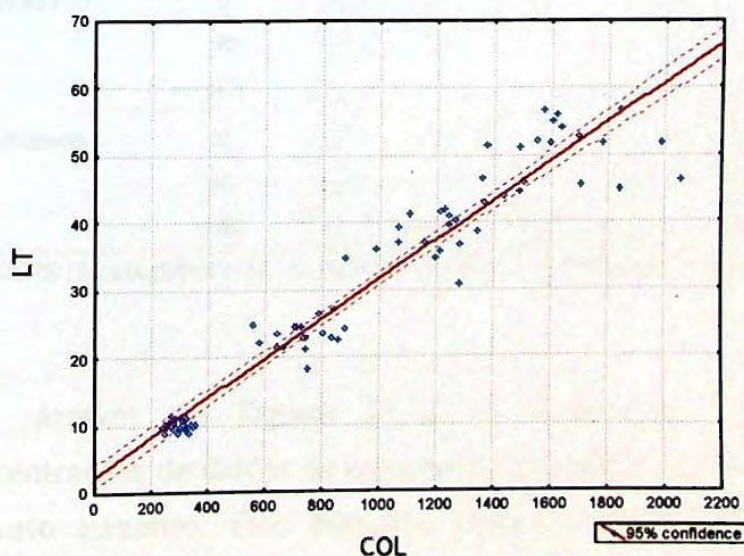


Figura 21: Correlação entre Lípides Totais e Colesterol.

5.5- ÓXIDOS DE COLESTEROL

Os valores encontrados para os óxidos de colesterol (7-cetocolesterol, 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol) em ovo, gema e produtos derivados são apresentados como somatório na Tabela 15 e nas Figuras 22 a 30.

Tabela 15: Concentrações de óxidos de colesterol ($\mu\text{g/g}$) de ovo, gema e seus produtos derivados ao longo da estocagem

Amostra	Estocagem (Dias)	Σ COPS Ovo				Σ COPS Gema			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média \pm DP	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média \pm DP
Fresco	0	23,66	25,25	19,50	22,80 \pm 2,9	32,49	31,99	9,17	32,24 \pm 0,4
	15	20,79	24,74	22,73	22,75 \pm 1,9	34,15	37,96	32,98	35,03 \pm 2,6
	30	27,51	23,11	21,52	24,04 \pm 3,1	42,30	44,09	38,75	41,71 \pm 2,7
Pasteurizado	0	21,53	22,84	13,71	22,19 \pm 0,9	22,87	31,51	31,23	28,54 \pm 0,2
	3	21,06	27,69	19,22	24,38 \pm 4,7	29,04	34,17	34,59	32,60 \pm 3,1
	7	24,07	23,33	23,43	23,61 \pm 0,4	30,81	39,14	39,41	36,46 \pm 4,9
Col Red	0	20,72	24,71	15,61	22,71 \pm 2,8	----	----	----	----
	15	23,52	17,17	17,21	17,19 \pm 0,0	----	----	----	----
	30	20,80	17,09	22,29	20,06 \pm 2,7	----	----	----	----
Atomizado	0	74,97	23,95	76,74	75,9 \pm 1,3	75,75	119,13	106,98	113,1 \pm 9
	90	89,10	20,34	112,37	101,1 \pm 11	97,61	131,43	127,11	129,3 \pm 3
	180	116,71	21,14	133,48	119,3 \pm 13	142,03	127,69	129,16	128,42 \pm 1
Liofilizado	0	24,91	28,02	91,74	101,9 \pm 14	105,67	85,41	85,37	92,15 \pm 11,7
	90	68,55	21,64	98,17	103,2 \pm 7	131,79	101,47	97,72	99,59 \pm 2,7
	180	103,77	19,64	103,47	108,0 \pm 6	114,98	108,08	98,79	102,94 \pm 7

Σ COPS (7-cetocolesterol, 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol)

Através das Figuras 22 a 30 observa-se que, de modo geral, as concentrações de óxidos de colesterol para amostras de ovo e gema tiveram um discreto aumento. Esse aumento poderia ser justificado, já que durante a estocagem o colesterol sofreria oxidação formando então os óxidos de colesterol.

Alguns trabalhos mostram essa mesma tendência de aumento nas concentrações de óxidos de colesterol ao longo da estocagem. NOUROOZ-ZADEH & APPELQVIST (1987) quantificaram os óxidos de colesterol (7-cetocolesterol, o 7 α - e 7 β -hidroxicoolesterol e 25-hidroxicoolesterol) em ovos frescos e gemas liofilizadas e atomizadas. As amostras frescas e liofilizadas foram analisadas apenas no tempo zero, ou seja, não foram estocadas. Em ambas não foi observada a presença de óxidos de colesterol. Nas amostras de gema atomizada os óxidos de colesterol foram detectados a partir do mês 6 ou 180 dias de estocagem, a 4 °C. Nessa ocasião, para o somatório dos óxidos quantificados foi observada uma concentração de 1 $\mu\text{g/g}$. Após 12 meses de estocagem esse valor aumentou para 2,5 $\mu\text{g/g}$.

LAI e colaboradores (1995) avaliaram a influência da estocagem na formação de óxidos de colesterol em ovos desidratados. Os óxidos quantificados foram o 7-cetocolesterol, o 7 α - e 7 β -hidroxicoolesterol, o α - e β -colesterolepóxido, expressos como somatório (ΣCOPS). No início da estocagem, ou seja, no tempo zero, os autores encontraram 8,57 $\mu\text{g/g}$. Após 3 meses de estocagem, o ΣCOPS aumentou para 28,97 $\mu\text{g/g}$ e após 6 meses para 42,54 $\mu\text{g/g}$.

Em 1996, LAI e colaboradores realizaram outro estudo bastante semelhante. Os mesmos óxidos de colesterol foram quantificados também em amostras de ovo desidratado agora estocadas por 4 meses. No início da estocagem os autores encontraram 7,5 $\mu\text{g/g}$ e após 2 meses 15,66 $\mu\text{g/g}$, chegando a 23,91 $\mu\text{g/g}$ depois de 4 meses (LAI *et al.*, 1996a,b).

BRINKERHOFF e colaboradores (2002) estudaram o efeito do uso de antioxidantes na oxidação de colesterol de gemas desidratadas. Os óxidos de colesterol quantificados foram os mesmos do presente trabalho, ou seja, 7-cetocolesterol, 7 α - e 7 β -hidroxicoolesterol e 25-hidroxicoolesterol, expressos como somatório (ΣCOPS). Para as amostras controle, ou seja, aquelas que não

sofreram adição de antioxidantes, os autores relataram 9,7 $\mu\text{g/g}$ aumentando para 902 $\mu\text{g/g}$ após 36 meses de estocagem à temperatura ambiente.

DU & AHN (2000) avaliaram a influência da embalagem na formação de óxidos de colesterol em amostras de gema ao longo da estocagem. Aqui também foram quantificados os mesmos óxidos do presente trabalho, expressos como ΣCOPS . No dia inicial da estocagem, os autores quantificaram 33 $\mu\text{g/g}$, após 90 dias esse valor aumentou para 787 $\mu\text{g/g}$.

GALOBART e colaboradores (2002) avaliaram o aumento da concentração de óxidos de colesterol em ovos desidratados. Os ovos foram obtidos de galinhas alimentadas com dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados. No início da estocagem o ΣCOPS foi de 18,11 $\mu\text{g/g}$. Após 6 meses, esse valor aumentou para 34,71 $\mu\text{g/g}$, atingindo o valor de 39,34 $\mu\text{g/g}$ depois de 12 meses de estocagem.

Alguns trabalhos na literatura relatam diminuição da concentração de óxidos de colesterol ao longo da estocagem. Em algumas amostras estudadas no presente trabalho, aparentemente esse comportamento também foi observado.

FONTANA e colaboradores (1993) compararam condições diferentes de estocagem. O valor encontrado em ovo desidratado por atomização, estocado por três meses à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi de 3,1 $\mu\text{g/g}$ para o 7-cetocolesterol, aumentando para 4 $\mu\text{g/g}$ após oito meses. Para amostras estocadas à temperatura ambiente e sem a preocupação com a luz, o valor citado foi de 4,3 $\mu\text{g/g}$ no terceiro mês caindo para 3,9 $\mu\text{g/g}$ no oitavo mês. Quando os ovos atomizados foram estocados a -20°C , foi observada uma concentração de 3,5 $\mu\text{g/g}$ no terceiro mês e 2,2 $\mu\text{g/g}$ no oitavo mês de estocagem.

CHIEN e colaboradores (2003) e HU & CHEN (2002) realizaram estudo em sistema modelo para avaliar a fotoxidação do colesterol. Após dois dias de estocagem a concentração de 7-cetocolesterol aumentou de zero para 270 $\mu\text{g/g}$. Após três dias de estocagem, essa concentração diminuiu para 265 $\mu\text{g/g}$, aumentando novamente para 287 $\mu\text{g/g}$ depois de 7 dias de estocagem.

Pode-se notar que os valores encontrados na literatura são variados e conflitantes. Diferenças na metodologia utilizada, nas condições de estocagem, assim como nas próprias características e qualidade das matrizes utilizadas são fatores que influenciam as concentrações de óxidos de colesterol encontradas (LAI, GRAY & ZABIK, 1995; GALOBART *et al.*, 2002; BRIKERHOFF *et al.*, 2002).

Em um estudo interlaboratorial, realizado com o intuito de harmonizar as metodologias analíticas para a quantificação de óxidos de colesterol, os autores citam valores bastante discrepantes. Uma mesma amostra de ovo desidratado foi analisada por 8 laboratórios. Para o 7-cetocolesterol as concentrações encontradas variaram de 1,45 a 5,88 $\mu\text{g/g}$ e um coeficiente de variação de 51% foi relatado. Para o 25-hidroxicolesterol uma variação ainda maior foi relatada. As concentrações mínima e máxima foram 0,02 e 0,36 $\mu\text{g/g}$, respectivamente e o coeficiente de variação, 68% (DUTTA *et al.*, 1999).

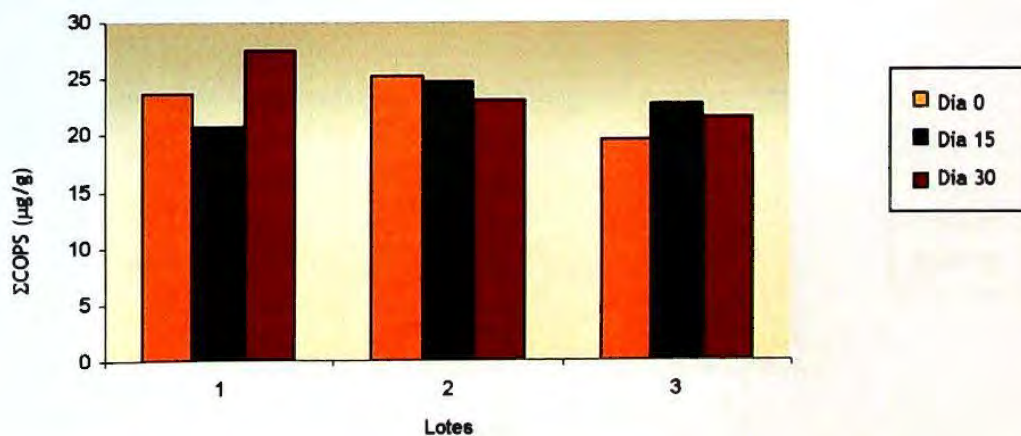


Figura 22: Média das concentrações de óxidos de colesterol (ΣCOPS) em amostras de ovo fresco.

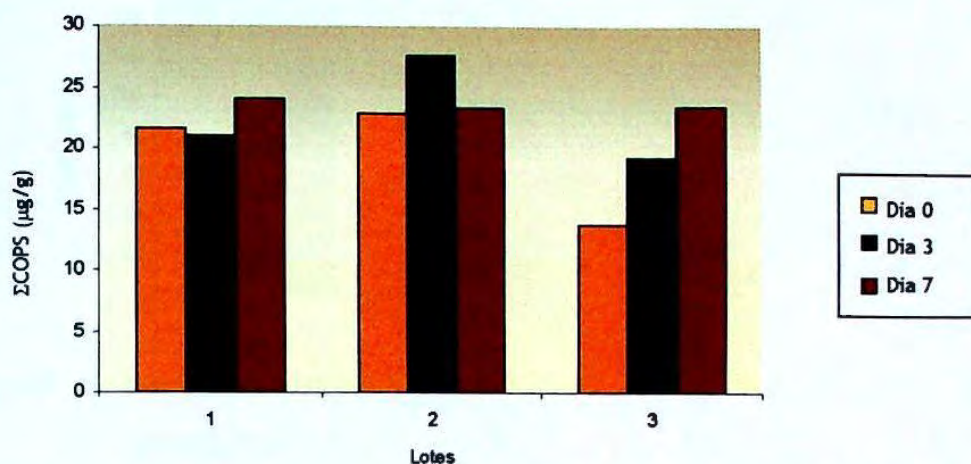


Figura 23: Média das concentrações de óxidos de colesterol (ΣCOPS) em amostras de ovo pasteurizado.

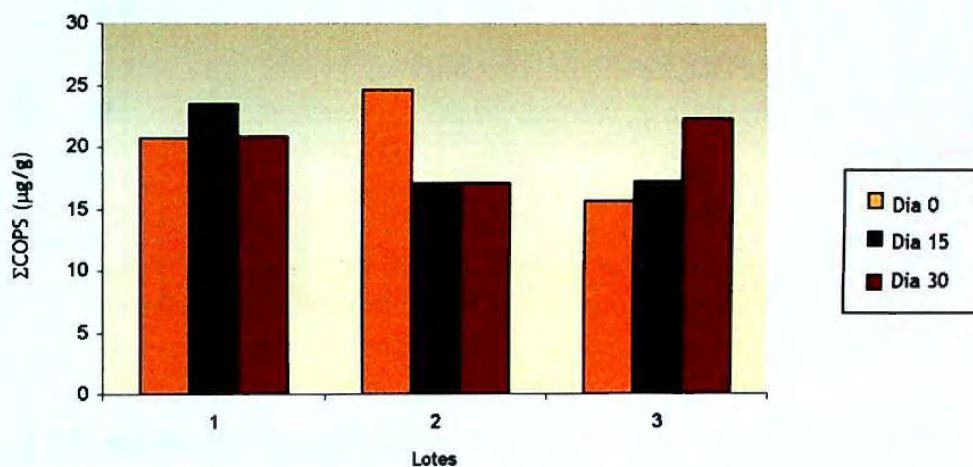


Figura 24: Média das concentrações de óxidos de colesterol (ΣCOPS) em amostras de ovo com teor de colesterol reduzido

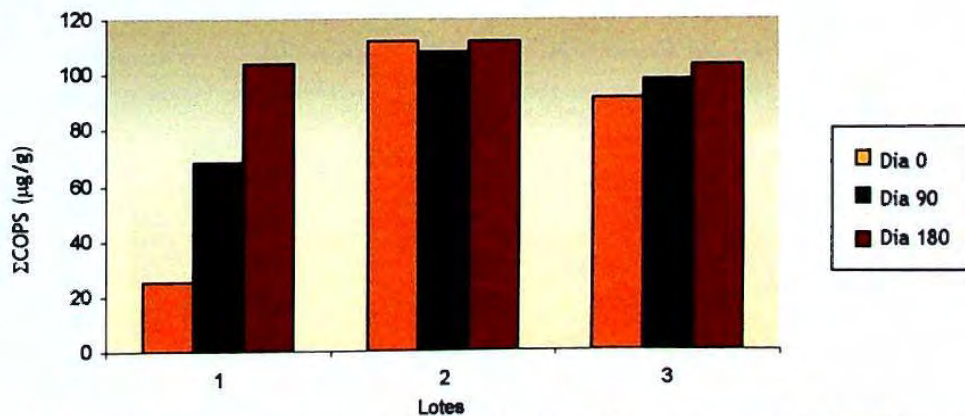


Figura 25: Média das concentrações de óxidos de colesterol (ΣCOPS) em amostras de ovo liofilizado

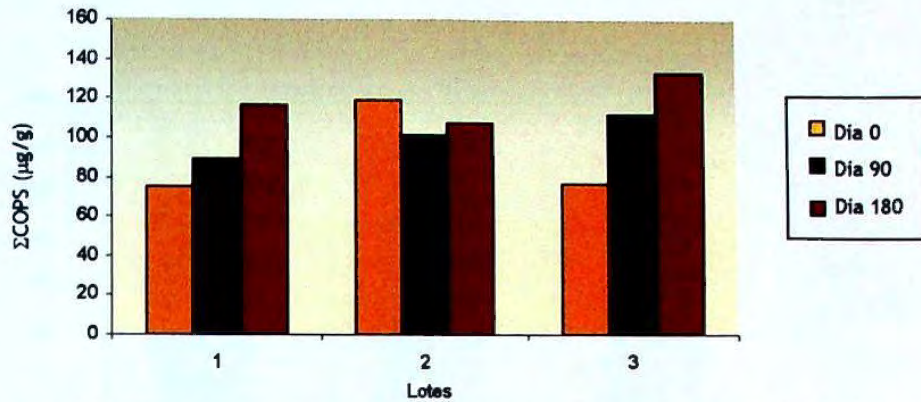


Figura 26: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de ovo atomizado

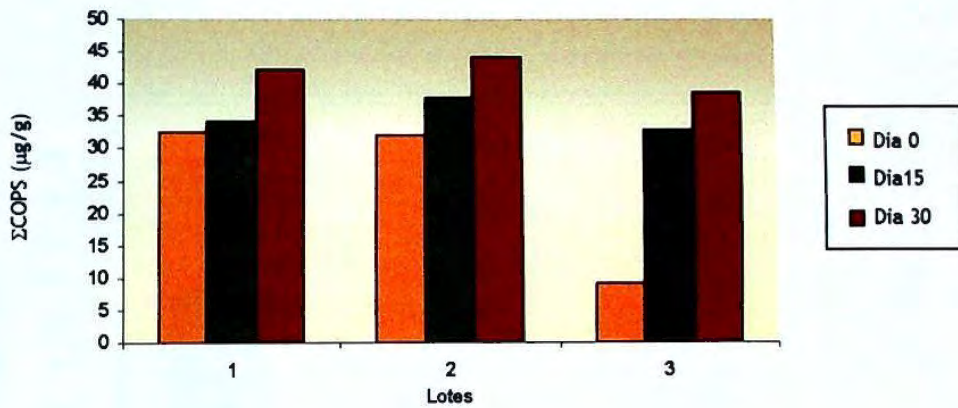


Figura 27: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de gema fresca

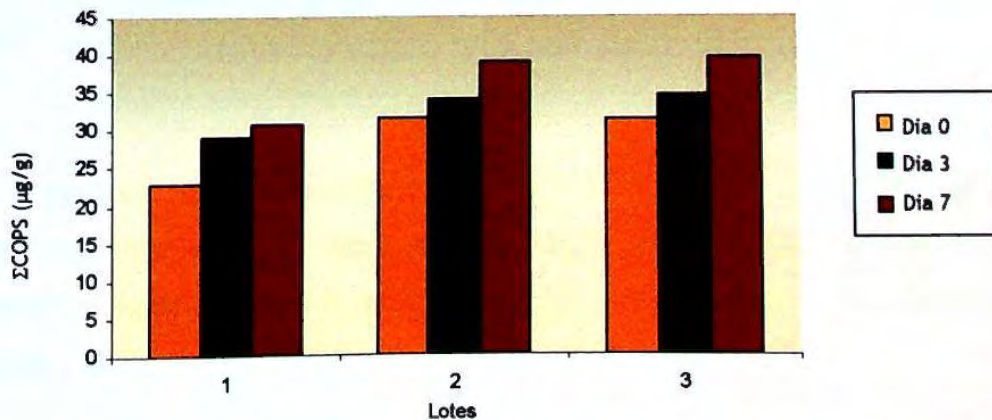


Figura 28: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de gema pasteurizada

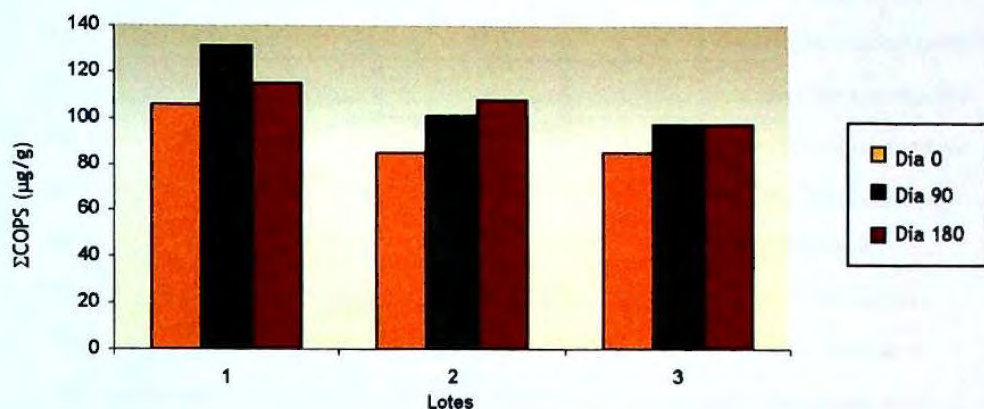


Figura 29: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de gema liofilizada

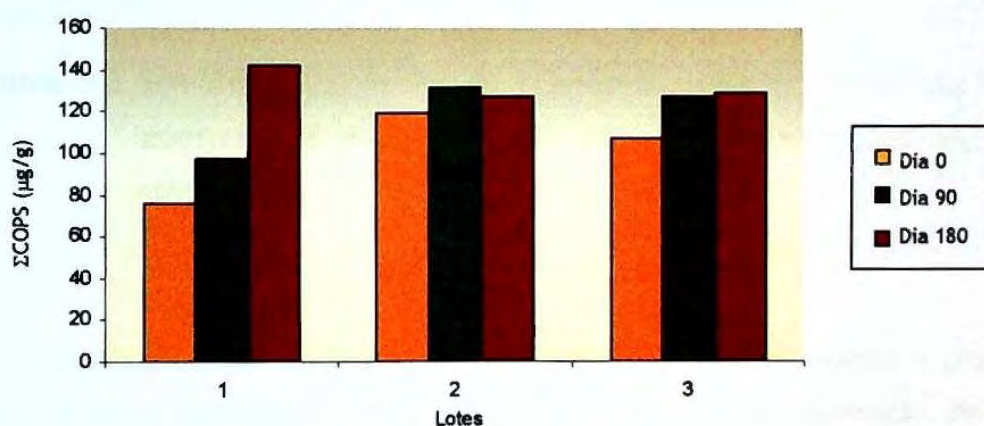
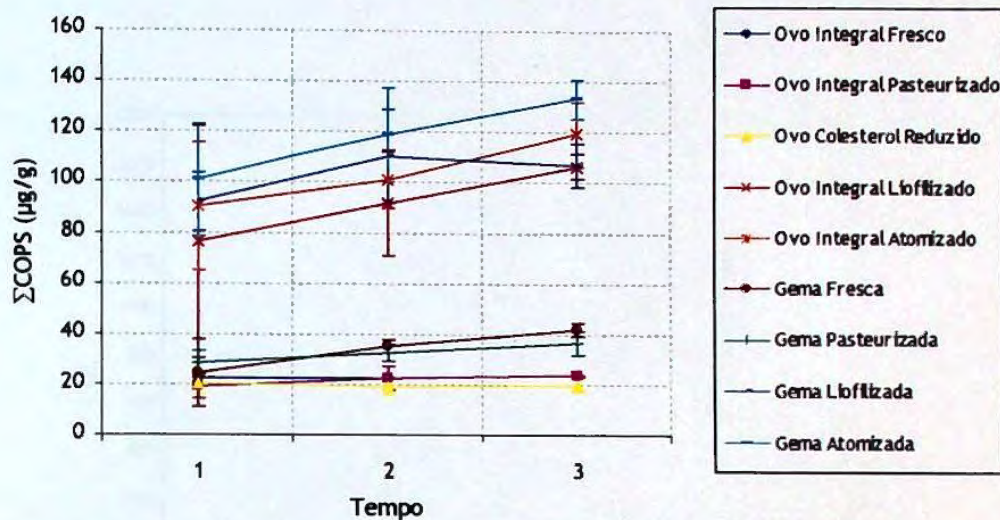


Figura 30: Média das concentrações de óxidos de colesterol (Σ COPS) em amostras de gema atomizada.

Embora a concentração de óxidos de colesterol tenha se apresentado aparentemente variável, após análise estatística observou-se que não houve diferença significativa dos valores médios ao longo da estocagem ($p > 0,05$) (Figura 31).



Tempo: Ovo Integral fresco, Ovo Integral Pasteurizado, Ovo Colesterol Reduzido, Gema Fresca e Gema Pasteurizada - Tempo 1= Dia 0, Tempo 2= Dia 15 e Tempo 3= Dia 30; Ovo Integral Atomizado, Ovo Integral Liofilizado, Gema Liofilizada e Gema Atomizada - Tempo 1= Dia 0, Tempo 2= Dia 90 e Tempo 3= Dia 180.

Figura 31: Somatório dos óxidos de colesterol (valores médios dos lotes) das amostras de ovos e gemas frescos e processados ao longo da estocagem.

Analisando os resultados obtidos para as amostras frescas e processadas, nota-se que a liofilização e a atomização influenciaram a formação de óxidos de colesterol pois observou-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para as amostras fresca e liofilizada assim como para as amostras fresca e atomizada. A pasteurização por sua vez aparentemente não influenciou a formação de óxidos de colesterol ($p > 0,05$).

Outro fato importante é a existência de uma correlação crescente entre a concentração de colesterol e a concentração de óxidos de colesterol formada, ou seja, quanto maior a concentração de colesterol presente no ovo, maior será a formação de óxidos de colesterol (Figura 32).

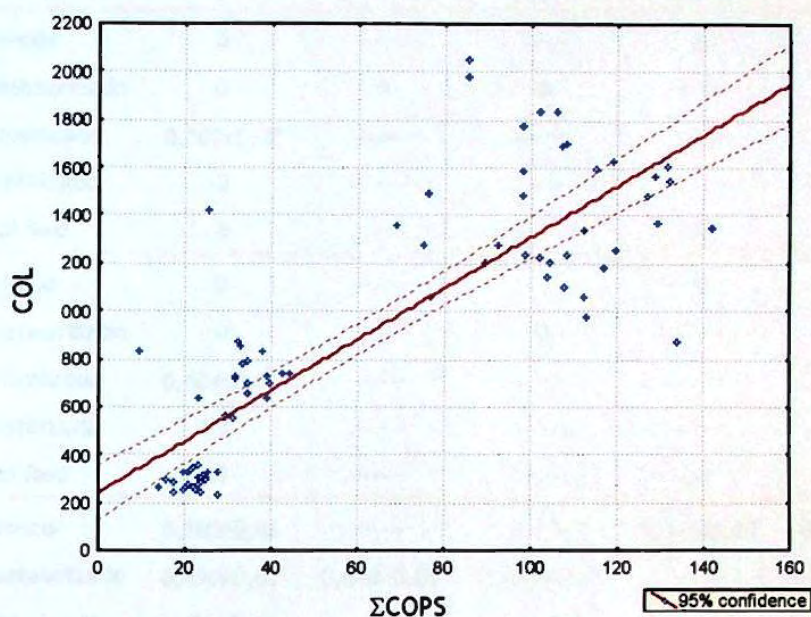


Figura 32: Correlação entre somatório dos óxidos de colesterol e colesterol.

5.6- SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIobarbitúrico - TBARS

Para a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi construída uma curva de calibração utilizando tetraetoxipropano (TEP). O coeficiente de correlação obtido ($R^2 = 0,9955$) representou boa linearidade da curva no intervalo estudado.

Tabela 16: Concentrações de TBARS* em ovo

	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 90	Dia 180
Fresco	0	-----	-----	0	0	-----	-----
Lote 1 Pasteurizado	0	0	0	-----	-----	-----	-----
Atomizado	0,709±0,02	-----	-----	-----	-----	0,728±0,04	0,741±0,02
Liofilizado	0	-----	-----	-----	-----	0,611±0,01	0,612±0,01
Col Red	0	-----	-----	0	0	-----	-----
Fresco	0	-----	-----	0	0	-----	-----
Lote 2 Pasteurizado	0	0	0	-----	-----	-----	-----
Atomizado	0,684±0,01	-----	-----	-----	-----	0,821±0,02	0,833±0,01
Liofilizado	0	-----	-----	-----	-----	0,677±0,03	0,684±0,01
Col Red	0	-----	-----	0	0	-----	-----
Fresco	0,100±0,01	-----	-----	0,130±0,01	0,200±0,02	-----	-----
Lote 3 Pasteurizado	0,470±0,01	0,640±0,01	0,610±0,01	-----	-----	-----	-----
Atomizado	1,90±0,01	-----	-----	-----	-----	0,900±0,196	1,34±0,04
Liofilizado	0	-----	-----	-----	-----	2,06±0,18	1,95±0,08
Col Red	0	-----	-----	0	0	-----	-----

*Valores em mg de malonaldeído/Kg.

Tabela 17: Concentrações de TBARS* em gema

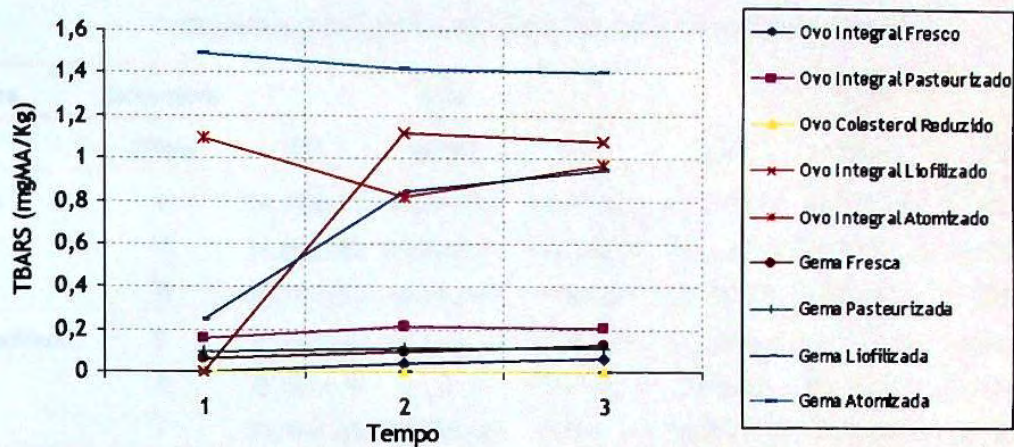
	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 90	Dia 180
Fresco	0,130±0,0	-----	-----	0,170±0,02	0,160±0,01	-----	-----
Lote 1 Pasteurizado	0,290±0,0	0,330±0,02	0,330±0,0	-----	-----	-----	-----
Atomizado	2,38±0,21	-----	-----	-----	-----	2,01±0,09	2,01±0,02
Liofilizado	0	-----	-----	-----	-----	0,66±0,03	0,74±0,01
Fresco	0,020±0,0	-----	-----	0,031±0,0	0,110±0,0	-----	-----
Lote 2 Pasteurizado	0	0	0	-----	-----	-----	-----
Atomizado	1,05±0,03	-----	-----	-----	-----	1,23±0,06	1,12±0,01
Liofilizado	0,358±0,02	-----	-----	-----	-----	0,936±0,03	1,01±0,04
Fresco	0,05±0,0	-----	-----	0,079±0,01	0,170±0,02	-----	-----
Lote 3 Pasteurizado	0	0	0	-----	-----	-----	-----
Atomizado	1,04±0,03	-----	-----	-----	-----	1,01±0,59	1,07±0,62
Liofilizado	0,375±0,02	-----	-----	-----	-----	0,929±0,01	1,09±0,01

*Valores em mg de malonaldeído/Kg.

Na Tabela 16 são relatados os valores de TBARS encontrados para as amostras de ovo. Pode-se notar que valores relativamente baixos foram encontrados para as amostras frescas, seguidas pelas amostras pasteurizadas, liofilizadas e atomizadas. As amostras frescas e atomizadas apresentaram valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), assim como as amostras frescas e liofilizadas, apontando a influência desses dois processamentos na oxidação.

Ainda observando a Tabela 16 pode-se dizer que no início da estocagem, as amostras não apresentaram oxidação lipídica significativa, já que não foi detectada a formação de malondaldeído. A exceção foi em relação a amostra atomizada. Este fato parece coerente, já que esse processamento utiliza relativamente altas temperaturas, estando portanto mais sujeitas a provocar a oxidação. Já para as amostras de gema fresca e processada observaram-se valores relativamente maiores (Tabela 17). KANG *et al* (2001) relataram a presença de 0,3 mg MA/kg em ovos integrais frescos. AYMOND & VAN ELSWYK (1995) e YANG & CHEN (2001) também obtiveram resultados superiores, 0,6 mg MA/kg e 1,99 mg MA/kg, respectivamente. Porém, GALOBART *et al.* (2001) relataram valores bem menores, em torno de 0,03 mg MA/kg.

Em relação à estocagem, após análise estatística observou-se que a concentração de TBARS não apresentou diferença significativa ao longo do tempo ($p > 0,05$) (Figura 33).



Tempo: Ovo Integral fresco, Ovo Integral Pasteurizado, Ovo Colesterol Reduzido, Gema Fresca e Gema Pasteurizada - Tempo 1= Dia 0, Tempo 2= Dia 15 e Tempo 3= Dia 30; Ovo Integral Atomizado, Ovo Integral Liofilizado, Gema Liofilizada e Gema Atomizada - Tempo 1= Dia 0, Tempo 2= Dia 90 e Tempo 3= Dia 180.

Figura 33: TBARS (valores médios dos lotes) das amostras de ovos e gemas frescos e processados ao longo da estocagem.

5.7- PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

As percentagens de ácidos graxos são apresentadas na Tabela 18. Todas as amostras apresentaram, de forma geral, valores bastante semelhantes.

Tabela 18: Percentagens de área de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados de ovos e gemas

Amostra	Estocagem (Dias)	OVO			GEMA		
		SAT	MONO	POLI	SAT	MONO	POLI
Fresco	0	36,90±0,09	44,36±0,07	15,72±0,03	33,11±0,02	48,71±0,03	14,45±0,01
	15	36,89±0,02	45,04±0,04	14,95±0,01	32,97±0,08	48,12±0,19	15,15±0,44
	30	37,59±0,02	42,50±0,04	16,86±0,02	32,9±0,07	48,04±0,25	15,19±0,42
Pasteurizado	0	35,74±0,14	45,24±0,22	15,97±0,06	32,58±0,46	45,12±0,21	15,93±0,19
	3	35,96±0,14	45,00±0	15,87±0,11	35,94±0	45,08±0,01	15,82±0,03
	7	35,93±0,03	44,98±0,02	16,03±0,05	35,93±0,03	45,09±0,01	15,79±0,01
Col Red	0	33,63±0,05	47,32±0,03	16,38±0,08	----	----	----
	15	33,49±0,01	47,17±0,04	16,65±0,04	----	----	----
	30	33,57±0,05	47,31±0,04	16,32±0,08	----	----	----
Atomizado	0	35,45±0,17	43,53±0,23	17,62±0,19	35,73±0,15	43,87±0,22	17,54±0,04
	90	35,52±0,06	44,13±0,11	17,46±0,12	35,64±0,03	43,81±0,05	17,64±0,11
	180	36,18±0,01	45,67±0,05	15,25±0,01	36,07±0,09	46,00±0	14,93±0,07
Liofilizado	0	36,93±0,05	46,10±0,07	13,62±0,06	35,94±0,03	45,10±0,02	15,78±0,02
	90	36,82±0,10	46,31±0,01	13,65±0,11	35,98±0	45,11±0,01	15,82±0,02
	180	36,93±0,02	46,53±0,01	13,35±0,15	35,91±0,02	45,14±0	15,79±0

As percentagens de área dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados encontradas no presente trabalho para ovos frescos estão de acordo com os valores relatados por CHERIAN, HOLSONBAKE, GOEGER (2002), ou seja, 35,2% de ácidos graxos saturados, 45,8% de monoinsaturados e 18,9% de poliinsaturados.

Embora muitos trabalhos relatem o aumento da concentração de ácidos graxos poliinsaturados através de sua adição à dieta das galinhas poedeiras, no presente trabalho aparentemente não foi observada diferença no perfil de ácidos graxos das amostras de ovo comum (aqui denominadas de ovo integral fresco) e ovo enriquecido com ácidos graxos ω -3 (aqui denominado de ovo com colesterol reduzido). Analisando os resultados obtidos para as referidas amostras (Tabela 18) pode-se observar que não há diferença significativa ($p > 0,05$) no perfil de ácidos graxos das mesmas.

Em um trabalho, BAUCCELLS e colaboradores (2000) utilizaram vários óleos de diferentes composições e avaliaram a incorporação de diferentes ácidos graxos poliinsaturados em ovos. Os pesquisadores também não obtiveram diferenças no perfil de ácidos graxos, embora tenham encontrado diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em relação ao processamento, os valores observados não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), ou seja, o processamento aparentemente não influenciou a estabilidade dos ácidos graxos presentes no ovo.

Observa-se que ao longo da estocagem não houve variação significativa do perfil de ácidos graxos das amostras de ovo e gema frescos e processados. Esse fato também foi constatado por GUARDIOLA e colaboradores (1995b) que trabalharam com ovos desidratados por atomização. Os referidos autores não observaram diferenças significativas no perfil de ácidos graxos de amostras de ovo congeladas, amostras atomizadas e estocadas durante 8,5 meses e 10 meses.

CONCLUSÕES

As percentagens de umidade e lípidos totais de ovo integral e gema frescos e estocados observados no presente trabalho estão coerentes com os valores relatados na literatura;

As concentrações de colesterol e óxidos de colesterol encontradas no presente trabalho também estão coerentes com os valores relatados na literatura;

Em relação aos processamentos utilizados para o ovo integral e para a gema, a atomização e a liofilização tiveram influência na formação de óxidos de colesterol;

A estocagem das amostras de ovo integral e gema durante os respectivos prazos de validade não influenciou a formação de óxidos de colesterol;

A pasteurização e a atomização influenciaram a estabilidade oxidativa, representada pela maior formação de TBARS porém, considerando-se o perfil de ácidos graxos, nenhum processamento teve influência significativa;

A estocagem também não influenciou significativamente a estabilidade oxidativa dos ácidos graxos insaturados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRIL, R. & BARCLAY, W. Production of docosahexaenoic acid-enriched poultry eggs and meat using an algae-based feed ingredient. *World Rev. Nutr. Diet.*, London, v. 83, p, 77-88, 1998.
- ADDIS, P. B.; GUARDIOLA, F.; CODONY, R. Analysis and health effects of cholesterol oxides. *Food Lipids and Health*. New York: Marcel Dekker Inc., 1996. 473p.
- AYMOND W.M. & VAN ELSWYK M.E. Yolk thiobarbituric acid reactive substances and n-3 fatty acids in response to whole and ground flaxseed. *Poult. Sci.*, Champaign, v. 74, p. 1388-1394, 1995.
- BAGGIO, S.R. & BRAGAGNOLO, N. Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 24, n. 1, p. 64-70, 2004.
- BAILEY'S INDUSTRIAL OIL & FAT PRODUCTS. *Edible oil & fat products: General applications*. 5.ed. John Wiley & Sons, Inc., v.1, 1996, 528p.
- BARUFFALDI, R. & OLIVEIRA, M.N. *Fundamentos de tecnologia de alimentos*. v. 3, São Paulo: Atheneu, 1998, 317p.
- BAUCELLS, M.D.; CRESP, N.; BARROETA, A.C.; LÓPEZ-FERRER, S.; GRASHORN, M.A. Incorporation of different polyunsaturated fatty acid into eggs. *Poult. Sci.*, Champaign, v. 79, p. 51-59, 2000.
- BEAN, L.D. & LEESON, S. Long-term effects of feeding flaxseed on performance and egg fatty acid composition of brown and white hens. *Poult. Sci.*, Champaign, v. 82, p. 388-394, 2003.

BEYER, R. S. & JENSEN, L.S. Overestimation of the cholesterol content of eggs, *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v.37, p. 917-920, 1989.

BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Comparison of the cholesterol content of Brazilian chicken and quail eggs. *J.Food Compos. Anal.*, San Diego, v. 16, p. 147-153, 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n.3. *Diário Oficial da União*, séc. 1, p.1-2, 14 jan 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Padrão de Identidade e Qualidade para o Ovo Integral. Resolução n. 005/91. Disponível em: <http://200.252.165.21/sda/legislacaoassunto.htm>. Acesso em 30 out. 2003.

BRINKERHOFF, B.E.; HUBBER, K.C.; HUBBER, C.S. PIKE, O.A. Effect of antioxidants on cholesterol oxidation in spray-dried egg yolk during extended ambient storage. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, v. 67, n. 8, p. 2857-2859, 2002.

BROWN, A.J. & JESSUP, W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, Shannon, v. 142, p. 1-28, 1999.

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

CHIEN, J.-T.; LU, Y.F.; HU, P.C.; CHEN, B.H. Cholesterol photooxidation as affected by combination of riboflavin and fatty acid methyl esters. *Food Chem.*, Barking, v. 81, p. 421-431, 2003.

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, H. & AHN, D.U. Effects of antioxidants and packaging on lipid and cholesterol oxidation and color changes of irradiated egg yolk powder. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, 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.; LEBOVICS, V.K.; PIHLAVA, J.-M.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; ULBERT, F. Measurements of cholesterol oxides in foods: Results of an interlaboratory comparison study. In: *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*. KUMPULAINEN & SALONEN Eds. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. VK. 1999. p. 309-315.

DVORKIN, V.I. & NARINOVA, I.N. Methods of determining cholesterol. *Zhurnal Analiticheskoi Khimii.*, v. 45. n. 5, p. 837-857, 1990.

ELSWYK, M.E.V. Comparison of n-3 fatty acid sources in laying hen rations for improvement of whole egg nutritional quality: a review. *Br. J. Nutr.*, London, v.78, suppl. 1, S61-S69, 1997.

ELSWYK, M.E.V.; SXCHAKE, L.S.; HARGIS, P.S. Research note: Evaluation of two extraction methods for the determination of egg yolk cholesterol. *Poult. Sci.*, Champaign, v. 70, p. 1258-1260, 1991.

- EMANUEL, H.A.; HASSEL, C.A.; ADDIS, P.B.; BERGMANN, S.D.; ZAVORAL, J.H. Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 56, n.3, p. 843-847, 1991.
- EVANGELISTA, J. *Tecnologia de alimentos*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2. ed. 1989. 678p.
- FAUST, C.B. & JASSAL, S.S. *Lipids - a consumers guide*. Edu. Chem., London, p. 15-17, 1993.
- FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS/USP, *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. Disponível em: <http://143.107.7.148/tabela/tbcamenu.php>. Acesso em: 01 ago. 2003.
- FENTON, M. Chromatographic separation of cholesterol in foods. *Journal of Chromatogr.*, Amsterdam, v. 624. p. 369-388, 1992.
- FINEP CONSULTORIA & COMERCIO. *ANNUALPEC, Anuário da Pecuária Brasileira*. 2001.
- FINOCCHIARO, E.T. & RICHARDSON, T. Sterol oxides in foodstuffs: a review. *J. Food Prot.*, Ames, v. 46, n. 10, p. 917-925, 1983.
- FOLCH, J., LEES, M. & STANLEY, G.H.S. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 226, p. 497-509. 1957.
- FONTANA, A.; ANTONIAZZI, F.; CIAVATTA, M.L.; TRIVELLONE, E.; CIMINO, G. ¹H-NMR study of cholesterol autoxidation in egg powder and cookies exposed to adverse storage. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 58, n.6, p. 1286-1290, 1993.

- FONTANA, A.; ANTONIAZZI, F.; CIMINO, G.; MAZZA, G.; TRIVELLONE, E.; ZANONE, B. High resolution NMR detection of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk. *J. Food Sci.*, Chicago, v.57, n.4, p. 869-872, 1992.
- FRANCO, G. *Tabela de composição química dos alimentos*. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 230p.
- FUNK, W.; DAMMANN, V. & DONNEVERT, G. *Quality assurance in analytical chemistry*, Weinheim : VCH, 1995, 238p.
- GALOBART, J.; BARROETA, A.C.; BAUCCELLS, M.D.; GUARDIOLA, F. Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with ω 3 and ω 6 polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxanthin supplementation. *Poult. Sci.*, Champaign, v. 80, p. 327-337, 2001.
- GARCIA, C. & ALBALA, C. Composición lipídica de huevos de gallinas alimentadas con productos grasos y proteicos marinos. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Caracas, v. 48, n. 1, p. 71- 76, 1998.
- GRANELLI, K.; FALDT, P.; APPELQVIST, L.-A.; BERGENSTAHL, B. Influence of surface structure on cholesterol oxidation in model food powders. *J. Sci. Food Agric.*, London, v 71, p. 75-82, 1996.
- GRUNE, T.; KRÄMER, K.; HOPPE, P.P.; SIEMS, W. Enrichment of Eggs with n-3 Polunsaturated Fatty acids: Effects of Vitamin E Supplementation. *Lipids*, Champaign, v. 36, n. 8, p. 833-838, 2001.

- GUARDIOLA, F.; DUTTA, P.C.; CODONY, R.; SAVAGE, G.P. **Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects**. Champaign:AOCs Press., 2002. 394p.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; REFECAS, M.; GRAU, A.; JORDÁN, A.; BOATELLA, J. Oxysterols formation in spray-dried egg processed and stored under various conditions: prevention and relationship with other quality parameters. *J. Food. Chem.*, Columbus, v. 45, p. 2229-2243, 1997.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P.B.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, v. 34, n. 2, p. 193-211, 1996.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Formacion de derivados oxidados del colesterol en alimentos. *Grasas Aceites*, Seville, v. 46, n. 3, p. 202-212, 1995c.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; MANICH, A.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Stability of polyunsaturated fatty acids in egg powder processed and stored under various conditions. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 43. p. 2254- 2259. 1995b.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; GRAU, A.; JORDÁN, A.; BOATELLA, J. Oxysterol formation in egg powder and relationship with other quality parameters. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 43, p. 1903-1907, 1995a.

- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Metodologia analítica para la determinación de oxisteroles, *Grasas Aceites*, Seville, v.45, n.3, p. 164-192, 1994.
- HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Lab. Pract.*, London, v. 22, p. 475-476, 1973.
- HENNIG, B. & BOISSONNEAULT, G.A. Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol decreases barrier function of cultured endothelial cell monolayers. *Atherosclerosis*, Shannon, v. 68, p. 355-261, 1987.
- HOOJJAT, P. & DOWSON, L.E. Lipid Stability of Cooked, Diced and Frozen Eggs. *Poult. Sci.*, Champaign, v. 58, p. 156-161, 1979.
- HU, P.C. & CHEN, B.H. Effects of riboflavin and fatty acid methyl esters on cholesterol oxidation during illumination. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 50, p. 3572-3578, 2002.
- HUBBARD, W.D.; SHEPPARD, A.J.; NEWKIRK, D.R.; PROSSER, A.R.; OSGOOD, T. Comparison of various methods for the extraction of total lipids, fatty acids, cholesterol, and other sterol from food products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 54, p. 81-81, 1977.
- IBRAHIM, N.; UNKLESBAY, N.; KAPILA, S.; PURI, R.K. Cholesterol content of restructured pork/soy hull mixture. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 55, n. 6, p. 1488-1490, 1990.
- IMAI, H.; WERTHESSEN, N.T.; SUBRAMANYAM, V.; LEQUESNE, P.W.; SOLOWAY, A.H.; KANISAWA, M. Angiotoxicity of oxygenated sterols and possible precursors. *Science*, London, v. 207, n. 2, p. 651-653, 1980.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz : métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. v.1, São Paulo, 1985, , 533p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Consumo alimentar domiciliar per capita anual. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo>. Acesso em: 08 set. 2003.

INSTITUTO DE ESTUDIOS DEL HUEVO, Composition. Disponível em: <http://www.institutohuevo.com/scripts/composicion.asp>. Acesso em 08 set. 2003.

JIANG, Z. FENTON, M., SIM, J. Comparison of four different methods for egg cholesterol determination, *Poult. Sci.*, Champaign, v.70, p.1015-1019, 1991.

KANDUTSCH, A.A. & CHEN, H.W. Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by 7 β -hydroxi cholesterol, 7 α -hydroxy cholesterol and 7-keto cholesterol. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 248. p. 8408-8417. 1973 In KUMAR, N. & SINGHAL, O.P. Cholesterol oxides and atherosclerosis : a review. *J. Sci. Food Agric.*, London, v. 55. p. 497-510, 1991.

KANG K.R., CHERIAN, G. & SIM, J.S. Dietary palm oil alters the lipid stability of polyunsaturated fatty acid-modified poultry products. *Poult. Sci.*, Champaign, v. 80, p. 228-234, 2001.

KEITH, L.H.; GRUMMETT, W.; DEEGIM JR, J.; LIBBY, R.A.; TAYLOR, J.K.; WENTLER, G. Principles of environmental analysis. *Anal. Chem.*, Washington, v. 55, n. 14, p. 2211-2218, 1983.

KENDALL, C.W.; KOO, M.; SOKOLOFF, E.; KESAVA-RAO, G. Effects of dietary oxidized cholesterol on azoxymethane-induced colonic preneoplasia in mice. *Cancer Lett.*, Shannon, v. 66, p. 241-248, 1992.

KIM, S.K. & NAWAR, W.W. Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids*, Champaign, v. 28, n. 10, p. 917-922, 1993.

KIM, S.K. & NAWAR, W.W. Oxidative interactions of cholesterol with triacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 68, n. 12, p. 931-934, 1991.

KING, I.B. Lipids in Foods : chemistry and nomenclature. *Handbook of lipids in human nutrition*. Boca Raton: CRC Press, 1995. 233p.

KUMAR, N. & SINGHAL, O.P. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. *J. Sci. Food Agric.*, London, v.55, p. 497-510, 1991.

LAI, S.-M.; GRAY, J.I.; ZABIK, M.E. Evaluation of solid phase extraction and gas chromatography for determination of cholesterol oxidation products in spray-dried whole egg. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 43, p. 1122-1126, 1995.

LAI, S.-M.; GRAY, J.I.; PARTRIDGE, J.A.; FLEGAL, C. Stability of cholesterol and paprika carotenoids in egg powders as influenced by dietary and processing treatments. *J. Sci. Food Agric.*, London, v. 72, p. 171-178, 1996a.

LAI, S.-M.; GRAY, J.I.; CHEN, C.; GRULKE, E.A. Nitrogen oxide-initiated cholesterol oxidation and carotenoid degradation in an egg lipid model system. *J.Sci.Food Agric.*, London, v.72, p. 179 - 186, 1996b.

LAI, S.-M.; 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.*, Washington, v. 43, p. 1127-1131, 1995.

LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J. Nutr. Biochem.*, Stonehm, 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.*, San Diego, v.13, p. 625-631, 2000.

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

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

LINSEISEN, J. & WOLFRAM, G. Absorption of Cholesterol Oxidation Products from Ordinary Foodstuff in Humans, *Annal. Nutr. Metab.*, Basel, v. 42, p. 221-230, 1998b.

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

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

MARSHALL, A.C., SAMS, A.R. & VAN ELSWYK. Oxidative Stability and Sensory Quality of Stored Eggs From Hens Fed 1,5% Menhaden Oil. *J. Food Sci.*, Chicago, v.59, n.3, p.561-563, 1994.

MARSIGLIA, D.A.P.; 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.

McNAMARA, D.J. Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1529, p. 310-320, 2000.

MENDONÇA JR, C.X.; MARTINS, A.P.; MORI, A.V.; SILVA, E.B.; MORI, C.S. Efeito da adição de óleo de peixe à dieta sobre o desempenho e níveis plasmáticos e de colesterol no ovo de galinhas poedeiras. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 37, n.1, p. 00-00, 2000.

MOREL, D.W. & LIN, C.Y. Celular bochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. *Nutr. Biochem.*, New York, v.7, p. 495-506, 1996.

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

MOURTHÉ, K. & MARTINS, R.T. Perfil de colesterol de ovos comerciais e ovos enriquecidos com ácidos graxos polinsaturados ômega-3. *Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 54, n. 4, p. 429-431. 2002.

- NOGUEIRA, G.C. & BRAGAGNOLO, N. Utilização de um método enzimático para determinação de colesterol em ovo em pó. *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, p. 15-18, 1998.
- 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. 57-62, 1987.
- OHSIMA, T.; FUJITA, Y.; KOIZUMI, C. Oxidative stability of sardine and mackerel lipids with reference to synergism between phospholipid and alpha tocopherol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 70, n. 3, p. 269-276, 1993.
- OHTANI, K.; TERADA, E.; KAMEI, M.; MATSUI-YUASA, I. Cytotoxicity of cholestane 3 β ,5 α ,6 β -triol on cultured intestinal epithelial crypt cells (IEC-6). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Tokyo, v. 61, n. 4, p.573-576, 1997.
- OHTANI, K.; MIYABARA, K.; OKAMOTO, E.; KAMEI, M.; MATSUI-YUASA, I. Cytotoxicity of 7-ketocholesterol toward cultured rat hepatocytes and the effect of vitamin E. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Tokyo, v. 60, n. 12, 1989-1993, 1996.
- OSADA, K.; SASAKI, E. & SUGANO, 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. A critical review. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 60, n. 6, p. 1159-1174, 1995.

- PAPAS, A.M. Diet and antioxidant status. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, v. 37, p. 999-1007, 1999.
- PASIN, G.; SMITH, G.M.; O'MAHONY, M. Rapid determination of total cholesterol in egg yolk using commercial diagnostic cholesterol reagent. *Food Chem.*, Barking, v. 61, n. 1/2, p. 255-259, 1998.
- PENAZZI, G.; CABONI, M.F.; ZUNIN, P.; EVANGELISTI, F.; TISCORNIA, E.; GALLINA-TOSCHI, T.; LERCKER, G. Routine HPLC determination of free 7-ketocholesterol in some foods by two different analytical methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.72, n.12, p. 1523-1527, 1995.
- PENG, S.; HU, B. & MORIN, R.J. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. *J. Clin. Labor. 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.*, Washington, v.38, p. 973-979, 1990.
- PINEIRO-AVILA, G.; Microwave assisted saponification of animal grasses for cholesterol determination. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 371, p. 297-303, 1998.
- PIIRONEN, V.; TOIVO, J.; LAMPI, A.-M. New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs and their products consumed in Finland. *J. Food Compos. Anal.*, San Diego, v. 15, p. 705-713, 2002.

RANKIN, S.A. & PIKE, O.A. Cholesterol autoxidation inhibition varies among several natural antioxidants in a aqueous model system. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 58, n. 3, p. 653-655, 1993.

RAHMAN, M.S. *Handbook of Food Preservation*. New York:Marcel Dekker. 1999. 809p.

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

RINCON, A.M.; Contenido de colesterol en carne de pollo y sus productos manufacturados. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Caracas, v. 74, n. 1, p. 81-84, 1997.

SALEM, N., SIMOPOULOS, A.P., GALLI, C.; LAGARDE, M.; KNAPP, H.R. Fatty acids and lipids from cell biology to human disease, *Lipids*, Champaign, v.31, suppl, p. S1-S326, 1996.

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.*, Ames, 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 Sidney, v.45, n.10, p.485-490, 1993.

SCHERZ, H.; SENSER, F. & SOUCI, W. *Food Composition and Nutrition Tables*. 6.ed. Stuttgart: CRC Press. 2000. 1182p.

- SEVANI, A. & PETERSON, A.R. The formation and cytotoxic properties of cholesterol oxides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 62, n. 4, p. 633-635, 1986.
- SIM, J.S. Designer eggs and their nutritional and functional significance. *World Rev. Nutr. Diet.*, New York, v. 83. p. 89-101. 1998.
- SIMOPOULOS, A.P., LEAF, A. & SALEM, N. Essentiality and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann. Nutr. Metab.*, Basel, v. 43, p. 127-130, 1999.
- SMITH, L.L. Mechanisms of formation of oxysterols: a general survey. *Free Radical Lipoproteins and Membrane Lipids*. New York: Plenum Press, 1990, 409p.
- SMITH, L.L. & JOHNSON, H. Biological activities of oxysterols. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v. 7, p. 285-332, 1989.
- SMITH, L.L. Cholesterol autoxidation. *Chem. Phys. Lipids*, Shannon, v. 44, p. 87-125, 1987.
- SOTELO, A. & GONZÁLEZ, L. Huevo en polvo con bajo contenido de colesterol. Características nutricionales y sanitarias Del producto. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Caracas, v. 50, n. 2, p. 134-141, 2000.
- STAPRANS, I.; PAN, X.-M.; RAPP, J.H.; FEINGOLD, K.R. Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum. *J. Lipid Res.*, New York, v.44, n.4; p. 705-715. 2003.

- SWEENEY, J.P. & WEIHRAUCH, J.L. Summary of available data for cholesterol in foods and methods for its determination. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Cleveland, p. 131-159. 1976. 1976.
- 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. 1999a.
- 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. 1999b.
- TORRES, E.A.F.S.; CAMPOS, N.C.; DUARTE, M.; GARBELOTTI, M.L.; PHILIPPI, S.T.; RODRIGUES, R.S.M. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 20, n. 2, p. 145-150, 2000.
- UAUY, R. & VALENZUELA, A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*, Burbank, v.16, n.7/8, p. 680-684, 2000.
- UBHAYASEKERA, S.J.K.A., VERLEYEN, T., DUTTA, P.C. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chem.*, Barking, v. 84, p. 149-157, 2004.
- 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.

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

YANG, S.C. & CHEN, K.H. The oxidation of cholesterol in yolk of selective traditional chinese egg products. *Poult. Sci.*, Champaign, v. 80, p. 370-375, 2001.