

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E TEMPO DE
ESTOCAGEM NA FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL E
NA ALTERAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM
OVOS**

MÔNICA ROBERTA MAZALLI
ZOOTECNISTA

Profa Dra NEURA BRAGAGNOLO
ORIENTADORA

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Ciência de Alimentos**

Campinas 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Mazalli, Mônica Roberta
M456e Efeito do processamento térmico e tempo de estocagem
na formação de óxidos de colesterol e na alteração da
composição de ácidos graxos em ovos / Mônica Roberta
Mazalli. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

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

1. Ácidos graxos. 2. Colesterol. 3. Óxidos de
colesterol. 4. Ovos. I. Bragagnolo, Neura. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: The effect of heat treatment and storage time in the formation
of cholesterol oxides and alteration of the fatty acids composition in eggs

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fatty acids, Cholesterol, Cholesterol
oxides, Eggs

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Neura Bragagnolo

Douglas Emygdio de Faria

Jane Gonçalves Menegaldo Snow

Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Luiz Antônio Gioielli

Sueli Regina Baggio

Membros da Banca examinadora

Profa. Dra. Neura Bragagnolo
(Orientadora)

Prof. Dr. Douglas Emygdio de Faria

Dra. Jane Golçalves Menegaldo Snow

Profa. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Golçalves

Prof. Dr. Luiz Antônio Gioielli

Dra. Sueli Regina Baggio

CAMPINAS, 2006

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas, Departamento de Ciência de Alimentos, pela oportunidade oferecida para a realização do Doutorado.

A Professora Dra. Neura Bragagnolo pela orientação, amizade, compreensão durante estes anos de convívio.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pela bolsa de estudo.

À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A Professora Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Golçalves do Laboratório de Óleos e Gorduras da UNICAMP, pela colaboração na realização das análises de vitamina E.

A Dra Sueli Regina Baggio do ITAL pela orientação nas análises laboratoriais.

Aos professores do Departamento de Ciência de Alimentos, em especial as profas Florinda O. Bobbio e Adriana Mercadante pelo apoio e convivência.

Aos funcionários do Departamento da Ciência de Alimentos pela colaboração.

A banca examinadora, Douglas Emygdio de Faria, Jane Gonçalves Menegaldo Sonow, Lireny Aparecida Guaraldo Golçalves e Luiz Antônio Gioielli pelas correções e sugestões.

A toda minha família pelo incentivo, compreensão e apoio.

Aos amigos da pós-graduação, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e apoio nas horas mais difíceis em especial, Alessandro, Itaciara, Cinthia e Veridiana.

Aos amigos não citados, que tornaram nossos momentos aqui vividos agradáveis.

Ficam aqui meus agradecimentos a todos que de uma ou outra forma emprestaram sua colaboração para que esta dissertação se tornasse uma realidade.

À minha querida família
Pai Roberto, Mãe Maria e Irmãs Flávia e Marcia

Meu marido Medina
Com todo o meu amor

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xii
GENERAL SUMMARY	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

OVOS: MECANISMOS QUE ENVOLVEM A OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E COLESTEROL E IMPLICAÇÕES DE SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO	6
RESUMO	7
1. INTRODUÇÃO	7
2. ASPECTOS GERAIS DOS OVOS	9
3. COLESTEROL	11
4. OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS	11
5. ÓXIDOS DE COLESTEROL	13
6. EFEITOS BIOLÓGICOS DOS ÓXIDOS DE COLESTEROL	15
7. METODOLOGIAS DE DETERMINAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL	17
8. ÁCIDOS GRAXOS EM OVOS	19
9. METODOLOGIAS DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS	21
10. EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E TEMPO DE ESTOCAGEM NA FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL E NA ALTERAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM OVOS	23
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

Capítulo 2

HPLC METHOD FOR QUANTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHOLESTEROL AND ITS OXIDATION	39
--	----

PRODUCTS IN EGGS	
ABSTRACT	40
INTRODUCTION	41
MATERIAL & METHODS	42
Solvents and chemicals	42
Samples	43
Optimization of the saponification and extraction procedure	43
HPLC Equipment and Conditions	43
Mass spectrometry	44
Method validation	44
Statistical analysis	45
RESULTS AND DISCUSSION	45
Optimization of the conditions for saponification and extraction	45
Simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides by HPLC-UV-RI	48
Characterization, quantification and confirmation of cholesterol and cholesterol oxides by HPLC-APCI-MS	49
Method validation	52
Application of methodology on eggs samples	57
REFERENCES	58

Capítulo 3

COMPARATIVE STUDY BETWEEN METHODS AND VALIDATION OF THE METHOD TO DETERMINE FATTY ACIDS IN EGGS	62
ABSTRACT	63
INTRODUCTION	64
MATERIAL & METHODS	66
Solvents and chemicals	66
Samples	66
Experimental correction factor for the fatty acids EPA and DHA	67
Comparison of the methods and validation of the method to determine the fatty acid composition	67

CG equipment and conditions	67
Determination of the lipid and moisture contents	68
Statistical analysis	68
RESULTS AND DISCUSSION	68
Experimental correction factor for the fatty acids EPA and DHA	68
Comparison of the methodologies of Joseph & Ackman (2) and Wang et al. (3) for the determination of fatty acids in egg.	68
Validation of the methodology for the determination of fatty acids in eggs by gas chromatography using internal standardisation	69
Determination of the total lipid and moisture contents	70
Application of the methodology to eggs	71
REFERENCES	74

Capítulo 4

EFEITO DA ESTOCAGEM NA FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL E ALTERAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM OVO EM PÓ	77
RESUMO	78
INTRODUÇÃO	79
MATERIAL E MÉTODOS	80
Material	80
Amostras	81
Extração de Lipídios	81
Determinação de Umidade	81
Determinação de Ácidos Graxos	81
Determinação Simultânea de Colesterol e Óxidos de Colesterol por CLAE-UV-IR (cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta e índice de refração)	82
Análises estatísticas	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
Teores de Lipídios Totais e Umidade em Ovo em Pó	83
Composição de Ácidos Graxos em Ovo em Pó	83
Teores de Colesterol e Óxidos de Colesterol em Ovo em Pó	90

LITERATURA CITADA	95
Capítulo 5	
EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E TEMPO DE ESTOCAGEM NA FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL E NA ALTERAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM OVOS ENRIQUECIDOS COM ÔMEGA 3	99
RESUMO	100
INTRODUÇÃO	101
MATERIAL E MÉTODOS	102
Material	102
Amostras	103
Extração de Lipídios	103
Determinação de Umidade	103
Determinação de Ácidos Graxos	104
Determinação Simultânea de Colesterol e Óxidos de Colesterol por CLAE-UV-IR (cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta e índice de refração)	104
Determinação de Vitamina E	105
Análises Estatísticas	105
RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
Teores de Lipídios Totais e Umidade em Ovos Enriquecidos com Ômega-3	105
Composição de Ácidos Graxos em Ovos Enriquecidos com Ácidos graxos Ômega-3	106
Teores de Vitamina E em Ovos Enriquecidos com Ômega 3	114
Teores de Colesterol e Óxidos de Colesterol em Ovos Enriquecidos com Ômega 3	114
LITERATURA CITADA	121
Capítulo 6	
EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E TEMPO DE ESTOCAGEM NA FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL E NA ALTERAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM OVOS	125
RESUMO	126

INTRODUÇÃO	127
MATERIAL E MÉTODOS	128
Material	128
Amostras	128
Extração de Lipídios	129
Determinação de Umidade	129
Determinação de Ácidos Graxos	129
Determinação Simultânea de Colesterol e Óxidos de Colesterol por CLAE-UV-IR (cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta e índice de refração)	129
Análises Estatísticas	130
RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
Teores de Lipídios Totais e Umidade em Ovos	130
Composição de Ácidos Graxos em Ovos	132
Teores de Colesterol e Óxidos de Colesterol em Ovos	136
LITERATURA CITADA	142
CONCLUSÕES GERAIS	146

RESUMO GERAL

Um novo método foi desenvolvido para determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol em ovos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores ultra violeta (UV) e índice de refração (IR). A quantificação foi realizada por padronização externa e a confirmação do colesterol e dos óxidos de colesterol foi feita com cromatógrafo líquido com interface de ionização química à pressão atmosférica e espectro de massas (APCI-MS). Através de planejamentos fatoriais completos com pontos centrais foram definidas as melhores condições de saponificação das amostras e extração da matéria insaponificável. Nas condições cromatográficas utilizadas, foram separados o colesterol e os seguintes óxidos: 19-hidroxicolesterol (19-OH), 20 α -hidroxicolesterol (20 α -OH), 22(R)-hidroxicolesterol (22(R)-OH), 24(S)-hidroxicolesterol (24(S)-OH), 22(S)-hidroxicolesterol (22(S)-OH), 25-OH, 7-ceto, 7 β -OH, 7 α -OH, 5,6 α -epoxi, 5,6 β -epoxi e triol. O método proposto mostrou ter alta sensibilidade e precisão, com recuperações de colesterol variando de 92 a 102% e dos óxidos de colesterol de 93 a 96%. Os LD encontrados para os óxidos de colesterol variaram de 0,002 a 0,079 μ g/g e para o colesterol o LD foi de 0,026 μ g/g. Os LQ encontrados para os óxidos de colesterol variaram de 0,002 a 0,042 μ g/g e para o colesterol o LQ foi de 0,088 μ g/g. O teor de colesterol do material de referência certificado foi de $19,0 \pm 0,2$ mg/g de gema, sendo igual ao valor referido no material.

Foi realizado um estudo comparativo entre a extração de lipídios segundo Folch et al. (1957) seguido do preparo dos ésteres metílicos de acordo com Joseph e Ackman (1992) através da saponificação e metilação com trifluoreto de boro em metanol e a metilação direta da amostra segundo WANG et al. (2000). O método da extração de lipídios seguido de esterificação apresentou os melhores resultados de exatidão e precisão e foi validado utilizando material de referência certificado de ovo em pó (SRM 8415).

O teor de colesterol, óxidos de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos foram determinados em amostras de ovo em pó, ovos enriquecidos com ômega 3 e ovos comuns. Duas marcas comerciais de ovo em pó foram armazenadas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro e analisadas no tempo zero e mensalmente até os seus prazos de validade de 6 e 12 meses, respectivamente. Dois lotes de ovos enriquecidos com ômega 3 e ovos comuns foram armazenados a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro e a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ na geladeira, por 45 e 21 dias, respectivamente. As amostras foram analisadas no tempo zero e a cada 15 dias. Em cada tempo e nos tipos de armazenamento, foram analisados 36 ovos que foram divididos em 3 partes. Uma das partes (12 ovos) foi analisada na forma crua e as outras duas foram submetidas a dois tipos de tratamentos térmicos, cozimento e fritura. Em todas as amostras o teor de colesterol não foi reduzido durante os tempos de estocagem. Nos ovos enriquecidos com ômega 3 e nos ovos comuns o menor teor de colesterol foi observado nos ovos que foram fritos.

Nas amostras de ovo em pó foram identificados 5 óxidos: 7-ceto, $7\beta\text{-OH}$, $7\alpha\text{-OH}$, $5,6\alpha\text{-epoxi}$ e $5,6\beta\text{-epoxi}$, os quais elevaram-se durante o período de estocagem. Nos ovos enriquecidos com ômega 3 e nos ovos comuns foram identificados 3 óxidos: 7-ceto, $7\beta\text{-OH}$ e $7\alpha\text{-OH}$, cujas concentrações foram maiores nos ovos que foram fritos. Nos tempos de estocagem, o comportamento destes óxidos foi diferente entre os tipos de ovos. Nos ovos enriquecidos com ômega 3, as concentrações dos óxidos de colesterol 7-ceto e $7\alpha\text{-OH}$ elevaram-se durante o período de armazenamento. Por outro lado, o teor de $7\beta\text{-OH}$ foi reduzido no tempo 1 nas amostras cozidas e cruas e nas fritas houve aumento durante o tempo de estocagem. Nos ovos comuns, o teor de 7-ceto aumentou do tempo zero até o tempo 1 e depois foi reduzido até o tempo final tanto nas amostras cruas como nas que receberam tratamentos térmicos. Para o $7\beta\text{-OH}$ houve aumento do tempo zero até o tempo 2 e manteve-se constante até o final do armazenamento. Para o $7\alpha\text{-OH}$ o aumento foi do tempo zero até o tempo 1 e posteriormente foi reduzido.

As diferentes condições de armazenamento, tanto nos ovos enriquecidos com ômega 3 como nos ovos comuns, somente influenciaram o óxido 7-ceto, que foi maior nos ovos que foram armazenados a 25°C.

No ovo em pó, o teor de lipídios totais foi de 35 g/100g, permanecendo constante durante o período de estocagem. Nos ovos enriquecidos com ômega 3 e nos ovos comuns, os lipídios totais foram reduzidos nos ovos que sofreram fritura.

Os principais ácidos graxos determinados em todas as amostras foram: C14:0, C16:0, C18:0, C16:1 n7, C18:1 n9, C18:2 n6, C20:4 n6 e C18:3 n3. Em adição, o C22:6 n3 e o C18:1 n9 *trans* foram principais nos ovos enriquecidos com ômega 3 e nos ovos em pó, respectivamente. Em todas as amostras a estocagem ocasionou redução dos ácidos graxos insaturados, evidenciando que ocorreu oxidação lipídica com produção de radicais livres que devem ter contribuído para o aumento dos óxidos de colesterol. Nos ovos enriquecidos com ômega 3 e nos ovos comuns, os tratamentos térmicos, especialmente a fritura, reduziu a concentração de ácidos graxos insaturados.

Palavras-chaves: ácidos graxos, colesterol, óxidos de colesterol, ovos.

GENERAL SUMMARY

A new method was determined for the simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides in eggs, using high performance liquid chromatography (HPLC) with ultra-violet (UV) and refractive index (RI) detectors. External standardisation was used for quantification and the cholesterol and cholesterol oxides were confirmed by liquid chromatography interfaced to atmospheric pressure chemical ionisation coupled to mass spectrometry (APCI-MS). The best conditions for sample saponification and extraction of the non-saponifiable matter were defined using complete factorial designs with central points. Under the chromatographic conditions used, cholesterol was separated from the following oxides: 19-hydroxycholesterol (19-OH), 20 α -hydroxycholesterol (20 α -OH), 22(R)-hydroxycholesterol (22(R)-OH), 24(S)-hydroxycholesterol (24(S)-OH), 22(S)-hydroxycholesterol (22(S)-OH), 25-OH, 7-keto, 7 β -OH, 7 α -OH, 5,6 α -epoxy, 5,6 β -epoxy and triol. The proposed method was shown to be highly sensitive and precise, with recovery of cholesterol from 92 to 102% and of cholesterol oxides from 93 to 96%. The DL found for the cholesterol oxides varied from 0.002 to 0.079 $\mu\text{g/g}$ and for cholesterol it was 0.026 $\mu\text{g/g}$. The QL values encountered were from 0.002 to 0.042 $\mu\text{g/g}$ for the cholesterol oxides and 0.088 $\mu\text{g/g}$ for cholesterol. The cholesterol content determined for the certified reference material was 19.0 ± 0.2 mg/g of egg yolk, identical to the value declared on the certificate.

A comparative study was carried out between the method of lipid extraction according to Folch et al. (1957) followed by methyl ester preparation according to Joseph & Ackman (1992) by saponification and methylation with boron trifluoride, and the method of direct methylation according to Wang et al. (2000). The method of lipid extraction followed by esterification presented more precise and exact results and was thus validated using the certified powdered egg reference material (SRM 8415).

The cholesterol, cholesterol oxide, total lipid and fatty acid contents were determined in samples of egg powder, eggs enriched with omega 3 and normal eggs. Two commercial brands of egg powder were stored at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ in the dark and analysed at zero time and subsequently every month during the period of their shelf lives (6 and 12 months, respectively). Two batches of eggs enriched with omega 3 and normal eggs were stored in the dark at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and at $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in the refrigerator, for 45 and 21 days respectively. The samples were analysed at zero time and at 3 further periods during storage. At each time, for each type of storage, 36 eggs were analysed, divided into 3 parts. One of the parts (12 eggs) was analysed raw and the other two were submitted to two types of heat treatment, boiling and frying. The cholesterol content did not decrease in any of the samples during storage. In both the eggs enriched with omega 3 and the normal eggs, the lowest cholesterol contents were observed in the fried eggs.

Five oxides were identified in the powdered eggs: 7-keto, $7\beta\text{-OH}$, $7\alpha\text{-OH}$, 5,6 α -epoxy and 5,6 β -epoxy, and their contents increased during storage. Three oxides were identified in the eggs enriched with omega 3 and the normal eggs: 7-keto, $7\beta\text{-OH}$ and $7\alpha\text{-OH}$, their concentrations being higher in the fried eggs. During storage the behaviour of the oxides varied according to the type of egg. In the eggs enriched with omega 3, the concentrations of the oxides 7-keto and $7\alpha\text{-OH}$ increased during storage. On the other hand, the $7\beta\text{-OH}$ content decreased up to time 1 in the cooked and raw samples but increased during storage in the fried samples. In normal eggs, the 7-keto content increased from zero to time 1 and then reduced up to the end of storage in both the raw and heat-treated samples. For $7\beta\text{-OH}$, the content increased from zero to time 2 and then remained constant. For $7\alpha\text{-OH}$, the increase was from zero to time 1, subsequently decreasing.

In both the normal eggs and those enriched with omega 3 the different storage conditions only influenced the oxide 7-keto, which was greater in eggs stored at 25°C .

In egg powder, the total lipid content was 35 g/100g and remained constant during the storage period. In the eggs enriched with omega 3 and the normal eggs, the total lipid contents decreased in the fried eggs.

The principal fatty acids determined in all the samples were: C14:0, C16:0, C18:0, C16:1 n7, C18:1 n9, C18:2 n6, C20:4 n6 and C18:3 n3. In addition, C22:6 n3 and C18:1 n9 *trans* were principal components in the eggs enriched with omega 3 and the egg powder respectively. In all samples the unsaturated fatty acid contents decreased during storage, evidence that lipid oxidation had occurred with the production of free radicals which contributed to the increase in cholesterol oxides. In the eggs enriched with omega 3 and the normal eggs, the heat treatments, specifically frying, reduced the unsaturated fatty acid concentrations.

Keywords: cholesterol, cholesterol oxides, eggs, fatty acids.

INTODUÇÃO GERAL

O ovo é um alimento que apresenta proteína de alto valor biológico, vitaminas e minerais. Por outro lado, o teor de colesterol do ovo por ser elevado resultou em acentuada diminuição do seu consumo per capita nas últimas décadas, principalmente pela associação do colesterol com o desenvolvimento de enfermidades cardiovasculares (SIM, 1998). Atualmente, estudos demonstram que são os produtos da oxidação do colesterol que participam diretamente no processo de aterogênese (BROWN et al., 1997; STAPRANS et al., 1998; GARCIA-CRUSET et al., 2001).

O colesterol é susceptível à oxidação por conter uma insaturação em sua estrutura química. A oxidação do colesterol em alimentos ocorre através do processo de autooxidação que envolve reações em cadeia com a formação de radicais livres de forma semelhante com que ocorre a oxidação de lipídios insaturados (SMITH, 1996). Durante o processamento e o armazenamento de alimentos, a presença de calor, luz, oxigênio, baixa atividade de água e de ácidos graxos insaturados pode desencadear a oxidação do colesterol (PANGIANGVAIT, 1995; DIONISI et al., 1998).

As altas temperaturas utilizadas no preparo doméstico dos ovos como o cozimento e fritura, assim como o processamento dos ovos por “spray-dryer” o qual resulta no ovo em pó, bastante utilizado pela indústria de massas e produtos de panificação, é sem dúvida um dos principais fatores que contribui para formação de óxidos de colesterol (GUARDIOLA et al., 1995; GUARDIOLA et al., 1997). Em adição, no processo de “spray-dryer” as altas temperaturas utilizadas ocorrem através do aquecimento do ar pela combustão de gás, no qual, são produzidos óxidos de nitrogênio que atuam como catalisadores da transformação dos ácidos graxos insaturados *cis* em ácidos graxos insaturados *trans* (WHEELER, 1980). O consumo de ácidos graxos *trans* representa um fator de risco à aterosclerose, porque aumenta o LDL-colesterol e Lp(a) sanguíneo (CLEVIDENCE et al., 1997; OH et al., 2005) e reduz o teor de HDL-colesterol (SUBBASIAH et al., 1998; ASCHERIO et al., 1999). Soma-se ao fato

que os ácidos graxos insaturados presentes nos ovos são compostos que apresentam baixa estabilidade oxidativa, podendo originar radicais livres durante o preparo térmico ou estocagem que aceleram a formação dos óxidos de colesterol. Segundo WASOWICZ (2003) o colesterol está sujeito à oxidação, inicialmente, pela ação de hidroperóxidos originados da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados.

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, 20α -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e triol (TAI, 1999).

Estudos recentes, além de referir os óxidos de colesterol como sendo aterogênicos, também os consideram como sendo citotóxicos (BEST et al., 1998), imunossupressores (OSADA et al., 2000) e carcinôgenicos (YAMASAKI et al., 1999). Além disso, são inibidores da síntese endógena de colesterol e estão relacionados com o desenvolvimento de doenças degenerativas como o mal de Alzheimer (KOLSCH et al., 1999; LUTJOHANN et al., 2000) e catarata (GIRAO et al., 1998).

Desta forma, é importante considerar que a oxidação lipídica é uma das principais reações que ocorrem durante o aquecimento e estocagem dos alimentos, que além de ocasionar perdas do seu valor nutricional, produzem compostos que causam danos à saúde. Na literatura encontram-se poucos trabalhos que relacionam o colesterol, lipídios totais e ácidos graxos dos ovos com a formação de óxidos de colesterol durante o armazenamento e através do preparo térmico rotineiramente utilizado como o cozimento e fritura. Em adição, é necessário o desenvolvimento de pesquisas sobre as alterações ocorridas nos teores de ácidos graxos, durante o processamento e estocagem destes alimentos e a correlação das alterações ocorridas com a formação de óxidos de colesterol. Apesar dos efeitos prejudiciais causados à saúde com o consumo de alimentos contendo óxidos de colesterol e ácidos graxos *trans*, merecem atenção especial as técnicas de processamento e estocagem de alimentos ricos em colesterol e lipídios, visando minimizar a produção dos mesmos em alimentos.

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram: (1) otimizar e validar metodologia para a determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol em ovos, (2) realizar estudo comparativo entre métodos e validar método para determinação de ácidos graxos em ovos, (3) verificar o efeito do processamento térmico e tempo de estocagem na formação de óxidos de colesterol e na alteração da composição de ácidos graxos em ovos comuns, ovos enriquecidos com ômega-3 e ovo em pó.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASCHERIO, A.; KATAN, M.B.; STAMPFER, M.J.; WILLET, W.C. R. Trans fatty acid and coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340 (25), p. 1994-1998, 1999.
- BEST, P.J.M.; HASDAI, D.; SANGIORGI, G.; SCHWARTZ, R.S.; HOLMES, D.R.Jr; SIMARI, R.D. LERMAN, A. Apoptosis, basic concepts and implications in coronary artery disease. **Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 14-22, 1998.
- BROWN, A.J.; LEONG, S.L.; DEAN, R.T.; JESSUP, W. 7-hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and in human atherosclerotic plaque. **J. Lipid Res.**, v. 38, p. 1730-1745, 1997.
- CLEVIDENCE, B.A.; JUDD, J. T.; SCHAEFER, E.J.; JENNER, J. L.; LICHTENSTEIN, A.H.; MUESING, R.A.; WITTES, J.; SUNKIN, M.E. Plasma lipoprotein (a) levels in men and women consuming diets enriched in saturated, cis or trans-monounsaturated fatty acids. **Arterios. Thromb. Vasc. Bio.**, v.17, p.1657-1661, 1997.
- DIONISI, F.; GOLAY, P.A.; AESCHLIMANN, J.M.; FAY, L.B. Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: Methods Comparison and Validation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 2227-2233, 1998.
- GARCIA-CRUSET. S.; CARPEBTER, K.L.H.; GUARDIOLA, F.; STEIN, B.K.; MITCHINSON, M.J. Oxysterol profile of normal arteries, fatty streaks an advanced lesions. **Free Radic. Res.**; v. 35, p. 31-41, 2001.

- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; MANICH, A.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Stability of polyunsaturated fatty acids in eggs powder processed and stored under various conditions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 2254-2259, 1995
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; GRAU, A.; JORDAN, A.; BOATELLA, J. Oxysterol formation in spray-dried egg processed and storage under various conditions: prevention and relationship with other quality parameters. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 229-2243, 1997.
- GIRAO, H.; MOTA, M.C.; PAMALHO, J.; PEREIRA, P. Cholesterol oxides accumulation in human cataracts. **Exp. Eye Res.**, v. 66, p. 645-652, 1998.
- KOLSCH, H.; LUTJOHANN, D.; TULKE, A.; BJORKHEM, I.; RAO, M.L. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Brain Res.**, v. 818, p. 171-175, 1999.
- LUTJOHANN, D.; PAPASSOTIROPOULOS, A.; BJORKHEM, I.; LOCATCKKI, S.; BAGLI, M.; OEHRING, R.D.; SCHLEGEL, U.; JESSEN, F.; RAO, M.L.; von BERGMANN, K.; HEUN, R. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. **J. Lipid Res.**, v. 41, p. 195-198, 2000.
- OSADA, K.; MINEHIRA, K.; INOUE, S.; NAKAMURA, S.; YAMADA, K.; SUNGANO, M. Effect of oxidized cholesterol on age associated changes to immune parameters in spleen lymphocytes and peritoneal exudates cells derived from rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, p. 1047-1051, 2000.
- PANIANGVAIT, P.; KING, A.J.; JONES, A.D.; GERMAN, B.G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **J. Food Sci.**, v. 60, p. 1159-1174, 1995.
- SIM, J.S. Designer eggs and their nutritional and functional significance. **World Rev. Nutr. Diet.**, v. 83, p. 89-101, 1998.
- SMITH, L.L. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. **Lipids.**, v. 31, p. 453-487, 1996.
- STAPRANS, I.; PAN, X.M.; RAPP, J.H.; FEINGOLD, K.R. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. **Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.**, v. 18, p. 977-983, 1998.

STRYER, L. Metabolismo: conceitos e planos básicos. **Bioquímica 4ª edição**, p.429, 1996.

SUBBASIAH, P.V.; SUBRAMANIAM, V.S.; LIU, M.. Trans unsaturated fatty acids inhibit lecithin: cholesterol acyltransferase and alter its position specificity. **J. Lipid Res.**, v. 39, p. 1438-1446, 1998.

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

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

OVOS: MECANISMOS QUE ENVOLVEM A OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E COLESTEROL E IMPLICAÇÕES DE SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO

RESUMO

O colesterol está presente em todos os produtos de origem animal e o ovo é um dos alimentos que possui maior teor de colesterol, cuja estrutura química possui uma ligação insaturada e, portanto, está sujeito a oxidação. O ovo possui também alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, compostos extremamente suscetíveis à oxidação, originando principalmente radicais livres que promovem a formação dos óxidos de colesterol. Além disso, as condições de processamento e estocagem dos ovos também podem contribuir para a degradação do colesterol e dos ácidos graxos.

1. INTRODUÇÃO

O ovo é um alimento que contém proteína de alta digestibilidade e um perfil de aminoácidos essenciais que equivale ao balanço ideal de aminoácidos diariamente necessários para o homem (SURAI & SPARKS, 2001). Em um ovo, aproximadamente 5% são de colesterol livre e 1% corresponde ao colesterol na forma esterificada. A fração lipídica da gema corresponde, em média, 33% de seu peso (NOBLE et al., 1990). Apesar do ovo ser um alimento que fornece proteína, vitaminas e minerais a baixo custo, seu teor de colesterol contribuiu para um acentuado declínio de seu consumo nas últimas décadas, principalmente pela associação do colesterol com o desenvolvimento de enfermidades cardiovasculares (SIM, 1998).

O consumo per capita de ovos no México, Japão, Estados Unidos e China é de 359, 345, 307 e 304, respectivamente. No Brasil, o consumo per capita de ovos é de apenas 84 ovos/habitante/ano (APA, 2006), sendo que o consumo recomendado pela FAO (2006) é de 200 ovos/habitante/ano.

O colesterol é um esteróide essencial na modulação de fluidez das membranas celulares, sendo necessário para o crescimento e viabilidade das células. Participa da síntese de hormônios esteróides, ácidos biliares e vitamina D (STRYER, 1996).

O colesterol é susceptível à oxidação e os fatores que podem desencadear a sua oxidação são a luz, oxigênio, radiação, calor, ácidos graxos poliinsaturados e metais de transição (SMITH, 1987; KIM & NAWAR, 1993), que formam compostos denominados óxidos de colesterol.

Vários estudos caracterizam os óxidos de colesterol como sendo carcinogênicos (KENDALL et al., 1992; YAMASAKI et al., 1999), citotóxicos (MORIN et al., 1991; OHTANI et al., 1996; 1997), mutagênicos (GUARDIOLA et al., 1996) e aterogênicos (HODIS et al., 1994; STAPRANS et al., 1998). Além disso, estes compostos estão associados ao desenvolvimento de doenças degenerativas, como Parkinson e Alzheimer (IMAO et al., 1998; HINO et al., 1998) e inibição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase envolvida na síntese do colesterol (GUARDIOLA et al., 1996; LINSEISEN & WOLFRAM, 1998).

Os óxidos de colesterol mais freqüentemente encontrados em alimentos são o 7-cetocolesterol, 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 5,6 α -epoxicolesterol, 5,6 β -epoxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e colestanoltriol (SANDER et al., 1989; TAI, 1999). No entanto, os teores de óxidos de colesterol citados na literatura variam largamente e deve-se em grande parte à metodologia analítica empregada. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (GC) são freqüentemente usadas para a quantificação. Recentemente, a CLAE com interface de ionização química à pressão atmosférica e espectro de massas (CLAE-APCI-MS) tem sido a técnica que apresenta maior sensibilidade e precisão na quantificação e identificação dos óxidos de colesterol (CRERI et al., 1998; RAZZAZI-FAZELI et al., 2000; RAITH et al., 2005).

Rotineiramente, as metodologias de determinação de ácidos graxos em alimentos são através de cromatografia gasosa (CG), seus ésteres metílicos são detectados por ionização em chama e os resultados são expressos em porcentagem de área, utilizando o método de normalização. No entanto, nutricionalmente, é importante saber a quantidade de cada ácido graxo

presente no alimento e, portanto, é necessário que a quantificação seja realizada por padronização interna.

Considerando que os ovos apresentam alto teor de colesterol e ácidos graxos insaturados, a susceptibilidade à oxidação lipídica aumenta. De acordo com WASOWICZ (2003), os hidroperóxidos originados da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados podem promover a oxidação do colesterol. Além disso, o processamento e o armazenamento de alimentos ricos em colesterol e ácidos graxos insaturados também podem contribuir para a formação de óxidos de colesterol e degradação de ácidos graxos. A presente revisão aborda o estado da arte sobre os mecanismos de oxidação de colesterol e ácidos graxos, métodos utilizados nas análises de óxidos de colesterol e de ácidos graxos e o efeito do processamento térmico e tempo de estocagem na formação de óxidos de colesterol e na alteração da composição de ácidos graxos em ovos.

2. ASPECTOS GERAIS DOS OVOS

Nas aves poedeiras o ovário é o responsável pela formação da gema do ovo. Os principais precursores da gema são a vitelogenina e as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) ricas em triacilgliceróis, sendo sintetizadas no fígado e transportadas através do plasma para o ovário (GRIFFIN, 1992). As lipoproteínas são estruturas organizadas responsáveis pelo transporte de lipídios no sangue, cuja solubilização depende do arranjo molecular destas lipoproteínas, ou seja, triacilgliceróis e colesterol esterificados ficam na porção central das lipoproteínas e são envolvidos por fosfolipídios e colesterol livre (WALSEN, 1996).

Os lipídios da gema são compostos por 66% de triacilgliceróis e 28% de fosfolipídios. Dos fosfolipídios, 73% são de fosfatidilcolina, 3% de esfingomielina, 2% de lisofosfatidiletanolamina, 1% de plasmógeno e 1% de fosfolipídio inositol (LI-CHAN et al., 1995).

Na gema, 95% do colesterol está associado à VLDL e o restante está ligado a lipovitelina que é um complexo lipídio-proteína formado da hidrólise da vitelogenina (NOBLE et al., 1990).

Nas aves, os receptores da membrana plasmática dos oócitos possuem alta afinidade para as VLDL que são incorporadas de forma intacta, e desta forma, o nível de colesterol na gema depende do conteúdo de colesterol das partículas de VLDL da gema e não da concentração de colesterol no plasma sanguíneo das aves (GRIFFIN, 1992). A entrada de VLDL na gema é regulada pela taxa de receptores nas membranas e não é limitada pela concentração de VLDL do plasma (PERRY et al., 1985).

O metabolismo das lipoproteínas de alta densidade (HDL) que transportam os lipídios do tecido periférico para o fígado para sua reutilização ou excreção, é modificado durante a produção de ovos. A concentração de HDL no plasma de galinhas em produção é reduzida em até 3 vezes em relação àquelas que não estão em produção. Segundo WALZEN (1996), quando as aves estão em produção ocorre redução na concentração de fosfolipídios e colesterol não esterificado para serem incorporados na HDL, devido principalmente ao mecanismo favorecido pela VLDL que transporta os lipídios para o metabolismo periférico.

A concentração de colesterol na gema é muito resistente a mudanças porque a ave mantém um determinado nível de colesterol para garantir o desenvolvimento do embrião (SHAFEY & CHAM, 1994). Por outro lado, a ave tem habilidade em alterar o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados na gema, em resposta ao tipo de fonte de lipídios fornecidos na ração. Isto ocorre porque nas aves, ao contrário dos mamíferos, a absorção da gordura da dieta ocorre via sistema portal na forma de portomicrons que são absorvidos diretamente para o sangue e transportados para o fígado, que é o maior local de lipogênese, permitindo assim a absorção direta da gordura pelo fígado (Van-ELSWYK et al., 1994).

3. COLESTEROL

O colesterol é componente estrutural das membranas celulares e das lipoproteínas plasmáticas. Sendo um esteróide apresenta a estrutura básica do ciclopentanoperidrofenantreno (Figura 1). Esta nomenclatura é devido aos anéis A,B,C que correspondem à estrutura dos fenantrenos e ao anel D que é um ciclopentano.

O colesterol contém uma dupla ligação no carbono 5, e deste modo, os pontos susceptíveis da estrutura à oxidação são os carbonos nas posições 4 e 7. Entretanto, devido a possível influência do grupo hidroxila no carbono 3, o oxigênio raramente ataca nas posições dos carbonos 4 e 5, sendo predominante no carbono 7 (WASOWICZ, 2003). As setas da Figura 1 indicam as posições da estrutura do colesterol que são mais susceptíveis à oxidação (SMITH, 1987). A presença de luz, oxigênio, radiação, calor, metais de transição e ácidos graxos poliinsaturados podem desencadear a oxidação de colesterol (PANIANGVAIT et al., 1995; SMITH, 1996).

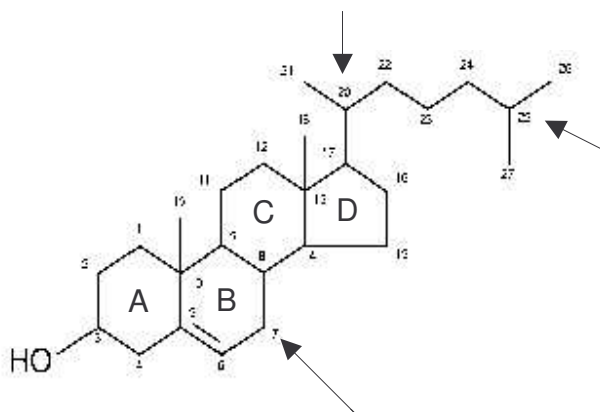


Figura 1. Estrutura do colesterol

4. OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A oxidação do colesterol envolve a autooxidação de ácidos graxos insaturados, que são extremamente susceptíveis à oxidação, originando

principalmente radicais livres e hidroperóxidos que aceleram a formação dos óxidos de colesterol (WASOWICZ, 2003). Segundo SMITH (1987) a oxidação dos ácidos graxos ataca a porção colesteril das moléculas de éster de colesterol.

A autooxidação de ácidos graxos insaturados ocorre com reações em cadeia de radicais livres em fases distintas. A primeira fase é de iniciação, onde ocorre abstração de um hidrogênio de um carbono do ácido graxo formando um radical alquil ou radical de um ácido graxo. A abstração do hidrogênio ocorre preferencialmente nos átomos de carbono onde há necessidade de baixa energia para a dissociação da ligação C-H. Desde que a energia de dissociação da ligação C-H é reduzida pelos grupos alquil, a abstração do hidrogênio ocorre rapidamente nos grupos metil entre dois grupos alquil na estrutura dos ácidos graxos poliinsaturados. A segunda fase é da propagação com a adição de oxigênio no radical alquil, formando um peróxido radical que irá abstrair átomos de hidrogênio de outro ácido graxo. A fase da propagação é comumente catalisada por metais de transição. A entalpia da reação de propagação é mais baixa que a fase de iniciação e, por isso, ocorre rapidamente. O oxigênio atmosférico reage muito rapidamente com os radicais alquil e os peróxidos radicais estão presentes em concentrações mais elevadas que os radicais alquil. Na fase de terminação, os radicais de ácidos graxos e os peróxidos combinam-se entre si formando moléculas estáveis (GORDON, 2001).

Os ácidos graxos poliinsaturados também podem ser oxidados enzimaticamente pela ação da lipoxigenase. A lipoxigenase contém um átomo de ferro em sua estrutura. A enzima abstrai hidrogênio do grupo metil dos ácidos graxos poliinsaturados e o ferro é reduzido, formando-se um complexo radical enzima-alquil que é oxidado pelo oxigênio molecular formando um complexo radical enzima-peroxi. A protonação e dissociação da enzima originam os hidroperóxidos. Sob condições anaeróbicas, o radical alquil dissocia-se do complexo radical enzima-alquil produzindo dímeros, cetonas e epóxidos por reações de radicais (GORDON, 2001).

5. ÓXIDOS DE COLESTEROL

A expressão óxidos de colesterol refere-se a um grupo de esteróis com estrutura similar ao do colesterol, mas que contém um grupo adicional hidroxila, cetona ou grupo epóxido no núcleo esterol ou no grupo hidroxila da cadeia lateral da molécula (MOREL & CHEN, 1996; WASOWICZ, 2003).

No tecido humano e animal, os óxidos de colesterol podem ser formados por oxidação enzimática ou não-enzimática do colesterol, ou então serem obtidos através da dieta (LEONARDUZZI et al., 2002).

A oxidação enzimática do colesterol ocorre por inúmeras enzimas do citocromo P-450 do fígado, como a colesterol 7 α -hidrolase, 26-hidrolase, 7-cetodesidrogenase e 5 α ,6 α -epoxidase (LEONARDUZZI et al., 2002). Por outro lado, a atividade da 26-hidrolase foi verificada em várias células, incluindo fibroblastos, endoteliais, macrófagos e células cerebrais. Em adição, a origem enzimática dos óxidos de colesterol é possível através da ação das desidrogenases e dioxigenases, mas ainda não bem documentada (LINSEISEN & WOLFRAM, 1998).

A oxidação não-enzimática do colesterol em alimentos ocorre através do processo de autooxidação que envolve reações em cadeia com a formação de radicais livres de forma semelhante com que ocorre com a oxidação de lipídios insaturados (SMITH, 1996).

A oxidação do colesterol pode ser iniciada pela retirada do hidrogênio, no carbono 7, formando um radical livre que reage rapidamente com o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) levando a formação de 7 α e 7 β -hidroperoxicolesterol, considerados os produtos primários da oxidação do colesterol. A posterior decomposição dos 7 α e 7 β -hidroperoxicolesterol resulta na formação de seus álcoois correspondentes, o 7 α e 7 β -hidroxicolesterol. A desidrogenação dos 7 α e 7 β -hidroxicolesterol ou a desidratação dos 7 α e 7 β -hidroperoxicolesterol, resulta no 7-cetocolesterol. Os compostos 7 α e 7 β -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol são produtos secundários da oxidação do colesterol (NIELSEN

et al., 1995). O mecanismo de autooxidação do colesterol pode ser observado na Figura 2 (SMITH et al., 1981; SMITH, 1996).

Os 5,6 α e 5,6 β -epoxicolesterol são formados pela reação do colesterol com o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) e espécies reativas de oxigênio como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radicais superóxidos ($^{\bullet}\text{O}_2^-$), peróxidos ($\text{ROO}^{\bullet}$), alcóxilas ($\text{RO}^{\bullet}$) e hidroxilas ($\text{OH}^{\bullet}$), os quais em meio aquoso podem resultar na formação do colestanoetriol que tem sido reportado como sendo o mais tóxico (SMITH, 1987; 1990; 1996; MAERKER, 1987).

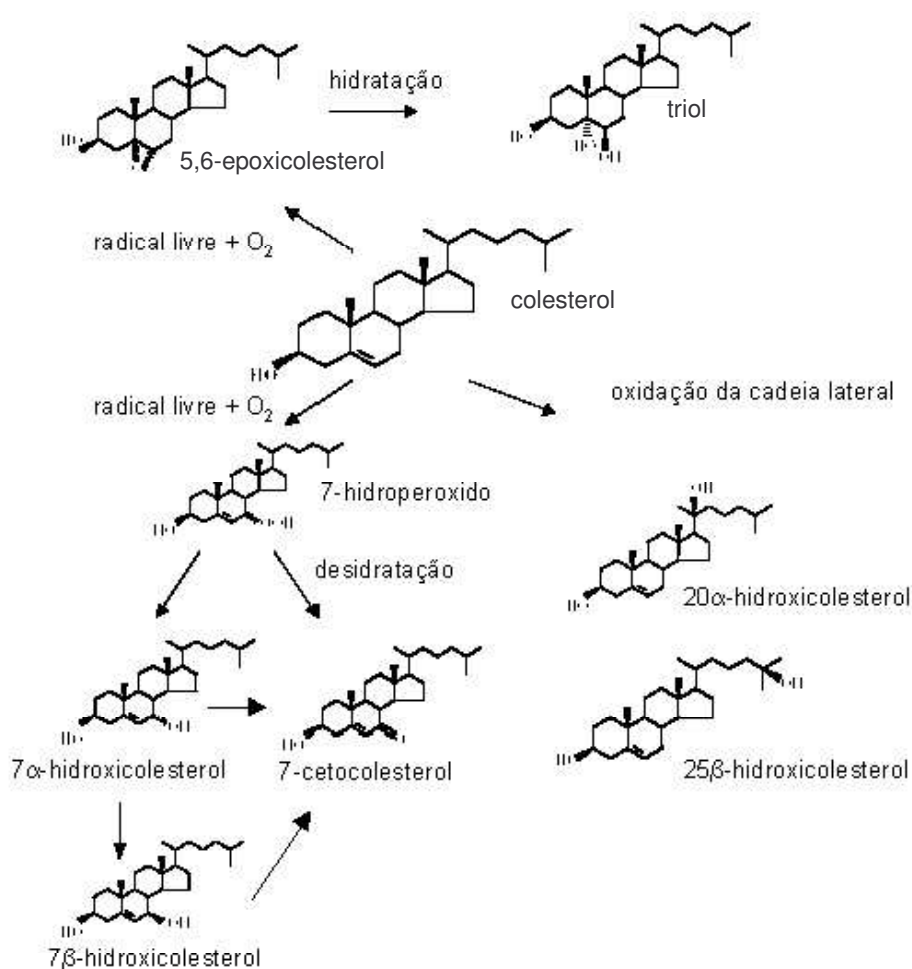


Figura 2. Principais óxidos de colesterol formados por autooxidação do colesterol.

A oxidação na cadeia lateral do colesterol ocorre predominantemente no carbono 25 com o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), originando o 25-hidroperoxicolesterol, o qual é degradado termicamente em 25-hidroxicolesterol. A oxidação na cadeia lateral também pode originar os 20α e 20β -hidroxicolesterol e além destes, os 24α e 24β -hidroxicolesterol e os 26α e 26β -hidroxicolesterol. Estes últimos se decompõem através da quebra da ligação β carbono-carbono da cadeia lateral, produzindo substâncias voláteis como acetona, ácido acético e esteróis (SMITH, 1987).

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, 20α -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e colestanolol (PANGIANGVAIT, 1995; TAI, 1999).

6. EFEITOS BIOLÓGICOS DOS ÓXIDOS DE COLESTEROL

O consumo de alimentos contendo óxidos de colesterol é muito preocupante devido aos efeitos adversos que causam à saúde humana.

Vários estudos relatam que os óxidos de colesterol são importantes no desenvolvimento da aterosclerose (BROWN et al., 1997; STAPRANS et al., 1998; GARCIA-CRUISET et al., 2001).

O processo de desenvolvimento da aterosclerose inicia-se com a modificação da barreira funcional de endotélio vascular, permitindo a penetração da LDL (lipoproteína de baixa densidade) e outros constituintes. Monócitos invadem esta área e tornam-se macrófagos. Estes macrófagos são internalizados degradando a LDL, resultando na formação das células espumosas (GUARDIOLA et al., 1996; BROWN & JESSUP, 1999). Os óxidos de colesterol estimulam a agregação de plaquetas nas paredes das artérias porque inibem as prostaglandinas que são essenciais para a integridade vascular (RONG et al., 1998; 1999). PENG et al. (1991) reportaram que o colestanolol inibiu a biossíntese de prostaglandinas em aortas de coelhos.

Os óxidos de colesterol podem ser componentes da LDL-colesterol tornando-a LDL-colesterol oxidada que exerce um potencial efeito aterogênico (BERLINER et al., 1996). Estudos em humanos verificaram a presença dos óxidos 26-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7 α e 7 β -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 4 α e 4 β -hidroxicolesterol nas lesões das artérias (CARPENTER et al., 1995). O 26-hidroxicolesterol é o óxido dominante das placas ateroscleróticas e o aumento de sua concentração eleva a severidade das lesões (GARCIA-CRUISE et al., 2001). Os óxidos 26-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7 α e 7 β -hidroxicolesterol e 5,6 β -epoxicolesterol foram determinados em abundância na LDL oxidada (PATEL et al., 1997; CRISBY et al., 1997).

OSADA et al., (2000) observaram a ação dos óxidos no sistema imunológico. Segundo, os pesquisadores, os óxidos provocam uma depressão na produção de imunoglobulina (IgM).

A citotoxicidade dos produtos de oxidação do colesterol estimula o mecanismo de morte celular denominado de apoptose (BEST et al., 1998). Pesquisas recentes evidenciaram que o óxido 7-cetocolesterol induz a apoptose na via mitocôndria e em conjunto com o 7 β -hidroxicolesterol são hábeis na indução da apoptose nas células endoteliais, células da musculatura lisa e ocasionam a necrose de fibroblastos (LIZARD et al., 1999; YAO & TABAS, 2000). ARES et al. (2000) relataram que os óxidos produzidos pela oxidação da cadeia lateral do colesterol como o 25 e 26-hidroxicolesterol são mais potentes na indução da apoptose do que os 7 β -hidroxicolesterol e epóxidos.

Os óxidos de colesterol estão relacionados a outros efeitos biológicos como na inibição da síntese endógena de colesterol através da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A (HMG-CoA redutase) e ainda estão envolvidos no desenvolvimento de doenças degenerativas como o mal de Alzheimer, catarata e o câncer. ZHANG et al. (1997) afirmaram que o 25-hidroxicolesterol e o colestanoetriol abaixaram a atividade da HMG-CoA redutase em fibroblastos. O óxido 24(S)-hidroxicolesterol foi negativamente

associado com a as injúrias causadas nas células neurais e ao agravamento da demência na enfermidade neurodegenerativa de Alzheimer (KOLSCH et al., 1999; LUTJOHANN et al., 2000). A presença de vários óxidos como o 7 β -hidroxicolesterol, 5,6 α -epoxicolesterol, 20 α -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol em catarata humana levaram a associação que a degradação da membrana lipídica através de radicais livres contribuem para a produção dos óxidos de colesterol que por sua vez participam no desenvolvimento da catarata (GIRAO ET AL., 1998). YAMASAKI et al. (1999) encontraram produtos de fotooxidação do colesterol por irradiação ultravioleta em câncer de pele.

7. METODOLOGIAS DE DETERMINAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL

Na literatura existem inúmeras metodologias para determinação de óxidos de colesterol em alimentos e suas concentrações variam largamente o que pode ser atribuído em grande parte à metodologia utilizada.

Devido a instabilidade do colesterol é necessário uma metodologia analítica branda para evitar a formação de artefatos, pois a presença do ar, luz, solventes contendo peróxidos ou tratamento térmico podem promover a formação de tais compostos (ROSE-SALIN et al., 1995). Nesse sentido, a saponificação a frio das amostras tem sido preferida por muitos autores (GUARDIOLA et al., 1995; LAI et al., 1995; RAZZAZI-FAZELI et al., 2000).

A maioria dos métodos de análise de óxidos de colesterol em alimentos envolve primeiramente a extração da gordura seguido pela saponificação (SANDER et al., 1989; GUARDIOLA et al., 1995). No entanto, DIONISI et al. (1998) demonstraram que o método de saponificação direta das amostras foi mais preciso e exato do que os métodos que utilizaram primeiramente a extração da gordura.

A separação e quantificação de óxidos de colesterol é em geral realizada por CLAE (ZUNIN et al., 1996; CARBONI et al., 1997; LAKRITZ & JONES, 1997; CARERI et al., 1998; LERCKER & RODRIGUEZ-ESTRADA,

2000; BAGGIO et al., 2005; RATH et al., 2005) e por CG (HUBER et al., 1995; ZUNIN et al., 1995; DIONISI et al., 1998; BOSELLI & CARBONI, 2004). No entanto, de acordo com LERKER et al. (1996) a instabilidade térmica dos hidroperóxidos impede que os óxidos sejam analisados por CG. Por estes motivos, a CLAE tem sido a mais utilizada, pois, trabalha com temperatura mais baixa e o procedimento de quantificação é simplificado por não ser necessário a derivação das amostras, reduzindo o tempo de análise (TSAI & HUDON, 1981; RATH et al., 2005).

Na CLAE a coluna ciano (CN), fase normal (NILESEN, et al., 1995; CARBONI et al., 1997) é a coluna mais utilizada na separação de óxidos de colesterol originados da oxidação da cadeia lateral do colesterol uma vez que reduz os tempos de retenção, inclusive do colestanoltriol, diminuindo desta maneira o tempo de análise cromatográfica. Coluna de fase reversa também pode ser utilizada e parece ser mais apropriada na separação de hidroperóxidos por proporcionar uma boa resolução dos picos devido a alta polaridade destes compostos (KORYTOWSKI et al., 1995).

Os óxidos de colesterol podem ser detectados por vários sistemas sendo o mais utilizado o detector UV-Visível. No entanto, alguns óxidos de colesterol como o 5,6 α -epoxicolesterol, 5,6 β -epoxicolesterol e o colestanoltriol não possuem ligações π e por isso não apresentam características adequadas de absorção na luz UV (CSALLANY et al., 1989; SMITH, 1993). A detecção destes óxidos pode ser realizada pelo detector por índice de refração, embora, este detector seja universal e, portanto, menos sensível que o detector por UV.

Segundo RODRIGUEZ-ESTRADA & CARBONI (2002) nos últimos anos a CLAE acoplada ao detector de massas (CLAE-MS) tem sido a técnica analítica mais sensível e precisa na quantificação e identificação dos óxidos de colesterol em amostras biológicas e de alimentos. Pesquisas recentes relatam que a CLAE com interface de ionização química à pressão atmosférica e espectro de massas (CLAE-APCI-MS) tem sido capaz de detectar amostras traços tão polares ou lábeis quanto as que são analisadas por GC ou GC-MS (cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa) (CRERI et al., 1998;

MANINI et al., 1998; RAZZAZI-FAZELI et al., 2000; RAITH et al., 2005). A detecção dos óxidos de colesterol por espectrometria de massas pode ser realizada em modo scan universal coletando os fragmentos massa/carga ou modo seletivo de íons, sendo este último altamente sensível e seletivo (SEVIAN et al., 1994).

8. ÁCIDOS GRAXOS EM OVOS

A composição de ácidos graxos da gema pode ser influenciada pelas fontes de ácidos graxos utilizadas nas rações das aves.

O aumento do conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (AGP-n3) em ovos tem sido realizado através da suplementação da dieta das galinhas poedeiras com óleo de peixe, sementes vegetais ou óleos ricos em AGP-n3 (BAUCELLS et al., 2000; MAZALLI et al., 2004). No entanto, pesquisas demonstraram que os ácidos graxos saturados da gema, principalmente, os ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), são resistentes as mudanças, independentes da composição dietética (LI-CHAN et al., 1995; SIMOPOULOS, 2000).

Os AGP-n3, como os ácidos α -linolênico (LNA, C18:3 n3), eicosapentaenóico (EPA, C20:5 n3) e ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6 n3) são importantes na prevenção das doenças cardiovasculares pois são precursores de eicosanóides como prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos e tromboxanos que exercem ação antitrombocitária sobre as plaquetas (HAGLUND et al., 1998; SIMOPOULOS 1991, SIMOPOULOS, 2000). Os AGP-n3 também demonstraram efeitos benéficos sobre o nível de lipídios sérico, reduzindo os triacilgliceróis nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) que dão origem às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aumentando as lipoproteínas de alta densidade (HDL) (LAYNE et al., 1996). Além disso, o DHA é essencial para o desenvolvimento funcional do sistema nervoso, cerebral e retinal, refletindo sua importância na nutrição de crianças e gestantes (LESKANICH & NOBLE 1997; LEWIS, 2000).

As enzimas que originam os AGP-n3 através dos processos de dessaturação e alongamentos são as mesmas que dão origem aos AGP-n6 gerando uma competição entre as duas series n-3 e n-6, onde o consumo excessivo de n6 da dieta limita a formação dos AGP-n3 (WATKINS, 1991). Assim, para que os benefícios dos AGP sejam alcançados, uma ingestão balanceada entre n-6 e n-3 é necessária, sendo geralmente aceito que a relação ideal n6:n3 é em torno de 4:1 (SCHAEFER, 2002).

Entretanto, o maior teor de ácidos graxos insaturados nos ovos aumenta a susceptibilidade à oxidação, especialmente quando os ovos sofrem processamento térmico ou quando são estocados por períodos prolongados. A oxidação lipídica é uma das principais reações que ocorrem durante o aquecimento dos alimentos a altas temperaturas, na presença de metais, sensibilizadores naturais e oxigênio (SMITH, 1996).

Atualmente, os alimentos industrializados como massas e produtos de panificação utilizam ovo em pó em sua fabricação devido a facilidade de manipulação e principalmente por este apresentar maior tempo de estocagem. O processo de produção de ovo em pó por “spray-dryer” utiliza altas temperaturas através do aquecimento do ar pela combustão de gás. Porém, durante a combustão do gás são produzidos óxidos de nitrogênio que são catalisadores da transformação dos ácidos graxos insaturados *cis* em seus estereoisômeros *trans*, quando aquecidos (WHEELER, 1980). Além disso, o óxido nitroso é considerado um radical livre, iniciador da oxidação de lipídios insaturados em sistemas modelos (PRYOR & LIGHTSEY, 1981).

Estudos indicam que o consumo de ácidos graxos saturados, assim como o de ácidos graxos *trans*, podem contribuir no desenvolvimento de enfermidades cardiovasculares, devido ao aumento de LDL-colesterol e Lp(a) sanguíneo que atuam tanto na formação quanto na inibição dos coágulos (CLEVIDENCE et al., 1997; OH et al., 2005). Segundo ASCHERIO et al. (1999) e SUBBASIAH et al. (1998) os ácidos graxos *trans* reduzem o teor de HDL-colesterol, representando um fator de risco à aterosclerose.

9. METODOLOGIAS DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

O preparo da amostra para a determinação de ácidos graxos em ovos é usualmente realizada através da extração de lipídios com clorofórmio:metanol de acordo com FOLCH et al. (1957) e conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos segundo METCALFE et al. (1966), a qual é adotada pelos métodos oficiais da AOCS (1989) e da AOAC (1995). No entanto, ACKMAN (1998) constatou que o processo de saponificação preconizado por METCALFE et al. (1966) não é o mais adequado. Em meio básico, a transesterificação de gorduras é muito rápida produzindo ésteres metílicos em poucos minutos, os quais por causa do tempo e do calor são novamente saponificados convertendo-se em ácido graxo livre. Além disso, a metilação com BF_3 metanólico por 2 a 5 minutos não é suficiente para a total esterificação dos ácidos graxos livres, necessitando pelo menos 20 minutos para a metilação de 99% dos ácidos graxos. Em adição, concluiu-se que a saponificação não é necessária.

De acordo com LEPAGE & ROY (1986) a extração com clorofórmio:metanol e saponificação apenas consome tempo, eleva o custo das análises e gera maior número de erros devido aos múltiplos passos envolvidos.

WANG et al. (2000), para verificar a melhor determinação de ácidos graxos em gema de ovos realizaram um estudo comparativo entre os métodos de metilação direta, saponificação, extração com clorofórmio-metanol e saponificação pós-extração. No método da metilação direta houve menor variação dos resultados em relação aos demais métodos e na saponificação ocorreu menor variação para a maioria dos ácidos graxos do que na extração com clorofórmio:metanol ou saponificação pós-extração, mas resultou em menor teor de ácidos graxos do que nos outros métodos. Segundo os autores, a metilação direta é mais precisa quando comparada com a extração de FOLCH et al. (1957), devido ao menor número de etapas envolvidas na

extração e no processo preparativo da amostra, obtendo-se assim, melhor recuperação do método.

Normalmente, os ácidos graxos em alimentos são analisados por cromatografia gasosa (CG) através de seus ésteres metílicos e detectados por ionização em chama (EDER, 1995).

Em muitos trabalhos os resultados da composição dos ácidos graxos em alimentos são expressos em porcentagem de área, utilizando o método de normalização. Porém, nutricionalmente é importante saber o quanto existe de cada ácido graxo nos alimentos e portanto, a quantificação deve ser realizada por padronização interna.

O ácido tricosanóico (C23:0) é o padrão interno mais comumente utilizado nas análises de metil ésteres (TIMMINS et al., 2000). Embora possua baixa solubilidade, este é estável. O ácido nervônico (C24:1n-9) também é bastante utilizado como padrão interno. Ambos padrões apresentam resposta similar no detector por ionização, sendo que o ácido nervônico tem a vantagem da alta solubilidade, embora seja um composto instável, podendo sofrer perdas por autooxidação (SHANTHA & ACKMAN, 1990; JOSEPH & ACKMAN, 1992).

Segundo JOSEPH & ACKMAN (1992), o detector por ionização em chama responde diferentemente entre as diferentes cadeias carbônicas de ácidos graxos. Portanto, é necessário corrigir esta deficiência calculando o fator resposta do detector por ionização em chama para um ácido graxo saturado por ser mais estável em relação ao padrão interno. Deste modo, verifica-se se os parâmetros químicos e instrumentais foram otimizados, assegurando que erros oriundos destes parâmetros sejam eliminados. Além disso, é necessário compensar a não ionização do carbono carboxílico durante a combustão através do uso de fatores de correção (SHANTA, 1992). A utilização do fator de correção teórico nas determinações quantitativas de ácidos graxos poliinsaturados é recomendada pela AOCS (1997) e por alguns pesquisadores (SHANTA & ACKMAN, 1990; JOSEPH & ACKMAN, 1992; CRASKE, 1993).

Geralmente, as colunas utilizadas nas análises de ésteres metílicos por CG são capilares de sílica fundida variando de 25 a 100 metros. Mas, as colunas de 100m com fases estacionárias polares, tais como as de polietilenoglicóis que apresentam melhor resolução na separação de ácidos graxos poliinsaturados (GUTNIKOV, 1995). Para a separação dos isômeros do C18:2 n6 e do C18:3 n3 tem sido recomendadas colunas de 100m com fase estacionária altamente polar como cianoalquilpolisiloxano (KRAMER et al., 2002). Recentemente, as melhores resoluções de ácidos graxos *trans* foram obtidas pela associação de CG com cromatografia de camada delgada com nitrato de prata ou com CLAE e íon-prata (RATNAYAKE, 2004).

A identificação de ácidos graxos é realizada através da comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos da amostra com os dos padrões. Alguns trabalhos utilizam valores de comprimento equivalente de cadeia (ECL) para os compostos não identificados (STRÁNSKY et al., 1997; BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2002). No entanto, a identificação exata de compostos orgânicos complexos é feita através das informações estruturais provenientes de espectrômetro de massas acoplado ao CG (KUKSIS & MYHER, 1995).

10. EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E TEMPO DE ESTOCAGEM NA FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL E NA ALTERAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM OVOS

O processamento, o tempo e as condições de estocagem dos ovos podem contribuir para a oxidação do colesterol. A quantidade de óxidos de colesterol em gema de ovo pode variar de 10 a 150 µg/g (SAVAGE et al. 2002).

A oxidação do colesterol em ovos desidratados pelo processo de “spray-dryer” tem sido extensivamente pesquisada (HUBER et al., 1995; GUARDIOLA et al., 1996; LAI et al., 1996; Li et al., 1996; GUARDIOLA et al., 1997). Os óxidos de colesterol normalmente encontrados em amostras de ovo em pó

são: 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, 5,6 α -epoxicolesterol, 5,6 β -epoxicolesterol, 20 α -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e colestanoetriol (PANIANGVAIT et al., 1995; OBARA et al., 2006). Por outro lado, na literatura existem poucos relatos sobre os tipos de processamentos térmicos domésticos rotineiramente utilizados, como o cozimento e fritura dos ovos.

As altas temperaturas utilizadas no processo de produção de ovo em pó por “spray-dryer” são responsáveis pela formação de óxidos de colesterol por acelerar as reações entre os lipídios e o oxigênio molecular (MORGAN & ARMSTRONG, 1992). Estudos têm relacionado a temperatura no “spray-dryer” com a oxidação do colesterol (MORGAN & ARMSTRONG, 1992; GUARDIOLA et al., 1995; GUARDIOLA et al., 1997). GUARDIOLA et al., (1997) verificaram que a temperatura crítica do “spray-dryer” é de 128 a 142 °C, onde ocorre um aumento considerável na formação dos óxidos de colesterol.

Além disso, a formação de óxidos de colesterol é mais alta em “spray-dryer” que utiliza o sistema de aquecimento direto. Neste sistema, óxidos nítrico e nitroso são produzidos pelo aquecimento direto do ar através da combustão de gás (MORGAN & ARMSTRONG, 1992; LAI et al., 1995). MORGAN & ARMSTRONG (1992) demonstraram que o óxido nítrico tem efeito prooxidante, pois, quando aumentaram sua concentração nas amostras de ovo em pó, houve aumento dos óxidos de colesterol. Em adição, ovos produzidos usando “spray-dryer” com sistema de aquecimento direto mostraram um incremento do total de óxidos quando estocados por 6 meses em comparação com aqueles que foram produzidos por “spray-dryer” com sistema de aquecimento indireto (LAI et al., 1995, 1996).

Várias pesquisas (GUARDIOLA et al., 1997; DU & AHN, 2000; OBARA et al., 2006) verificaram que o tempo de estocagem ocasionou o aumento de óxidos de colesterol em amostras de ovo em pó. Por outro lado, as condições de estocagem também influenciam na oxidação do colesterol. AHN et al. (1999) reportaram que a formação de óxidos de colesterol em ovo em pó estocados por 8 meses a 4°C foi mais baixa do que nos ovos que foram

estocados a 22°C. O teor de óxidos totais não foi alterado em amostras de ovo em pó que foram armazenadas de 3 a 8 meses a -20°C no escuro, mas quando estes ovos foram estocados por 8 meses à temperatura ambiente, no escuro, houve incremento na concentração de óxidos totais de 22,5 µg/g de ovo em pó.

SARANTINOS et al. (1993) relataram a formação dos óxidos 7β-hidroxicolesterol, epóxidos, 4β-hidroxicolesterol, 22-cetocolesterol e colestanol em ovos fritos, totalizando 84 µg/100g de gema. Porém, quando o tempo de fritura aumentou de 1 para 2 minutos o total de óxidos aumentou para 124 µg/100g de gema. Similarmente, quando os ovos foram cozidos por 3 minutos, os mesmos óxidos foram detectados além do óxido 7α-hidroxicolesterol. Quando o tempo de cozimento foi prolongado de 3 para 10 minutos, houve formação também do 20α-hidroxicolesterol e a concentração total dos óxidos aumentou de 128 para 203 µg/100g de gema.

Nos ovos, além do colesterol, a presença de ácidos graxos especialmente os poliinsaturados, aumenta a susceptibilidade à oxidação lipídica, originando principalmente radicais livres que promovem a formação dos óxidos de colesterol. Pesquisas têm demonstrado que os valores de hidroperóxidos e de ácido tiobarbitúrico (TBA), os quais mensuram a oxidação lipídica, aumentam com o maior grau de insaturação da gema (GALOBART et al., 2001a; 2001b). WHALE et al. (1993) constataram o aumento da concentração de produtos de peroxidação lipídica (TBARS), ácidos graxos livres, oxidação de ácidos graxos e formação de óxidos colesterol, como 25-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7β-hidroxicolesterol, epoxidocolesterol e colestanol em ovos desidratados por “spray dryer” estocados à temperatura ambiente e expostos ao ar e à luz por 18 meses.

Nos últimos anos, a oxidação do colesterol principalmente em amostras de ovo em pó, tem sido extensivamente pesquisada. No entanto, há uma grande variação tanto nas concentrações determinadas como no tipo de óxido de colesterol encontrado em ovos. Além disso, na literatura existem poucas pesquisas que realizem um estudo integrado entre colesterol, lipídios totais,

ácidos graxos e formação de óxidos de colesterol em ovos quando são estocados ou quando sofrem processamento térmico. Sendo a oxidação de lipídios uma das principais causas de perda de valor nutricional em alimentos, estando o ovo dentro deste contexto, merece ser investigado, especialmente para ampliar o entendimento dos mecanismos da formação de óxidos de colesterol em alimentos.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, D.U.; LEE, J.I.; JO, C.; SELL, J.L. Analysis of cholesterol oxides in egg yolk and turkey meat. **Poultry. Sci.**, v. 78, p. 1060-1064, 1999.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16th edn., vol 2, AOAC International, Arlington, 1995, Official Method 963. 33.

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**, 4th, edn., Firestone, D., American Oil Chemists' Society Press, Champaign, 1989, Official Method Ce 1b-89.

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**, 5th, edn., Firestone, D., American Oil Chemists' Society Press, Champaign, 1997, Official Method Ce 1b-89.

APA. **Associação Paulista de Avicultura**. Disponível em: <http://www.apa.com.br/estatistica>. Acesso em 20 jan. 2006.

ARES, M.P.; PORN-ARES, M.I.; MOSES, S.; THYBERG, J.; JUNTTI-BERGGREN, L.; BERGGREN, P.; HULTGARTH-NILSSON, A.; KALLIN, B.; NILSSON, J. 7 β -hydroxycholesterol induces Ca²⁺ oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. **Arteriosclerosis**, v. 153, p. 23-25, 2000.

ASCHERIO, A.; KATAN, M.B.; STAMPFER, M.J.; WILLET, W.C. R. Trans fatty acid and coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340 (25), p. 1994-1998, 1999.

- BAGGIO, S.R.; MIGUEL, A.M.R.; BRAGAGNOLO, N. Simultaneous determination of cholesterol oxides, cholesterol and fatty acids in processed turkey meat products. **Food Chem.**, v. 89, p. 475-484, 2005.
- BAUCELLS, M.D.; CRESPO, N.; BARROETA, A.C.; FERRER, S.L.; GRASHORN, M.A. Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 51–59, 2000.
- BEST, P.J.M.; HASDAI, D.; SANGIORGI, G.; SCHWARTZ, R.S.; HOLMES, D.R.Jr; SIMARI, R.D. LERMAN, A. Apoptosis, basic concepts and implications in coronary artery disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 14-22, 1998.
- BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Total lipid, cholesterol, and fatty acids of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and Wild Marine Shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). **J. Food Comp. Anal.**, v. 14, p. 359-369, 2001.
- BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Simultaneous determination of total lipid, cholesterol and fatty acids in meat and backfat of suckling and adult pigs. **Food Chem.**, v. 79, p. 255-260, 2002.
- BROWN, A.J.; LEONG, S.L.; DEAN, R.T.; JESSUP, W. 7-hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and in human atherosclerotic plaque. **J. Lipid Res.**, v. 38, p. 1730-1745, 1997.
- BROWN, A.J.; JESSUP, W. Oxysterols and atherosclerosis. **Atherosclerosis.**, v. 142, p. 1-28, 1999.
- CARBONI, M.F.; COSTA, A.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; LERCKER, G. High Performance Liquid Chromatography separation of cholesterol oxidation products. **Chromatographia.**, v. 46, p. 151-155, 1997.
- CARERI, M.; FERRETTI, D.; MANINI, P.; MUSCI, M. Evaluation of particle beam high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of cholesterol oxides. **J. Chromatogr.** v. 794, p. 253-262, 1998.

- CARPENTER, K.L.H.; TAYLOR, S.E.; van der VEEN, C.; WILLIAMSON, B.K.; HALLIWELL, B.; MITCHINSON, M.J. Lipids and oxidized lipids in human atherosclerotic lesions at different stages of development. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1256, p. 141-150, 1995.
- CLEVIDENCE, B.A.; JUDD, J. T.; SCHAEFER, E.J.; JENNER, J. L.; LICHTENSTEIN, A.H.; MUESING, R.A.; WITTES, J.; SUNKIN, M.E. Plasma lipoprotein (a) levels in men and women consuming diets enriched in saturated, cis or trans-monounsaturated fatty acids. **Arterios. Thromb. Vasc. Bio.**, v.17, p.1657-1661, 1997.
- CRASKE, J.D. Separation of instrumental and chemical errors in the analysis of oil by gas chromatography—A collaborative evaluation. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v 70, p. 325-334, 1993.
- CRERI, M.; FERRETTI, D.; MANINI P.; MUSCI, M. Evaluation of particle beam high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of cholesterol oxides. **J. Chromatogr. A.**, v. 794, p. 253-262, 1998.
- CRISBY, M.; NILSSON, J.; KOSTULAS, V.; BJORKHEN, I.; DSICZFALUSY, U. Localization of sterol 27-hydroxylase immunoreactivity in human atherosclerotic plaques. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1344, p. 278-285, 1997.
- DIONISI, F.; GOLAY, P.A.; AESCHLIMANN, J.M.; FAY, L.B. Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: Methods Comparison and Validation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 2227-2233, 1998.
- DU, M.; AHN, D.U. Effects of antioxidants and packaging on lipid and cholesterol oxidation and color changes of irradiated egg yolk powder. **J. Food Sci.**, v. 65, p. 625-629, 2000.
- EDER, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. **J. Chromatogr. B.**, v. 671, p.113-131, 1995.
- FAO. **Food and Agriculture Organization.** Disponível em: <http://www.fao.org/codexalimentarius>. Acesso em 20 jan. 2006.
- FOLCH, J., LESS, M., AND STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 497, 1957.

- GALOBART, J.; BARROETA, A.C.; BAUCCELLS, M.D.; GUARDIOLA, F. Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with $\omega 3$ and $\omega 6$ polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxanthin supplementation. **Poultry. Sci.**, v. 80, p. 327-337, 2001a.
- GALOBART, J.; BARROETA, A.C.; BAUCCELLS, M.D.; CORTINAS, L.; GUARDIOLA, F. α -Tocopherol transfer efficiency and lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with $\omega 3$ polyunsaturated fatty acids. **Poultry. Sci.**, v. 80, p. 1496-1505, 2001b.
- GARCIA-CRUSET. S.; CARPEBTER, K.L.H.; GUARDIOLA, F.; STEIN, B.K.; MITCHINSON, M.J. Oxysterol profile of normal arteries, fatty streaks and advanced lesions. **Free Radic. Res.**, v. 35, p. 31-41, 2001.
- GIRAO, H.; MOTA, M.C.; PAMALHO, J.; PEREIRA, P. Cholesterol oxides accumulation in human cataracts. **Exp. Eye Res.**, v. 66, p. 645-652, 1998.
- GORDON, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. In: Porkorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. **Antioxidantes in food practical applications**. Washington, DC, CRC Press, 2001, 229p.
- GRIFFIN, H.D. Manipulation of egg yolk cholesterol: a physiologist 's view. **World's Poult. Sci. J.**, v. 48, n. 2, p. 100-112, 1992.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; MANICH, A.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Stability of polyunsaturated fatty acids in eggs powder processed and stored under various conditions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 2254-2259, 1995.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P.B.; RAFECAS, M. Biological effects of oxysterols: current status. **Food Chem.Toxic.**, v. 34, p. 193-211, 1996.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; GRAU, A.; JORDAN, A.; BOATELLA, J. Oxysterol formation in spray-dried egg processed and storage under various conditions: prevention and relationship with other quality parameters. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 229-2243, 1997.
- GUTNIKOV, G. Fatty acid profiles of lipids samples. **J. Chromatogr. B.**, v. 671, p. 71-89, 1995.

- HAGLUND, O.; WALLIN, R.; WRETLING, S.; HULTBERG, B.; SALDEEN, T. Effects of fish oil alone and combined with long chain n-6 fatty acids on some coronary risk factors in male subjects. **J. Nutr. Biochem.**, v.9, p. 629-635, 1998.
- HINO, T.; KAWANISHI, S.; YASUI, H.; OKA, S.; SAKURAI. HHTHQ an antilipid-peroxidative compound: its chemical and biochemical characterizations **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1425, p. 47-60, 1998.
- HODIS, H.N.; KRAMSCH, P.; AVOGARRO, P.; BITTOLO-BON, G.; GAZZOLATO, G.; HWANG, J.; PETERSON, H.; SEVIAN, A. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL). **J. Lipid Res.**, v. 35, p. 669-677, 1994.
- HUBER, K. C.; PIKE, O. A.; HUBER, C. S. Antioxidant inhibition of cholesterol oxidation in a spray-dried food system during accelerated storage. **J. Food. Sci.**, v. 60, p. 909-916, 1995.
- IMAO, K.; WANG, H.; KOMATSU, M.; HIRAMATSU, M. Free radical scavenging activity of fermented papaya preparation and its effect on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in iron-induced epileptic foci of rats. **Mol. Biol. Int.**, v. 45, p. 11-23, 1998.
- JOSEPF, J.D., AND ACKMAN, R.G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **J. AOAC Intern.**, v. 75, p. 488-506, 1992.
- KENDALL, C.W.; KOO, M.; SOKOLOFF, E.; KESAVA-RAO, G. Effects of dietary oxidized cholesterol on azomethane-induced colonic preneoplasia in mice. **Cancer Lett.**, v. 66, p. 2211-2218, 1992.
- KIM, S.K.; NAWAR, W.W. Parameters influencing cholesterol oxidation. **Lipids**, v. 10, p. 917-922, 1993.
- KOLSCH, H.; LUTJOHANN, D.; TULKE, A.; BJORKHEM, I.; RAO, M.L. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Brain Res.**, v. 818, p. 171-175, 1999.

- KORYTOWSKI, W.; GEIGER, P.G.; GIROTTI, A.W. High-performance liquid chromatography with mercury cathode electrochemical detection: application to lipid hydroperoxide analysis. **J. Chromatogr.B.**, v. 670, p. 189-197, 1995.
- KRAMER, J.G.; BLACKADAR, C.B.; XHOU, J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP Sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. **Lipids.**, v. 37, p. 823-835, 2002.
- KUKSIS, A.; MYHER, J.J. Application of tandem mass spectrometry for the analysis of long-chain carboxylic acids. **J. Chromatogr. B.**, v. 671, p. 35-70, 1995.
- 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.**, v. 43, p. 1127-1131, 1995.
- LAI, S. M.; GRAY, J. I.; PARTRIDGE, J.A.; FLEGAL, C.J.; Stability of cholesterol and paprika carotenoids in egg powder as influenced by dietary and processing treatments. **J. Sci. Food Agric.**, v. 72, p. 171-178, 1996.
- LAKRITZ, L.; JONES, K.C. Separation and quantitation of cholesterol oxides by HPLC with evaporative light-scattering detector in a model system. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 74, p. 943-946, 1997.
- LAYNE, K.; GOH, Y.H.; JUNPSEN, J.A.; RYAN, E.A.; CHROW, P.; CANDININ, M.T. Normal subjects consuming physiological levels of 18:3 n-3 and 20:5 n-3 from flaxseed or fish oils have characteristic differences in plasma lipid and lipoprotein fatty acid levels. **J. Nutr.**, v. 126, p. 2130-2140, 1996.
- LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin and proatherosclerotic effects (review). **J. of Nutritional Biochem.**, v. 13, p. 700-710, 2002.
- LEPAGE, G., AND ROY, C.C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one step reaction. **J. Lipid Res.**, v 27, p. 114-120, 1986.

- LERCKER, G.; BORTOLOMEAZZI, R.; PIZZALE, L.; VICHI, S. Thermal degradation of single cholesteryl acetate hydroperoxide. **Chromatographia**, v. 42, p. 29-33, 1996.
- LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T. Cholesterol oxidation: presence of 7-ketocholesterol in different food products. **J. of Food Compos. Anal.**, v. 13, p. 625-631, 2000.
- LESKANICH, C.; NOBLE R.C. Manipulation of the n 3 polyunsaturated fatty acid composition of avian eggs and meat. **Word's Pout. Sci. J.**, v. 53, p. 153-183, 1997.
- LEWIS. N.M.;SEBURG, S.; FLANAGAN, N.L. Enriched eggs as a source of *n*-3 polyunsaturated fatty acids for humans. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 971-974, 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.**, v. 61, p. 721-725, 1996.
- LI-CHAN, E.C.Y.; POWRIE, W.D.; NAKAI, S. The chemistry of eggs and egg products. In: Stadelman, W.J, Cotterill, O.J. **Egg science and technology**. 4.ed. New York: Food Products Press, 1995. 591 p.
- LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Origin, metabolism, and adverse health effects of cholesterol oxidation products. **Fett.Lipid.**, p. 211-218, 1998.
- LIZARD, G.; MONIER, S.; CORDELET, C.; GESQUIÉRE, L.; DECKET, V.; LAGROST, L.; GAMBERT, P. Characterization and comparisom of the mode of death, apoptosis versus necrosis, induced by 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. **Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 1190-1200, 1999.
- LUTJOHANN, D.; PAPASSOTIROPOULOS, A.; BJORKHEM, I.; LOCATCKKI, S.; BAGLI, M.; OEHRING, R.D.; SCHLEGEL, U.; JESSEN, F.; RAO, M.L.; von BERGMANN, K.; HEUN, R. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. **J. Lipid Res.**, v. 41, p. 195-198, 2000.

- MAERKER, A. Cholesterol autooxidation:current status. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 64, p. 388-392, 1987.
- MANINI, P.; ANDREOLI, R.; CARERI, R.; ELVIRI, L.; MUSCI, M. Atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectrometry in cholesterol oxides determination and characterization. **Rapid Comm. Mass Spectrom.**, v. 12, p. 883-889, 1998.
- MAZALLI, M.R.; FARIA, D.E.; SALVADOR, D.; ITO, D.T. A comparison of the feeding value of different sources of fat for laying hens: 2. lipid, cholesterol, and vitamin E profiles of egg yolk. **J. Appl. Poult. Res.**, v. 13, p. 280-290, 2004.
- METCALFE, L.D.; SCHMITZ, A.A.; PELKA, J.R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Anal. Chem.**, v. 38, p. 514-515, 1966.
- MOREL, D.W.; LIN, C.Y. Celular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. **Nutr.Biochem.**, v. 7, p. 495-506, 1996.
- MORGAN, J. N.; ARMSTRONG, D. J. Quantification of cholesterol oxidation in egg yolk powder spray-dried with direc heating. **J. Food Sci.**, v. 57, p. 43-45, 1992.
- MORIN, R.J.; HU, B.; PENG, S.K.; SEVIAN, A. Cholesterol oxides and carcinogenesis. **J.Clin.Lab.Anal.**, v. 5, p. 219-225, 1991.
- NIELSEN, J.H.; OLSEN, C.E.; DUEDAHL, C.; SKIBSTED, L.H. Isolation and quantitation of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. **J. Dairy Res.**, v. 62, p. 101-113, 1995.
- NOBLE, R.C.; COCCHI, M.; TURCHETTO, E. Egg fat: a case for concern? **Word's Poult. Sci. J.**, v. 46, n. 2, p. 109-118, 1990.
- OBARA, A.; OBIEDZINSKI, M.; KOLCZAK, T. The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray and freeze-dried egg powders. **Food Chem.**, v. 95, p. 173-179, 2006.

- OH, K.; HU, F.B.; MANSON, J.E.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 Years of follow-up of the nurses' health study. **Am. J. Epid.**, v. 161, p. 672-679, 2005.
- OHTANI, K.; TERADA, E.; KAMEI, M.; MATSUI-YUASA, I. Cytotoxicity of 7-ketocholesterol toward cultured rat hepatocytes and the effect of vitamin E. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 60 (12), p. 1989-1993, 1996.
- OHTANI, K.; MYABA, K.; OKAMATO, 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.**, v. 61, p. 573-576, 1997.
- OSADA, K.; MINEHIRA, K.; INOUE, S.; NAKAMURA, S.; YAMADA, K.; SUNGANO, M. Effect of oxidized cholesterol on age associated changes to immune parameters in spleen lymphocytes and peritoneal exudates cells derived from rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, p. 1047-1051, 2000.
- PANIANGVAIT, P.; KING, A.J.; JONES, A.D.; GERMAN, B.G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **J. Food Sci.**, v. 60, p. 1159-1174, 1995.
- PATEL, R.P.; DICZFALUSY, U.; DZELETOVIC, S.; WILSON, M.T.; DARLEY-USMAR, V.M. Formation of oxysterols during oxidation of low density lipoprotein by peroxynitrite, myoglobin, and copper. **J. Lipid Res.**, v. 37, p. 2361-2371, 1997.
- PENG, S.K.; HU, B.; MORIN, R.J. Angiototoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 5, p. 144-152, 1991.
- PERRY, M.M.; GRIFIN, H.D.; GILBERT, A.B. The binding of very low density and low density lipoprotein to the plasma membrane of the hen's oocyte. A morfological study. **Exp. Cell Res.**, v. 151, p. 433-446, 1985.
- PRYOR, W.A.; LIGHTSEY, J.W. Mechanism of nitrogen dioxide reactions: Initiation of lipid peroxidation and production of nitrous acid. **Sci.**, v. 214, p. 435-437, 1981.
- RAITH, K.; BRENNER, C.; FARWANAH, H.; MULLER, G.; EDER, K.; NEUBERT, R.H.H. A new LC/APCI-MS method for the determination of cholesterol oxidation products in food. **J. Chromatogr. A.**, v. 1067, p. 207-211, 2005.

- RATNAYAKE, W.M.N. Overview of methods for the determinations of trans fatty acids by gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography, silver-ion liquid chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry. **J. AOAC Intern.**, v. 87, p. 523-539, 2004.
- 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.**, v. 896, p. 321-334, 2000.
- RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; CARBONI, M.F. Determination of cholesterol oxidation products by High Performance Liquid Chromatography. In: Guardiola, F.; Dutta, Paresh C.D.; Codony, R.; Savage, G.P. **Cholesterol and phytosterol oxidation products**. Washington, DC, AOCS Press, 2002, 392p.
- RONG, J.X.; RANGASWAMY, S.; SHEN, L.; DAVE, R.; CHANG, Y.H.; PETERSON, H.; HODIS, H.N.; CHISOLM, G.M.; SEVIAN, A. Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, p. 1885-1894, 1998.
- RONG, J.X.; SHEN, L.; DAVE, R.; CHANG, Y.H.; RICHTERS, A.; HODIS, H.N.; SEVIAN, A. Cholesterol oxidation products induce vascular foam cell lesion formation in hypercholesterolemic New Zealand white rabbits. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 2179-2188, 1999.
- ROSE-SALIN, C.; HUGGET, A. C.; BOSSET, J. O.; TABACCHI, R.; FAY, L. B. Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using ($^2\text{H}_7$) cholesterol to monitor cholesterol autooxidation artifacts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 935-941, 1995.
- 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.**, v. 52, p. 109-114, 1989.
- SANRANTINOS, J.; O'DEA, K.; SINCLAIR, A.J. Cholesterol oxides in Australian foods: Identification and quantification. **Food Australia.**, v. 45, p. 485-490. 1993.

- SAVAGE, G.P.; DUTTA, P.C.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T. Cholesterol oxides: their occurrence and methods to prevent their generation in foods. **Asia Pacific J. Clin Nutr.**, v. 11 (1), p. 72-78, 2002.
- SEVIAN, A.; SERAGLIA, R.; TRALDI, P.; ROSSATO, P.; URSINI, F.; HODIS, H. Analysis of plasma cholesterol oxidation products using Gas and High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 397-409, 1994.
- SIMOPOULOS, A. P. Omega 3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, p. 961-970, 1991.
- SIMOPOULOS, A. P. Symposium: Role of poultry products in enriching the human diet with *n*-3 pufa. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 961-970, 2000.
- SCHAEFER, E. J. Lipoproteins, nutrition and heart disease. **Am. J. Clin. Nutr.**; v. 75, p. 191-212, 2002.
- SHAFEY, T.M.; CHAM, B.E. Altering fatty acid and cholesterol contents of eggs for human consumption. In: Sim, J.S.; Nakai, S. **Egg uses and processing technologies: new developments.** CAB International, Canada, 1994. p. 374-385.
- SHANTHA, N. C.; ACKMAN, R. G. Nervonic acids versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatographic analysis of fish oil longer-chain *n*-3 polyunsaturated acid methyl esters. **J. Chromatogr. B.**; v. 533, p.1-10, 1990.
- SMITH, L. L.; TENG, J.I.; LIN, Y.Y.; SEITZ, P.K.; McGEHEE, M.F. Sterol metabolism.XLVII.Oxidized cholesterol esters in human tissues. **J. Steroid Biochem.**, v. 14, p. 889-900, 1981.
- SMITH, L. L. Mechanisms of formation of oxysterols: a general survey. **Free Radical Lipoproteins and Membrane Lipids.** Plenum Press, New York 1990, 409p.
- SMITH, L. L. Analysis of oxysterols by liquid chromatography. **J. Liq. Chromatogr.**, v. 16, p.1731-1747, 1993.

- SMITH, L.L. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. **Lipids.**, v. 31, p. 453-487, 1996.
- STAPRANS, I.; PAN, X.M.; RAPP, J.H.; FEINGOLD, K.R. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. **Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.**, v. 18, p. 977-983, 1998.
- STRÁNSKY, K.; JURSIK, T.; VITEK, A. Standard equivalent chain length values of monoenic and polyenic (methylene interrupted) fatty acids. **J. High Resol. Chromatogr.**, v. 20, p. 143-158, 1997.
- SUBBASIAH, P.V.; SUBRAMANIAM, V.S.; LIU, M.. Trans unsaturated fatty acids inhibit lecithin: cholesterol acyltransferase and alter its position specificity. **J. Lipid Res.**, v. 39, p. 1438-1446, 1998.
- TAI, C.Y.; CHEN, Y.C.; CHEN, B.H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: an overview (Part I). **J. of Food and Drugs Anal.**, v. 7 (4), p. 243-257, 1999.
- TIMMINS, A.; MACPHERSON, E.J.; ACKMAN, R.G. Direct use of methyl tricosanoate as an internal standard and overcoming a potential error in the quantitation of the omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils as ethyl esters. **Food Chem.**, v. 7 (4), p. 243-257, 1999.
- TSAI, L.S.; HUDSON, C.A. Cholesterol oxides in ovo em pó dry egg products: isolation and identification. **J. Food Sci.**, v. 70, p. 425-426, 2000.
- Van-ELSWKY, M.E.; HARGIS, B.M.; WILLIAMS, J.D.; HARGIS, P.S. Dietary menhaden oil contributes to hepatic lipidosis in laying hens. **Poult. Sci.**, v. 73, n. 5, p. 653-662, 1994.
- WALZEN, R.L. Lipoproteins and the laying hen: form follows function. **Poult. Avian Biol. Rev.**, v. 7, n. 1, p. 31-34, 1996.
- WANG, Y.; SUNWOO, H.; CHERIAN, G.; Sim, J.S. Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 1168-1171, 2000.

- WASOWICZ, E. Cholesterol and phytosterols. In: Sikorski, Z.E.; Kolakowska, A. **Chemical and functional properties of food lipids**. Washington, DC, CRC Press, 2003, 344p.
- WATTKINS, B.A. Importance of essential fatty acids and their derivatives in poultry. **J. Nutr.**, v. 121, p. 1475-1485, 1991.
- WHALE, K. W. J.; HOPPE, P. P.; MCINTOSH, G. Effects of storage and various intrinsic vitamin E concentrations on lipid oxidation in dried egg powders. **J. Sci Food Agric.**, v. 61, p. 463-469, 1993.
- WHEELER, W. H. Chemical and engineering aspects of low NO_x concentration. **Chem. Eng.**, v. 362, p. 693-699, 1980.
- YAMASAKI, S.; OZAWA, N.; HIRATSUKA, A.; WATANABE, T. quantitative determination of cholesterol 5 α -, 7 α -, and 7 β -hydroperoxides in rat skin. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 110-118, 1999.
- YAN, P.S.; WHITE, P.J. Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 67, p. 927-931, 1990.
- YAO, P.; TABAS, I. Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 23807-23813, 2000.
- ZHANG, J.; DRICU, A.; SJOVALL, J. Studies on the relationships between 7 α -hydroxylation and the ability of 25 and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1344, p. 241-249, 1997.
- ZUNIN, P.; EVANGELISTI, F.; CARBONI, M.F.; PENAZZI, G.; LERCKER, G.; TISCORNIA, E. Cholesterol oxidation in baked foods containing fresh and powdered eggs. **J. Food Sci.**, v. 60, p. 913-916, 1995.
- ZUNIN, P.; EVANGELISTI, F.; CALCAGNO, C.; TISCORNIA, E. Cholesterol oxidation in dried egg pasta: detecting 7-ketocholesterol content. **Cereal Chem.**, v. 73, p. 691-694, 1996.

CAPÍTULO 2

HPLC METHOD FOR QUANTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHOLESTEROL AND ITS OXIDATION PRODUCTS IN EGGS

**EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO PARA A REVISTA
LIPIDS**

ABSTRACT

A new method was developed for the simultaneous determination of cholesterol and its oxidation products in eggs, using high performance liquid chromatography with ultra-violet (UV) and refractive index (RI) detectors, and interfaced with atmospheric pressure chemical ionisation coupled to mass spectrometry (APCI-MS). The best conditions for sample saponification and extraction of the non-saponifiable material were defined using complete factorial designs with central points. The method was shown to be precise and exact with a detection limit between 0.002 and 0.079 $\mu\text{g/g}$. Some oxides identified by HPLC-UV-RI were not confirmed by HPLC-APCI-MS. Applicability of the method was tested in eggs, eggs enriched with polyunsaturated fatty acids omega-3 (PUFA-n3) and commercial spray-dried whole egg powder.

INTRODUCTION

Cholesterol takes part in essential functions of the human organism, but it is unstable especially in the presence of light, heat, oxygen, moisture, radiation, low pH and metals, producing oxides that have adverse effects on human health. Cholesterol oxides are considered to be atherogenic and are related to inflammatory processes, rheumatoid arthritis, cytotoxicity, carcinogenesis, alterations in cell membrane properties (1), diabetes and degenerative diseases such as Parkinson and Alzheimer (2, 3). In food, cholesterol oxides are formed by a non-enzymatic oxidation process or auto-oxidation, which occurs by way of complex chain reactions based on the formation of free radicals with triplet and singlet oxygen (4). The consumption of these oxides and their possibly damaging effects have led to the need to develop methodology to identify and quantify these compounds in foods.

The cholesterol oxide contents found in the literature vary widely, due mainly to the analytical methodology used. HPLC and gas chromatography (GC) are frequently used to analyze the oxides. However with GC, the samples need to be derivatized, which increases the time of analysis; heat destruction of cholesterol and hydro peroxides can also occur, with the formation of artifacts (5). Thus HPLC has been used more frequently, since it is carried out in a shorter time, and at relatively low temperatures. In particular, HPLC interfaced with atmospheric pressure chemical ionization coupled to mass spectrometry (HPLC-APCI-MS) is capable of detecting trace samples that are too polar or too labile. (6-8).

The simultaneous determination of cholesterol and its oxides is complex, especially since the oxides are present in food in minute amounts and show very similar structures (9). Some cholesterol oxides of biological importance such as 5,6- α -epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol (5,6 α -epoxy), 5,6- β -epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol (5,6 β -epoxy) and cholestan-3 β -5 α -6 β -triol (triol) do not possess adequate characteristics for UV absorption (10,11). Although the refractive index detector is less sensitive than the UV and GC, is useful for the detection

of these oxides. Due to the instability of cholesterol, a mild analytical methodology is required to avoid the formation of artifacts, since the presence of air, light, solvents containing peroxides and heat treatment can promote the formation of such compounds (12).

The majority of the methods used to analyze cholesterol oxides in foods involve an initial extraction of the fat followed by saponification (13,14). Using the values for standard deviation, the coefficient of variation, the formation of artifacts and linearity, Dionisi et al. (15) showed that direct saponification of the samples was more efficient than the methods where the fat was extracted first.

In the present study, a new method was developed for the simultaneous determination of cholesterol and its oxides using HPLC with UV and RI detectors and confirmed by HPLC-APCI-MS. The pre-chromatographic steps were evaluated by response surface methodology. In addition, after validating the method, it was applied to samples of eggs, eggs enriched with polyunsaturated fatty acids omega-3 (PUFA-n3) and commercial spray-dried whole egg powder.

MATERIAL & METHODS

Solvents and chemicals: The HPLC grade solvents used were came from Mscience (Darmstadt, Germany) and the analytical grade solvents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The HPLC grade solvents were vacuum filtered through 0.22 μ m Millipore membranes (Cork, Ireland), before use. The cholesterol, cholest-5-ene-3 β ,19-diol (19-OH), cholest-5-ene-3 β ,20 α -diol (20 α -OH), cholest-5-ene-3 β ,22[R]-diol (22(R)-OH), cholest-5-ene-3 β ,22[S]-diol (22(S)-OH), cholest-5-ene-3 β ,25diol (25-OH), 3 β -hydroxycholest-5-ene-7-one (7-keto), cholest-5-ene-3 β ,7 β -diol (7 β -OH), 5,6 α -epoxy, 5,6 β -epoxy and cholestan-3 β -5 α -6 β -triol standards were purchased from Sigma (Miliford, MA, USA). Cholest-5-ene-3 β ,24[S]-diol (24(S)-OH) and cholest-5-ene-3 β ,7 α -diol (7 α -OH) were obtained from Steraloids (Newport, RI, USA) and the reference

material (SRM 1846, whole egg powder) from NIST (Gaithersburg, MD, Canada).

Samples: Commercial spray-dried whole egg powder purchased directly from the factory, stored in the dark at a temperature of $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, was used to optimize the methodology for the simultaneous determination of cholesterol and its oxides. After optimization and validation, the method was applied to fresh eggs, eggs enriched with omega-3, and recently prepared commercial spray-dried whole egg powder. The fresh eggs and eggs enriched with PUFA-n3 were purchased directly from a local egg-processing plant.

Optimization of the saponification and extraction procedure: The simultaneous determination of cholesterol and its oxides was based on the sample saponification methodology of Dionisi et al. (15), using experimental designs to verify the best conditions for saponification and to extract the non-saponifiable matter. The effects of the factors involved in the saponification and extraction of the non-saponifiable matter, such as: concentration of KOH in ethyl alcohol, saponification time, type of solvent and number of extractions, were determined using three complete factorial designs with central points. Subsequently a fourth complete factorial design was developed with the significant factors, to optimize the methodology.

HPLC Equipment and Conditions. The HPLC system used was a Shimadzu (Japan) composed by a ternary pump (LAD10), a vacuum solvent delivery degasser, a thermostatted column compartment with cooling, a UV (SPD-10AV_{vp}) and a RI (RID-10A) detectors. The analytical column used was a Nova Pack CN HP, 300 mm x 3.9 mm x 4 μm (Waters, Millford, MA, USA) column and the oven temperature was set at 32°C . A mobile phase of hexane:isopropanol (96:4 v/v) with an isocratic flow rate of 1 ml/min and a 20 minute analysis time, was used to separate cholesterol from the following oxides: 19-OH, 20 α -OH, 22(R)-OH, 24(S)-OH, 22(S)-OH, 25-OH, 7-keto, 7 β -

OH, 7 α -OH, 5,6 α -epoxy and 5,6 β -epoxy. Hexane:isopropanol (90:10 v/v) was used to separate triol, with a flow rate of 1 ml/min and analysis time of 15 minutes. Triol, 5,6 α -epoxy and 5,6 β -epoxy were determined by the RI detector, whilst the UV detector was used to determine cholesterol and the other oxides, with the absorbance fixed at 210 nm. Identification of the cholesterol and cholesterol oxide peaks was done by comparison of the retention times of the sample peaks with those of the standards and by co-chromatography. Quantification was done by external standardization, the standard curves being constructed with 6 points using solutions of the standards, with concentrations varying from 1 to 100 μ g/ml for the oxides and from 2 to 2.5 mg/ml for cholesterol.

Mass spectrometry. HPLC-APCI-MS was used to confirm the identity of cholesterol and its oxides in the egg samples. HPLC was carried out using a Waters Alliance 2695 pump (Millford, MA, USA) and the same chromatographic conditions as above. The mass spectrometer used was a Qtrap (Applied Biosystems, Concord, Ontario, Canada) with a QqQ (linear ion trap) configuration. Injections of cholesterol and cholesterol oxide standards were used to optimize the conditions. The optimum conditions were: positive mode APCI, scan range m/z 250-500, temperature 375 $^{\circ}$ C, nitrogen as carrier gas (70 L/min), sheath gas (60 L/min) and curtain gas (30 L/min), nebuliser current set at 3000 V, declustering potential at 30 V and entrance potential at 9 V. Chromatograms were obtained in the selective ion monitoring (SIM) mode for the ions m/z 367, 369, 385, 401 and 403. To verify the accuracy of results found by HPLC-UV-RI, a comparison with the results obtained by HPLC-APCI-MS were realized. For this purpose, 10 commercial spray-dried whole egg powder samples were prepared and injected for both, HPLC-UV-RI and HPLC-APCI-MS.

Method validation: The analytical method was validated for recovery, repeatability, detection limits (DL) and quantification limits (QL) (16). Certified

reference material (SRM 1846, NIST) was also used to validate cholesterol, since no certified reference material exists for the cholesterol oxides.

Statistical analysis. The experimental designs were analyzed by response surface methodology using the Statistic 5.5 software (Statsoft 2000). The analysis of variance (ANOVA) was used for the HPLC results, also using the Statistic 5.5 software and the means were compared by Tukey's test, significance being based on a 0.05 probability level.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the conditions for saponification and extraction: Saponification of the samples with KOH in methanol 15% was not efficient for the total dissolution of the samples of powdered eggs. Thus KOH in ethanol was tested, obtaining complete dissolution of the samples. The conditions for saponification and extraction of the non-saponifiable matter were first optimized using a complete 2^3 factorial design with central points, the variables and levels studied being: concentration of the KOH in ethanol (15, 20 and 25%), type of solvent (hexane or ethyl ether) and number of extractions (2, 3 and 4). An analysis of the results showed that ethyl ether was more efficient than hexane to extract the oxides. Thus a second complete 2^2 factorial design with central points was carried out under the same conditions as the first, but using only ethyl ether as the extracting solvent for the non-saponifiable matter.

An analysis of the results of the second design showed that all the factors evaluated were significant ($p < 0.05$), with significant interaction ($p < 0.05$) between the concentration of KOH and the number of extractions for the oxides 7α -OH and $5,6\beta$ -epoxy (Figure 1).

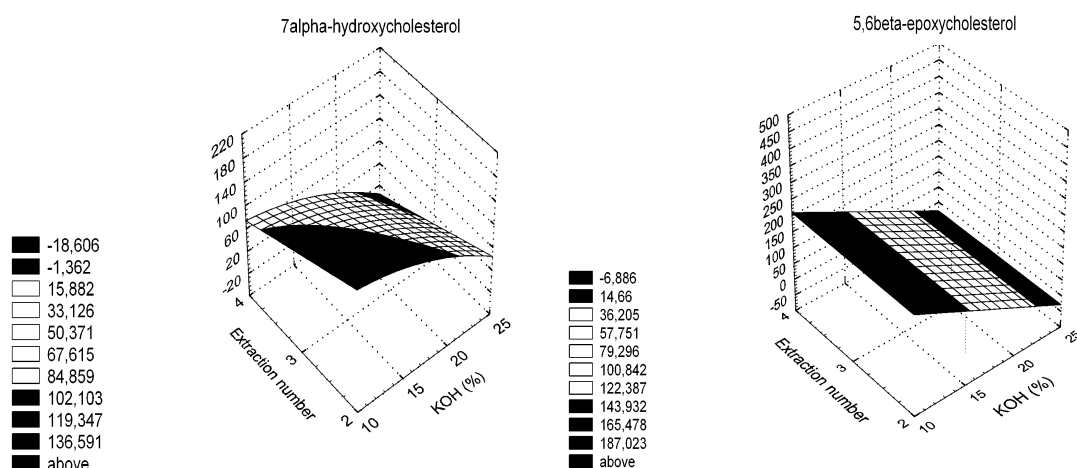


FIG. 1. Response surface for the relative area of 7 α -hydroxycholesterol and 5,6 β -epoxycholesterol as a function of the extraction number and per cent KOH.

A concentration of 15% KOH and four extractions showed a positive effect on the response for 5,6 β -epoxy, but the interaction between the factors was shown to be negative. For 7 α -OH, concentration of KOH of 15% also positively influenced the response for oxide, but the greatest number of extractions showed the opposite effect. The interaction between the factors showed a positive effect for 7 α -OH. There was a significant effect ($p < 0.05$) for the number of extractions with the cholesterol results, that is, a positive response was obtained with the greatest number of extractions. However, the KOH concentration (%) did not influence the cholesterol results and there was no interaction between the factors evaluated (Figure 2).

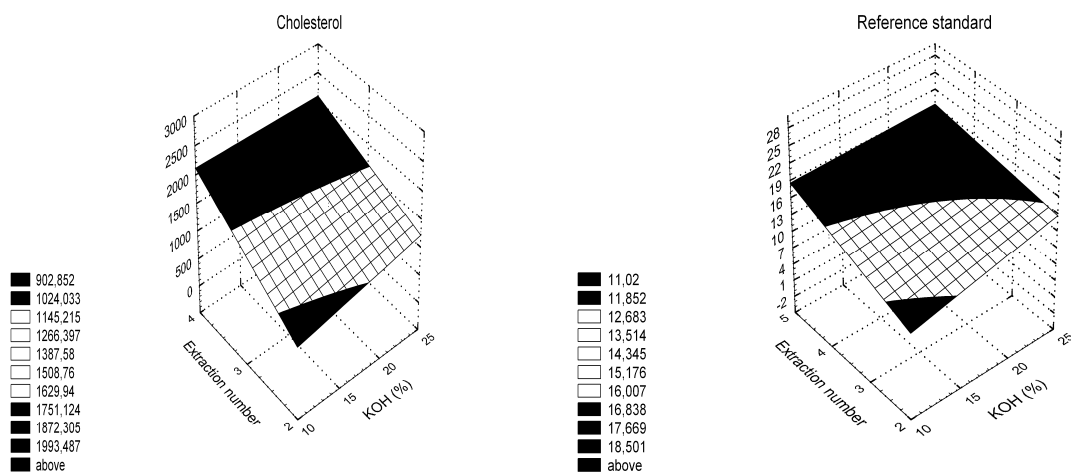


FIG. 2. Response surface for the relative area of cholesterol and reference standard as a function of the extraction number and per cent KOH.

For 5,6 β -epoxy, the best results were obtained by reducing of the KOH concentration and increasing the number of extractions. The sensitivity of epoxides to alkaline pH has been already reported (17). In the present work was not observed loss of 7-keto, although alkaline hydrolysis, even when carried out at room temperature and in the dark, can result in severe losses (18,19). Despite the greater number of extractions having impaired the values of 7 α -OH, a reduction in the number of extractions would negatively affect 5,6 β -epoxy and cholesterol. Thus based on the responses obtained in the second design, a third complete 2^2 experimental factorial design with central points was carried out, fixing the number of extractions at four, reducing the KOH concentration (25, 15 and 10%) and also varying the saponification time (16, 18 and 22 hours).

However, in the third experimental design, complete sample dissolution did not occur during saponification when the KOH concentration was reduced

to 10%. With respect to the saponification time, there was no significant difference ($p>0.05$) between the results at the different times tested, nor significant interaction ($p>0.05$) between the factors. Thus a saponification time of 18 hours was chosen, according to Dionisi et al. (15), with a KOH concentration not below 15%, evaluating the greatest possible number of extractions.

A fourth complete 2^2 factorial design with central points was then developed with the significant factors to optimize the methodology, using standard reference material for cholesterol. Optimum saponification conditions were obtained with 15% KOH and 5 extractions of the non-saponifiable matter, corresponding to the central points of the design (Figure 2). Only the results for the central points were similar to the value specified on the certificate (19 ± 0.2 mg cholesterol/g yolk).

Thus the optimum methodology was established as follows: 1.0 g of sample plus 10 ml 15% potassium hydroxide in absolute ethanol was shaking at 118 rpm on a shaker in the dark for 18 hours. The solution was transferred to a 100 ml screw-topped test-tube, and 40 ml distilled water and 10 ml ethyl ether added and mixed on a vortex mixer for one minute. After phase separation, the upper layer was transferred to a 125 ml separating funnel, and the extraction with ethyl ether was repeated 4 more times. A volume of 15 ml potassium hydroxide (0.5 mol/L) was added to the combined ethereal phases in a separating funnel, and the ethereal solutions washed with 15 ml aliquots of aqueous sodium sulphate (0.47 mol/L). The upper phase was filtered through common filter paper containing anhydrous sodium sulphate, transferred to a 70 ml screw-topped tube and the ether evaporated off with a stream of N_2 . The dry extract was dissolved in 1 ml of the mobile phase used for HPLC, filtered through a 0.45 μ m pore-size polyethylene filter, and immediately injected into the HPLC.

Simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides by HPLC-UV-RI: Under the chromatographic conditions used by Baggio et al. (20), it was

possible to separate cholesterol from the following oxides: 19-OH, 20 α -OH, 22(R)-OH, 24(S)-OH, 22(S)-OH, 25-OH, 7-keto, 7 α -OH, 7 β -OH, 5,6 α -epoxy and 5,6 β -epoxy. A more polar mobile phase, hexane:isopropanol (90:10 v/v), had to be used to separate triol. The oxides 5,6 α -epoxy, 5,6 β -epoxy and triol were determined by RI since they contain no π electrons in their structures and do not therefore absorb in the UV region. Both the UV and RI detectors can be used to determine cholesterol and the other oxidation products, but UV was used since it is more sensitive and selective. Figures 3 and 4 show the chromatograms of the standards and of the powdered egg samples, using the UV and RI detectors respectively. Figure 3b shows that only 5 of the 12 oxides studied were found in the samples of commercial spray-dried whole egg powder. The retention times of the peaks obtained by HPLC-UV-RI of the samples coincided with the retention times of 20 α -OH and 25-OH, and were spiked by the respective standards solutions. However in the HPLC-APCI-MS chromatograms of the same samples, the fragmentation patterns of the peaks observed with the same retention time as 20 α -OH and 25-OH did not correspond to those of these oxides. Therefore the presence of 20 α -OH and 25-OH was not confirmed by their mass spectra.

The same five oxides were also found by Fontana et al. (21). Besides when the powdered egg samples were heated at 90°C for 24 hours, the formation of triol and 25-OH was observed, plus a product with a retention time similar to the 20 α -OH, what was not confirmed by high resolution nuclear magnetic resonance (21). Other studies either failed to find (22, 23) or failed to analyze (24, 25) the oxides triol, 25-OH and 20 α -OH.

Characterization, quantification and confirmation of cholesterol and cholesterol oxides by HPLC-APCI-MS: Table 1 presents the main molecular and/or fragment ions of cholesterol and its oxides produced in APCI (+)-MS. Cholesterol, 19-OH, 25-OH and 7-keto showed distinctive ion distributions, but 20 α -OH, 22(R)-OH, 24(S)-OH and 22(S)-OH are structurally very similar isomers, resulting in small differences in their ion distributions. Nevertheless,

these differences, coupled to their characteristic retention times since the chromatographic peaks of these compounds were clearly resolved, were sufficient to confirm the identity of these oxides.

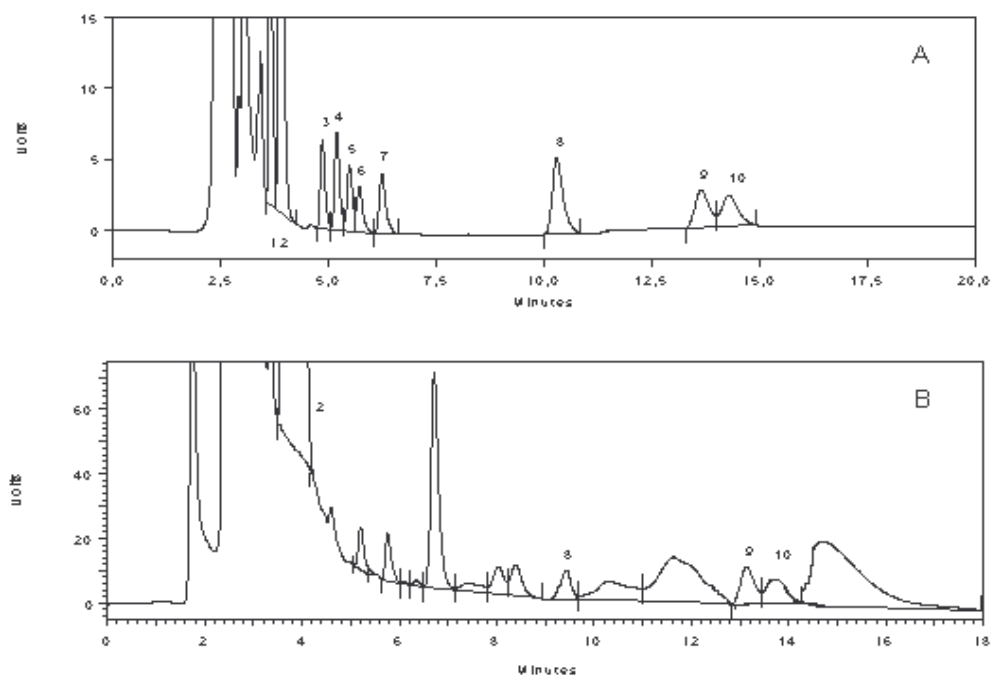


FIG. 3. Chromatogram of (A) cholesterol and cholesterol oxides standards and (B) the egg sample, determined using HPLC-UV. The numbered peaks correspond to: (1) 19-hydroxycholesterol, (2) cholesterol, (3) 20 α -hydroxycholesterol, (4) 22(R)-hydroxycholesterol, (5) 24(S)-hydroxycholesterol, (6) 22(S)-hydroxycholesterol, (7) 25-hydroxycholesterol, (8) 7-ketocholesterol, (9) 7 β -hydroxycholesterol, (10) 7 α -hydroxycholesterol.

The 5,6 α -epoxy, 5,6 β -epoxy and triol oxides also displayed similar fragmentation patterns. However, the epoxy oxides showed well-resolved chromatographic peaks and could therefore be distinguished by their retention times. The triol oxide could be clearly distinguished from the other oxides as it eluted at the end of the chromatographic run using the specific mobile phase (Figure 5). The 7 α -OH and 7 β -OH also displayed similar fragmentation

patterns, but well resolved chromatographic peaks, and could therefore be distinguished by their retention times.

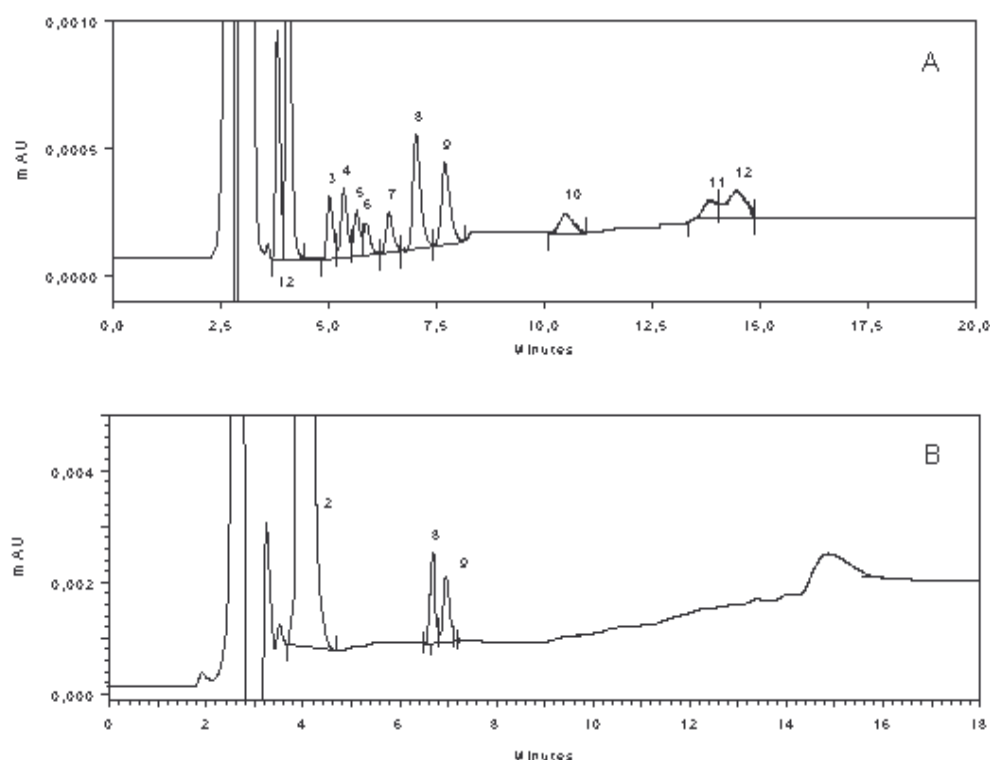


FIG. 4. Chromatogram of (A) cholesterol and cholesterol oxides standards and (B) the egg sample, determined using HPLC-RI. The numbered peaks correspond to: (1) 19-hydroxycholesterol, (2) cholesterol, (3) 20 α -hydroxycholesterol, (4) 22(R)-hydroxycholesterol, (5) 24(S)-hydroxycholesterol, (6) 22(S)-hydroxycholesterol, (7) 25-hydroxycholesterol, (8) 5,6 α -epoxycholesterol, (9) 5,6 β -epoxycholesterol, (10) 7-ketocholesterol, (11) 7 β -hydroxycholesterol, (12) 7 α -hydroxycholesterol.

When analyzing the egg samples, the high cholesterol concentration diffculted the recognition of the other oxides. This problem was avoided by removing the m/z 369 ion from the SIM run. Thus cholesterol could still be identified from its less intense fragment ions of m/z 367 and 385 and the peaks of the other oxides could also be observed. Figure 5b shows the absence of

triol in the samples and in Figure 6 it is possible to clearly see the presence of cholesterol, 7-keto, 7 β -OH, 7 α -OH, 5,6 α -OH and 5,6 β -OH.

TABLE 1
Relative intensity of the main ions of cholesterol and cholesterol oxides in HPLC-APCI(+)-MS

Compounds [*]	Relative intensity (<i>m/z</i>)				
	367	385	369	401	403
19-OH	50	100	10	-	-
Cholesterol	5	5	100	-	-
20 α -OH	100	95	10	-	-
22(R)-OH	100	100	10	-	-
24(S)-OH	100	100	10	-	-
22(S)-OH	85	100	10	-	-
25-OH	100	30	10	-	-
7-keto	-	-	-	100	10
5,6 α -epoxy	50	100	10	-	20
5,6 β -epoxy	25	100	10	-	10
7 β -OH	100	30	10	-	-
7 α -OH	100	30	10	-	-
Triol	16	100	-	-	13

^{*} order of elution

Besides the identification on the cholesterol oxides, a comparison between the results obtained by HPLC-APCI-MS and HPLC-UV-RI was carried out. As can be seen in the Table 2, the results obtained by different detectors showed no significant difference, demonstrating that both these detector systems can be used to quantify cholesterol and the oxides found in this study. The methodology was validated using the HPLC-UV-RI system and was applied to determine the cholesterol oxides in egg samples.

Method validation: Recovery was carried out at two levels of addition; 50 and 100 μ g for the oxides found in the samples and 0.1 and 0.2 mg for cholesterol. Each level of addition was carried out in duplicate. Table 3 shows the mean values

for the recovery of cholesterol and cholesterol oxides in commercial spray-dried whole egg powder. The method showed good results for recovery, from 92 to 102% for the oxides and from 93 to 96% for cholesterol. Studies using the direct saponification method gave a higher recovery value for cholesterol (26), a lower value for 7-keto and similar values for the oxides 7 β -OH and 7 α -OH (15).

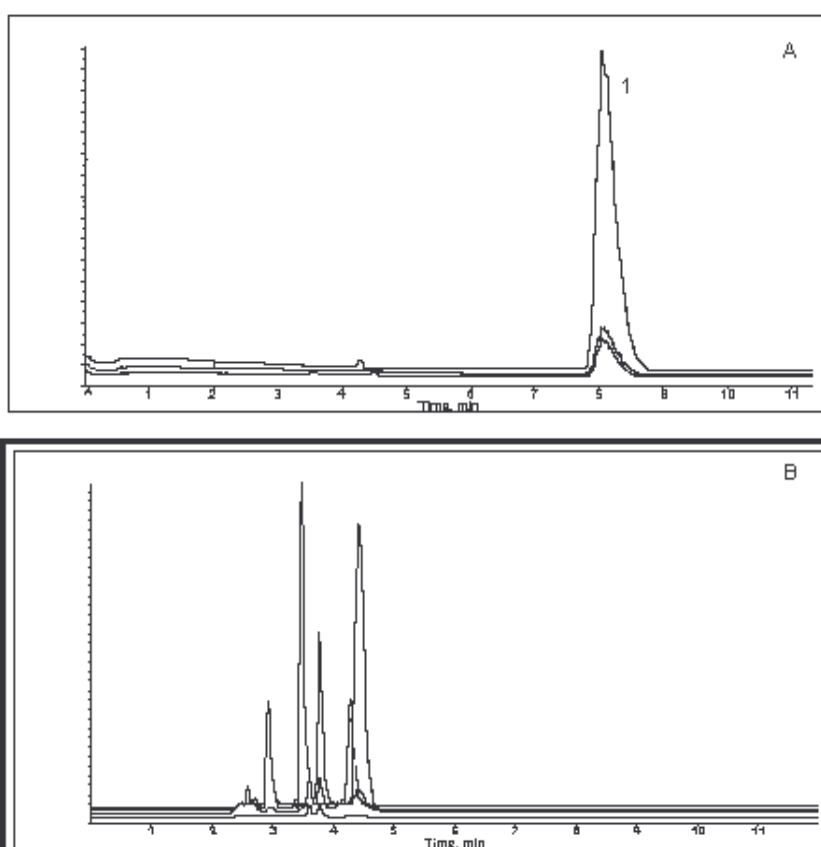


FIG. 5. Chromatogram of (A) cholestan-3 β -5 α -6 β -triol standard and (B) the egg sample, determined using HPLC-APCI-MS. The number peak correspond to : (1) cholestan-3 β -5 α -6 β -triol.

DL and QL were carried out according to Long & Winefordner (16). The low values found for DL and QL (Table 4) demonstrate the adequate sensitivity of the method used in the analyses of cholesterol and its oxides.

Repeatability, verified from the CV (%) values (Table 5), varied from 4.3 to 15.2% for the oxides and 2.5 to 3.7% for cholesterol. According to Horwitz (27), these values are considered acceptable for analytical repetitions, although Morgan & Armstrong (24) reported lower CV values (3.1 to 8.0%) for the oxides.

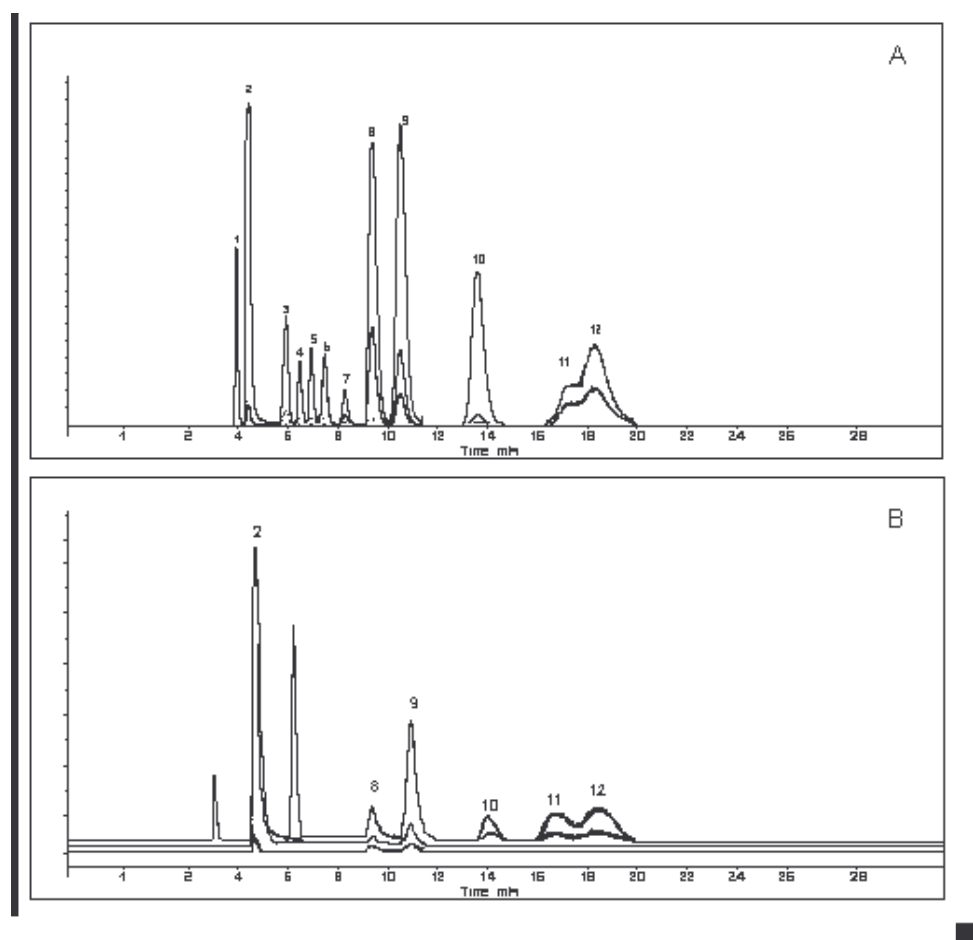


FIG. 6. Chromatogram of (A) cholesterol and cholesterol oxides standards and (B) the egg sample, determined using HPLC-APCI-MS. The numbered peaks correspond to: (1) 19-hydroxycholesterol, (2) cholesterol, (3) 20 α -hydroxycholesterol, (4) 22(R)-hydroxycholesterol, (5) 24(S)-hydroxycholesterol, (6) 22(S)-hydroxycholesterol, (7) 25-hydroxycholesterol, (8) 5,6 α -epoxycholesterol, (9) 5,6 β -epoxycholesterol, (10) 7-ketocholesterol, (11) 7 β -hydroxycholesterol, (12) 7 α -hydroxycholesterol.

The cholesterol content determined in the standard reference material (SRM 1846, NIST) was 19.0 ± 0.2 mg/g in the whole egg powder, identical to the value declared on the certificated (19.0 ± 0.2 mg of cholesterol/g in whole egg powder), showing that the methodology used was very precise.

TABLE 2

Cholesterol oxides levels ($\mu\text{g/g}$) in spray-dried whole egg powder by HPLC-UV-RI and HPLC-APCI-MS

Compounds	HPLC-UV-RI	HPLC-APCI-MS
	M $\pm$ SD ^a	M $\pm$ SD ^a
7-keto	0.34 ± 0.08^a	0.35 ± 0.06^a
7 β -OH	32.87 ± 4.63^a	32.83 ± 3.56^a
7 α -OH	24.64 ± 3.55^a	23.97 ± 2.89^a
5,6 α -epoxy	35.93 ± 5.90^a	35.21 ± 2.80^a
5,6 β -epoxy	51.24 ± 6.08^a	50.88 ± 5.88^a

^aMeans and estimated standard deviation n=10

Means in the same row bearing same letters do not differ significantly ($P > 0.05$).

TABLE 3

Recovery (%) of cholesterol and cholesterol oxides in spray-dried whole egg powder

Compounds	Level of addition	Recovery (%)
	(μg)	M $\pm$ SD ^a
Cholesterol	100	93 ± 5
	200	96 ± 5
7-keto	50	96 ± 5
	100	95 ± 4
7 β -OH	50	97 ± 4
	100	92 ± 5
7 α -OH	50	91 ± 5
	100	101 ± 8
5,6 α -epoxy	50	94 ± 4
	100	95 ± 5
5,6 β -epoxy	50	92 ± 4
	100	97 ± 6
Triol	50	89 ± 6
	100	103 ± 9

^aMean and estimated standard deviation for triplicate

TABLE 4**Detection (DL) and quantification limits (QL) for cholesterol and cholesterol oxides**

Compounds	DL (µg/g)	QL (µg/g)
19-OH	0.031	0.042
Cholesterol	0.026	0.088
20 α -OH	0.002	0.005
22(R)-OH	0.021	0.035
24(S)-OH	0.021	0.030
22(S)-OH	0.021	0.041
25-OH	0.002	0.006
5,6 α -epoxy	0.020	0.050
5,6 β -epoxy	0.020	0.064
7-keto	0.006	0.002
7 β -OH	0.025	0.079
7 α -OH	0.010	0.062
Triol	0.031	0.065

n=10

TABLE 5**Mean values for cholesterol (mg/100g dry weigh base) and cholesterol oxides (µg/g dry weigh base) in eggs**

Compounds	Spray-dried whole egg powder		fresh egg yolk		Fresh egg yolk ω -3	
	M $\pm$ SD ^a	CV (%)	M $\pm$ SD ^a	CV (%)	M $\pm$ SD ^a	CV (%)
Cholesterol	1715 $\pm$ 63	3.69	2481 $\pm$ 62	2.50	2401 $\pm$ 68	2.84
7-keto	2.50 $\pm$ 0.38	15.15	0.36 $\pm$ 0.02	6.25	nd	-
7 α -OH	5.18 $\pm$ 0.50	9.64	15.90 $\pm$ 1.12	7.04	3.88 $\pm$ 0.19	5.02
7 β -OH	6.17 $\pm$ 0.88	14.22	3.73 $\pm$ 0.19	5.13	3.02 $\pm$ 0.13	4.31
5,6 α -epoxy	9.73 $\pm$ 1.09	11.29	nd ^b	-	nd ^b	-
5,6 β -epoxy	17.63 $\pm$ 1.87	10.64	nd ^b	-	nd ^b	-

^aMean and estimated standard deviation for triplicates.^bnd = not detected (detection limits are given in Table 3).

Application of methodology on eggs samples: Of the 12 oxides studied, the following 5 oxides were identified, quantified and confirmed in commercial spray-dried whole egg powder: 7-keto, 7 α -OH, 7 β -OH, 5,6 α -epoxy and 5,6 β -epoxy. The following three oxides were found in fresh eggs: 7-keto, 7 α -OH and 7 β -OH, and only 7 α -OH and 7 β -OH were found in fresh eggs enriched with PUFA-n3 (Table 5). A great variety of values for the amounts of cholesterol determined in spray-dried whole egg powder can be found in the literature, varying from not detected to 37 μ g/g for 7-keto, from not detected to 65 μ g/g for 7 β -OH, from not detected to 35 μ g/g for 7 α -OH, from 12 to 111 μ g/g for 5,6 α -epoxy and from 5 to 46 μ g/g for 5,6 β -epoxy (28, 29). Lower values were found for all the oxides in the present study. The discrepancies found in the amounts of the oxides are probably due to differences in the spray-drying processes used and in part due to the different methodologies used to determine the oxides.

Similar values were found by Van de Bovenkamp et al. (19) for 7-keto in fresh egg yolk. Nourooz-Zadeh (30) quantified 7-keto (2.2 μ g/g of lipid) and 7 α -OH (2.7 μ g/g of lipid) in fresh eggs. On the other hand, none of the eight cholesterol oxides commonly found in foods were detected in fresh eggs (31).

Although enriched eggs containing significant amounts of PUFA-n3, compounds extremely susceptible to oxidation, giving rise mainly to free radicals and peroxides, which accelerate the formation of cholesterol oxides. However, the eggs enriched with omega-3 only presented 2 oxides, 7 α -OH and 7 β -OH, with smaller amounts than those found in fresh eggs. Normally, when birds are fed on diets rich in PUFA-n3, antioxidants such as vitamin E must be added to increase the oxidative stability of the PUFA-n3, and also to prevent the formation of cholesterol oxides (32)

The mean values found for cholesterol were greater for both egg and enriched egg samples and similar for whole egg powder than those reported by the USDA (33).

In summary, the factors studied in the extraction design influenced the cholesterol and cholesterol oxide contents. It was possible to establish the best

conditions for saponification and extraction of non-saponifiable matter using response surface methodology. The proposed method was shown to have high sensitivity, precision and recovery and to be easy to apply in the separation of cholesterol and cholesterol oxides in eggs. Confirmation of the oxides 20 α -OH and 25-OH is required, since the presence these oxides were not confirmed by HPLC-APCI-MS.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP and to the National Brazilian Research Foundations (CAPES and CNPq) for financial support.

REFERENCES

1. Guardiola, F., Codony, R., Addis, P.B., and Rafecas, M. (1996) Biological effects of oxysterols: current status, *Food Chem. Toxic.* 34, 193-211.
2. Imao, K., Wang, H., Komatsu, M., and Hiramatsu, M. (1998) Free radical scavenging activity of fermented papaya preparation and its effect on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in iron-induced epileptic foci of rats, *Mol. Biol. Int.* 45, 11-23.
3. Hino, T., Kawanish, S., Yasui, H., Oka, S., and Sakurai, H. (1998) HTHQ na antilipid-peroxidative compound : its chemical and biochemical characterizations *Biochim. Biophys. Acta.* 1425, 47-60.
4. Smith, L. L. (1987) Cholesterol autoxidation, *Chem Physis. Lipids.* 44, 87-125.
5. Yan, P.S., and White, P.J. 1990. Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 67, 927-931.
6. Razzazi-Fazeli, E., Kleineisen, S., and Luf, W. (2000) Determination of cholesterol oxides in processed food using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, *J. Chromatogr. A* 896, 321-334.

7. Creri, M., Ferretti, D., Manini P., and Musci, M. (1998) Evaluation of particle beam high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of cholesterol oxides, *J. Chromatogr. A.* 794, 253-262.
8. Raith, K., Brenner, C., Farwanah, H., Muller, G., Eder, K., and Neubert, R.H.H (2005) A new LC/APCI-MS method for the determination of cholesterol oxidation products in food, *J. Chromatogr. A.* 1067, 207-211.
9. Careri, M., Ferretti, D., Manini, P., and Musci, M. (1998) Evaluation of particle beam high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of cholesterol oxides, *J. Chromatogr.* 794, 253-262.
10. Smith, L. L. (1993) Analysis of oxysterols by liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr.* 16, 1731.
11. Csallany, A. S., Kindom, S. E., Addis, P. B., and Lee, J. (1989) HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues, *Lipids*, 24, 645-651.
12. Rose-Salin, C., Hugget, A. C., Bosset, J. O., Tabacchi, R., and Fay, L. B. (1995) Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using (²H₇) cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts, *J. Agric.Food Chem.* 43, 935.
13. Sander, B. D., Addis, P. B., Park, S. W., and Smith, D. E. (1989) Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods, *J. Food Prot.* 52, 109-114.
14. Guardiola, F., Codony, R., Manich, A., Rafecas, M., and Boatella, J. (1995) Stability of polyunsaturated fatty acids in eggs powder processed and stored under various conditions, *J. Agric. Food Chem.* 43, 2254-2259.
15. Dionisi, F., Golay, P.A., Aeschlimann, J.M., and Fay, L.B. (1998) Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: Methods Comparison and Validation, *J. Agric. Food Chem.* 46, 2227-2233.
16. Long, G.L., and Winefordner, J.D (1983) Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* 55, 712-724.,

17. Park, P.S.W., Guardiola, F., Park, S.H., and Addis, P. B (1996) Kinetic evaluation of 3 β -hydroxycholest-5-en-7-one (7-ketocholesterol) stability during saponification, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 623-629.
18. Ulberth, F., and Buchgraber, M (2000) Extraction and purification of cholesterol oxidation products (Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., and Savage, G.P., eds.), pp. 27-49, AOCS Press, USA.
19. Van de Bovenkamp, P., Kosmeijer-Schuil, T.G., and Katan, M.B (1988) Quantification of oxysterols in dutch foods: Egg products and mixed diets, *Lipids*, 23, 1079-1085.
20. Baggio, S.R., Miguel, A.M.R., and Bragagnolo, N. (2005) Simultaneous determination of cholesterol oxides, cholesterol and fatty acids in processed turkey meat products, *Food Chem*, 89, 475-484.
21. Fontana, A., Antoniazzi, F., Civiatta, M.L., Trivillone, E., and Cimino, G. (1993) H-NMR study of cholesterol autooxidation in egg powder and cookies exposed to adverse storage, *J. Food. Sci.* 58, 1286-1290.
22. Fontana, A., Antoniazzi, F., Cimino, G., Mazza, G., Trivillone, E., and Zanone, B. (1992) High-Resolution NMR detection study of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk, *J. Food. Sci.* 57, 869-872.
23. Shu-Mei, L., Gray, J.I., Buckley, D.J., and Kelly. P.M (1995) Influence of free radicals and other factors on formation of cholesterol oxidation products in spray-dried whole egg, *J. Agric. Food. Chem.* 43, 1127-1131.
24. Morgan, J.N., and Armstrong, D.J. (1989) Wide-Bore capillary gas chromatographic method for quantification of cholesterol oxidation in egg yolk powder, *J. Food Sci.* 54, 427-429.
25. Morgan, J.N., and Armstrong, D.J. (1992) Quantification of cholesterol oxidation in egg yolk powder spray-dried with direct heating, *J. Food Sci.* 57, 43-45.
26. Al-Hasani, S.M., Hossein, S., and Hlavac, J. (1990) Rapid determination of cholesterol in selected frozen foods, *J. Assoc.Off. Anal. Chem.* 73, 817-820.

27. Horwitz, W. (1982) Evaluation the analytical methods used for regulation of foods and drugs, *Anal. Chem.* 54, 67A-76A.
28. Paniangvait, P., King, A.J., Jones, A.D., and German, B.G. (1995) Cholesterol oxides in foods of animal origin, *J. Food Sci.* 60, 1159-1174.
29. Galobart, J., and Guardiola, F. (2002) Formation and content of cholesterol oxidation products in egg and egg products, (Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., and Savage, G.P., eds. p. 127-145, AOCS Press, USA.
30. Nourooz-Zadeh, J (1990) Determination of the autoxidation products from free or total cholesterol: a new multistep enrichment methodology including the enzymatic release of esterified cholesterol, *J. Agric. Food Chem.* 38, 1667.
31. Nourooz-Zadeh, J., and Appelqvist, L. A (1987) Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products, *J. Food Sci.* 52, 57-67.
32. Whale, K. W. J., Hoppe, P. P., and McIntosh, G (1993) Effects of storage and various intrinsic vitamin E concentrations on lipid oxidation in dried egg powders, *J. Sci Food Agric.* 61, 463-469.
33. USDA. Nutrient Database for Standard Reference. (2000) Release 13, NDB n°10199, n°01125.

CAPÍTULO 3

COMPARATIVE STUDY BETWEEN METHODS AND VALIDATION OF THE METHOD TO DETERMINE FATTY ACIDS IN EGGS

**EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO PARA A REVISTA
LIPIDS**

ABSTRACT

A comparative study was carried out between lipid extraction according to Folch et al. (1957) (1) followed by the preparation of methyl esters according to Joseph & Ackman (1992) (2) by saponification and methylation with boron trifluoride in methanol, and direct sample methylation according to Wang et al. (2000) (3). The method involving lipid extraction followed by esterification presented more accurate and precise results and was validated using powdered egg certified reference material (SRM 8415, NIST). After validation, the method was applied to the determination of fatty acids in eggs, eggs enriched with polyunsaturated omega-3 fatty acids (n-3 PUFA) and spray-dried egg powder.

INTRODUCTION

Fatty acids in foods are mostly analysed by gas chromatography (GC) of their methyl esters and detected by flame ionisation (4).

Of the sample preparation methods used for the determination of fatty acids in eggs, the most common is lipid extraction with chloroform:methanol (2:1, v/v) (1) followed by conversion of the fatty acids into methyl esters (5). The methodology proposed by Metcalfe et al. (5) involves two steps. In the first step the oil is heated with NaOH in methanol, breaking the triacylglycerol molecules into glycerol and free fatty acids in approximately 5 minutes. In the second step the free fatty acids are esterified with methanolic boron trifluoride (BF_3) for 2 minutes at 97°C . This method has been adopted by the official methods (6, 7).

Ackman (8) affirmed that the saponification process is the last thing wanted since transesterification of fat can be very quick in the presence of alkali in methanol, even at room temperature, producing methyl esters in 2 to 3 minutes. Thus with the time or heat, the base will start saponifying the already formed esters, and part of the sample will convert into free fatty acid. Additionally it was observed that heating with BF_3 for only 2 to 5 minutes was too short, only esterifying from 85 to 90% of the free fatty acids, requiring 20 minutes to esterify 99% of the fatty acids. Apart from this, recommended that no alkali transesterification is needed.

Over the years the work of Metcalfe et al. (5) has suffered modifications, giving birth to methods using other methanolic bases and acids with different times of heating at 97°C (9, 10, 11). According to Craske (11), a collaborative study aimed at identifying instrumental and chemical errors during the analysis of fatty acids by GC, indicated the methylation methods using methanolic BF_3 as being amongst those presenting the best results.

Recently, different methods (direct methylation, saponification, extraction with chloroform:methanol and post-extraction saponification) were compared for the determination of fatty acids in egg yolk (3). The results showed less variation in the direct methylation method than in the other methods. Direct

methylation was more precise than extraction according to Folch et al. (1), due to the smaller number of steps involved in the extraction and sample preparation processes. It consequently presented better recovery and was also quicker and less costly. In addition the extraction with chloroform:methanol only consumed more time and increased the costs of the analysis, giving rise to a greater number of errors due to the multiple number of steps involved (12).

The analysis of methyl esters by GC requires high resolution in order to separate the positional and configurational isomers. The fused silica capillary columns typically used in this type of analysis normally vary from 25 to 100 m (13), 100 m columns with highly polar stationary phases, such as those filled with cyanoalkyl polysiloxane being the most recommended for the separation of isomers of conjugated, monounsaturated and polyunsaturated linolenic fatty acids and many of the 18:2n6 and 18:3n3 isomers (14). A more accurate analysis of *trans* fatty acids can be obtained from the association of gas chromatography with silver-nitrate thin-layer chromatography or silver-ion liquid chromatography (15).

Identification of the fatty acids present in foods is carried out by comparing the retention times of the methyl esters of the sample with those of the standards. For the non-identified compounds, some studies use equivalent chain length (ECL) values (16, 17, 18). However, the combination of parameters such as retention time with structural information obtained from mass spectrometry constitutes one of the most decisive methods to identify complex organic compounds (13, 19, 20).

An internal standard is used to quantify the fatty acids in mg/100g sample, and this standard should be a homologue of the compounds analysed, eluting separately from them (10). The fatty acids nervonic (24:1n-9) and tricosanoic (23:0) acids are the most used as internal standard, due to the similar response obtained by both with the ionisation detector, nervonic acid having the additional advantage of being highly soluble, although it is an unstable compound and can suffer losses by auto-oxidation in addition to

containing impurities in the form of position isomers, as found in commercial standards (21). Tricosanoic acid is stable but of limited solubility (2, 21).

In the present study the method involving lipid extraction with chloroform:methanol followed by the preparation of methyl esters according to Joseph & Ackman (1992) (2) by saponification and methylation with BF_3 , was compared with direct sample methylation according to Wang et al. (3), using GC with internal standardisation. The more precise and accurate methodology was validated with reference material (SRM 8415, NIST) and applied to samples of egg, egg enriched with polyunsaturated omega-3 fatty acids (n-3 PUFA) and commercial spray-dried whole egg powder.

MATERIAL & METHODS

Solvents and chemicals. The solvents sodium hydroxide (NaOH), methanol, isooctane and methanolic boron trifluoride (BF_3) were of analytical grade, acquired from Merck (Darmstadt, Germany) and n-hexane was HPLC grade, from Mscience (Darmstadt, Germany). A total of 37 fatty acid methyl ester (FAME) standards from 4:0 to 24:0, of the brand Supelco (Bellefonte, PA, USA) were used for identification. The internal standards used for quantification were the methyl esters of tricosanoic acid (23:0) and tridecanoic (13:0) acid from Sigma (Miliford, MA, USA) with 99% purity. The reference material SRM 8415, acquired from NIST (Gaithersburg, MD, USA) was used to verify the accuracy and precision of the method.

Samples. Fresh egg enriched with n-3 PUFA was used for the comparative study between the methods. One 2 dozen batch of eggs was used for the analysis, the yolks being separated and homogenised in beakers with a glass rod. For the direct methylation method according to Wang et al (2000) (3), ten 0.05g samples were analysed. For the lipid extraction method, ten 2 g samples were used and approximately 0.1 g of the oil obtained weighed for saponification and methylation according to Joseph & Ackman (2). Samples of recently prepared eggs, eggs enriched with n-3 PUFA and commercial spray-

dried whole egg powder, were acquired directly from the producers for application of the method.

Experimental correction factor for the fatty acids EPA and DHA. The chemical and instrumental parameters were optimised to verify the detector response for a saturated fatty acid (16:0) in relation to the internal standard (23:0). The experimental correction factors for the fatty acids EPA and DHA were calculated in relation to the internal standard and compared to the theoretical correction factor.

Comparison of the methods and validation of the method to determine the fatty acid composition. A comparative study between lipid extraction according to Folch et al. (1) followed by preparation of the methyl esters according to Joseph & Ackman (2) by saponification and methylation with BF_3 , and direct sample methylation according to Wang et al. (3), was carried out. The method presenting the best results with respect to accuracy and precision was validated using powdered egg certified reference material (SRM 8415, NIST) and applied to samples of egg, egg enriched with n-3 PUFA and commercial spray-dried whole egg powder.

CG equipment and conditions. A Varian 3400 CX gas chromatograph (Walnut Creek, California, USA) was used, equipped with a flame ionisation detector, split injector, CP-SIL 88 column (100 m, 0.25 mm, 0.20 μm) (Chrompack, Netherlands) and star workstation. The chromatographic conditions were: detector temperature 280°C; injector temperature 250°C; initial column temperature 120°C for 8 minutes, programmed to increase at 15°C per minute up to 160°C and then at 4°C per minute up to 195°C, maintaining this temperature for 12 minutes and then increasing again at 15°C per minute up to the final temperature of 220°C, maintained for 12 minutes. The stripping gas was hydrogen at 1 ml/min, make-up gas of nitrogen at 30 ml/min and synthetic air at 300 ml/min. The split 1:50 injection mode was used. The fatty acids were identified by comparison of the retention times of the standards with those of

the sample, and quantification by internal standardisation using the methyl esters of tricosanoic and tridecanoic acids as the internal standards. The AOCS methodology was used for the calculations (7).

Determination of the lipid and moisture contents. Total lipids were determined using the gravimetric method of Folch et al. (1) and moisture content using the AOAC (1997) methodology (6).

Statistical analysis. The *Statistica 5.0* programme (Statsoft, 1995) was used to analyse the experimental data.

RESULTS & DISCUSSION

Experimental correction factor for the fatty acids EPA and DHA. The methyl ester of palmitic acid (16:0) was used to verify the detector response for a saturated fatty acid in relation to the internal standard (23:0). The experimental correction factor for the detector response was 1.004 ± 0.03 , this result being similar to the theoretical correction factor, demonstrating that the conditions for the application of the methodologies were optimal. The experimental correction factors for EPA and DHA obtained in relation to the methyl ester of tricosanoic acid, used as the internal standard, were 1.07 ± 0.12 and 0.97 ± 0.01 , respectively, values considered to be satisfactory since the theoretical correction factors (7) were 0.99 for EPA and 0.97 for DHA. Thus the theoretical correction factors were used for the calculations of mg/100g EPA and DHA in relation to the internal standard used.

Comparison of the methodologies of Joseph & Ackman (2) and Wang et al. (3) for the determination of fatty acids in egg. Table 1 shows the results of the comparative study between extracting the lipids according to Folch et al. (1) followed by preparation of the methyl esters according to Joseph & Ackman (2) and direct methylation of the sample according to Wang et al. (3). Direct methylation of the samples using Wang's method (3) resulted in significantly

lower fatty acid contents and greater variation in the results as compared to the method extracting the lipids (1) with chloroform:methanol followed by saponification and methylation (2). Despite the fact that the method of Joseph & Ackman (2) presented a greater number of steps, consequently increasing the time and cost of the analysis, it presented better repeatability, observed from the coefficient of variation (Table 1). The low repeatability observed for the direct methylation method proposed by Wang et al. (3) was probably due to a less efficient conversion of the fatty acids into their methyl esters as compared to the same procedure but starting with the lipid extract. The results of Wang et al. (3) disagreed with the present results, observing less variation for the majority of the fatty acids when using direct methylation of the samples, than when extracting with chloroform:methanol. Lepage & Roy (12) also observed that extraction with chloroform:methanol followed by saponification led to a greater number of errors due to the multiple steps involved.

Validation of the methodology for the determination of fatty acids in eggs by gas chromatography using internal standardisation. Since the method of Joseph & Ackman (2) was shown to be more precise, this method was validated using powdered egg certified reference material (SRM 8415, NIST). Table 2 shows the results obtained for the fatty acids of the powdered egg certified reference material and for the application of the Joseph & Ackman method (2). Observe that the results obtained were same to that specified for the reference material.

TABLE 1
EPA and DHA contents of fresh eggs enriched with n-3 PUFA, determined by different methods

Fatty acid ^b	JOSEPH & ACKMAN (1992)		WANG et al. (2000)	
	M ± SD ^a	CV (%)	M ± SD ^a	CV (%)
EPA	9.56 ± 0.4 a	4.2	4.78 ± 0.9 b	18.8
DHA	118.20 ± 4.8 a	4.1	77.10 ± 15.0 b	19.5

^a Mean ± standard deviation with n=10, Means followed by the same letter do not differ according to the Tukey test (P>0.05). ^b (mg/100g, dwb), CV (%) = Coefficient of variation.

Determination of the total lipid and moisture contents. Table 3 shows the results for total lipids (g/100g yolk on a dry weight basis) and moisture content (g/100g yolk) in eggs, eggs enriched with n-3 PUFA and whole spray-dried egg powder. The values for lipids in the egg yolk and those of the eggs enriched with n-3 PUFA were lower and the values of the whole spray dried powder higher, than the values cited by USDA (22). The results for moisture content for all the egg samples were similar to those found by USDA (22).

TABLE 2

Comparison between the results obtained for fatty acids and total lipids using the method of JOSEPH & ACKMAN (1992) for powdered egg certified reference material (SRM 8415, NIST) and the values declared on the certificate

Fatty acids (% weight, dwb)	(SRM 8415, NIST)	JOSEPH & ACKMAN (1992)
14:0	0.191 ± 0.013	0.189 ± 0.016
15:0	0.050 ± 0.03	0.051 ± 0.03
16:0	12.36 ± 0.45	12.36 ± 0.45
16:1	1.59 ± 0.37	1.50 ± 0.46
17:0	0.156 ± 0.029	0.156 ± 0.027
18:0	4.21 ± 0.26	4.19 ± 0.29
18:1n-9	23.0 ± 2.4	23.5 ± 2.2
18:2n-6	4.69 ± 0.38	4.67 ± 0.40
20:3	0.064 ± 0.007	0.064 ± 0.005
20:4	0.496 ± 0.045	0.499 ± 0.040
22:6n-3	0.266 ± 0.062	0.262 ± 0.064
Lipids (% weight, dwb)	48.0 ± 5.0	48.1 ± 5.2

TABLE 3

Mean values for total lipids and moisture in eggs enriched with n-3 PUFA, egg and whole spray dried egg powder

Sample	Total lipids ^a	Moisture ^a
n-3 PUFA egg ^b	69.01	50.02
Egg ^b	61.59	50.87
Whole spray-dried egg powder ^c	36.72	2.98

^aMean with n=3, ^bmg/100g yolk, dwb, ^cmg/100g, dwb

Application of the methodology to eggs. Table 4 shows the results obtained for the composition of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and of *trans* fatty acids in eggs, eggs enriched with n-3 PUFA and whole spray-dried egg powder. Twenty-nine fatty acids were identified, and in all the samples the major ones found were: 14:0, 16:0, 18:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3 and 20:4n-6. The fatty acid 18:1n-9 *trans* was the major principle in whole spray-dried egg powder. The following fatty acids were not identified in any of the egg samples: 4:0; 6:0; 8:0; 10:0; 11:0; 12:0, 13:0 and 23:0 and only traces (< 1 mg/100g) of the following: 15:1n-9, 22:1n-9 and 22:2n-6 were found.

The eggs enriched with n-3 PUFA presented the highest values for 16:1n-7, 17:1n-7, 20:1n-9, 20:2n-6 and 18:3n-3 and lower values for 16:0, 17:0, 20:0, 22:0, 24:0, 20:3n-6, 20:4n-6 and 18:1n-9 *trans* than eggs. In addition, the concentration of 18:3n-3 and 22:6n-3 in the eggs enriched with n-3 PUFA showed 30% and 100% higher, respectively, of the amounts found in eggs. The monounsaturated fatty acids were similar and the PUFA showed a value 45% higher than the other eggs. A reduction of 22% in the total saturated fatty acid content was found in the eggs of chickens receiving higher concentrations of n-3 PUFA in their diet, although the concentration of these acids in the eggs are little influenced by the lipid content of the diet (23).

The ideal ratio between n-6 and n-3 in the daily diet has still not been quite established, but the recommendation is from about 4-10:1 and the ideal ratio about 4:1 (24, 25). Thus the ratio of 3.2 found in the yolks of eggs enriched with n-3 PUFA can be considered satisfactory. In eggs the n-6/n-3 ratio was 7.3, a value much higher than that of the eggs enriched with n-3 PUFA, due to the higher concentration of fatty acids n-6 in eggs. However, these values are also within the recommended values (24).

High concentrations of 18:1n-9 *trans* were observed in the whole spray dried egg powder, probably due to the high temperature required for the processing of these eggs, which could lead to the formation of *trans* fatty acids (26). In addition, higher contents of 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 21:0, 22:0, 24:0, 14:1n-9, 18:1n-9, 24:1n-9 and 18:3n-6 were found in eggs and eggs

enriched with n-3 PUFA. On the other hand, the samples of powdered egg also presented higher contents of 20:3n-3, 20:5n-3 and 22:6n-3 than found in eggs and eggs enriched with n-3 PUFA.

In summary, quantification of the fatty acids by internal standardisation according to the method of Joseph & Ackman (1992) was shown to be more accurate and precise than the direct methylation method. Although necessary to extract the total lipids, this is easily carried out. By applying this methodology, it was shown that eggs enriched with n-3 PUFA showed a better lipid profile from the nutritional point of view than eggs. On the other hand, high contents of *trans* fatty acids were found in the whole spray dried egg powder, however this samples presented lower ratio of n6/n3 than the other eggs. Considering that whole spray dried egg powder is used in the formulation of a variety of products, mainly infant foods, the presence of *trans* fatty acids represents a public health problem.

Acknowledgements

The authors are grateful to the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and the Brazilian National Research Foundations (CAPES and CNPq) for their financial support.

TABLE 4**Concentration (mg/100g sample, dwb)^a of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and *trans* fatty acids (*trans* FA) in eggs**

Fatty acid	n-3 PUFA egg ^b	Egg ^b	Whole spray-dried egg powder ^c
14:0	640 ± 11	660 ± 10	939 ± 18
15:0	90 ± 2	100 ± 2	157 ± 6
16:0	4250 ± 61	6520 ± 74	5951 ± 60
17:0	280 ± 11	350 ± 9	428 ± 19
18:0	1750 ± 19	1340	4197 ± 101
20:0	100 ± 2	180 ± 4	124 ± 3
21:0	traços ^e	traços ^e	174 ± 3
22:0	100 ± 2	120 ± 2	203 ± 4
24:0	16 ± 0	26 ± 1	67 ± 2
14:1 n-9	110 ± 3	100 ± 3	169 ± 2
16:1 n-7	4690 ± 62	3040	1206 ± 16
17:1 n-7	240 ± 4	110 ± 2	traços
18:1 n-9	6640 ± 75	4850 ± 55	7986 ± 88
20:1 n-9	340 ± 9	110 ± 3	39 ± 1
24:1 n-9	traços ^e	traços ^e	62 ± 2
18:2 n-6	5310 ± 74	9296	4161 ± 50
18:3 n-6	16 ± 0	16 ± 0	34 ± 1
20:2 n-6	290 ± 3	48 ± 2	38 ± 1
20:3 n-6	25 ± 0	35 ± 1	33 ± 1
20:4 n-6	200 ± 3	340 ± 8	343 ± 10
18:3 n-3	1630 ± 38	1250 ± 23	680 ± 13
20:3 n-3	traços ^e	traços ^e	36 ± 1
20:5 n-3	14 ± 0	traços	55 ± 1
22:6 n-3	170 ± 3	85 ± 2	806 ± 16
18:1 n-9 <i>trans</i>	48 ± 2	95 ± 3	1500 ± 23
18:2 n-6 <i>trans</i> ^d	17 ± 1	16 ± 0	31 ± 1
Saturated (SAT)	7226	9270	12239
Monounsaturated	12020	8236	9462
Polyunsaturated (PUFA)	7655	11070	6186
Unsaturated	19675	19306	15648
FA <i>tran</i>	65	111	1531
PUFA n-6	5841	9735	4609
PUFA n-3	1814	1335	1577
PUFA / SAT	1.1	1.2	0.5
PUFA n-6/PUFA n-3	3.2	7.3	2.9

^aMean ± standard deviation with n=3, ^bmg/100g yolk, dwb, ^cmg/100g, dwb, ^d(9c, 12t + 9t, 12c),^etr = traces (less than 1mg/100g)

REFERENCES

1. Folch, J., Less, M., and Stanley, S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226, 497.
2. Josepf, J.D., and Ackman, R.G. (1992) Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study, *J. AOAC Intern.* 75, 488-506.
3. Wang, Y., Sunwoo, H., Cherian, G., and Sim, J.S. (2000) Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods, *Poult. Sci.* 79, 1168-1171.
4. Eder, K. (1995) Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B.* 671,113-131.
5. Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A., and Pelka, J.R. (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis, *Anal. Chem.* 38, 514-515.
6. AOAC (1995) *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th edn.(Arlington,ed.), AOAC International, Official Method 963. 33.
7. AOCS (1997) *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, 5th, edn. (Firestone, D., ed.), American Oil Chemists' Society Press, Champaign, Official Method Ce 1b-89.
8. Ackman, R.C. (1998) Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of the fatty acids of fish oils, *J. AOCS.* 75, 541-545.
9. Hartman, L.,and Lago, R.C.A. (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esteres from lipids, *Lab. Prac.* 22, 475.
10. Slover, H.T., and Lanza, E. (1979) Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography, *J. AOCS.* 56, 933-943.
11. Craske, J.D. (1993) Separation of instrumental and chemical errors in the analysis of oil by gas chromatography—A collaborative evaluation, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 325-334.

12. Lepage, G., and Roy, C.C. (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one step reaction, *J. Lipid Res.* 27, 114-120.
13. Gutnikov, G. (1995) Fatty acid profiles of lipids samples, *J. Chromatogr. B.* 671, 71-89.
14. Kramer, J.G., Blackadar, C.B., and Xhou, J. (2002) Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP Sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. *Lipids*, 37, 823-835.
15. Ratnayake, W.M.N. (2004) Overview of methods for the determinations of trans fatty acids by gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography, silver-ion liquid chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Intern.* 87, 523-539.
16. Stránský, K., Jursík, T., and Vitek, A. (1997) Standard equivalent chain length values of monoenoic and polyenoic (methylene interrupted) fatty acids, *J. High Resol. Chromatogr.* 20, 143-158.
17. Bragagnolo, N., and Rodriguez-Amaya, D.B. (2001) Total lipid, cholesterol, and fatty acids of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and Wild Marine Shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*), *J. Food Comp. Anal.* 14, 359-369.
18. Bragagnolo, N., and Rodriguez-Amaya, D.B. (2002) Simultaneous determination of total lipid, cholesterol and fatty acids in meat and backfat of suckling and adult pigs, *Food Chem.* 79, 255-260.
19. Woollard, P.M., and Mallet, A.I. (1984) A novel gas chromatography-mass spectrometric assay for monohydroxy fatty acids, *J. Chromatogr.* 306, 1-21.
20. Kuksis, A., and Myher, J.J. (1995) Application of tandem mass spectrometry for the analysis of long-chain carboxylic acids, *J. Chromatogr. B.* 671, 35-70.
21. Shantha, N. C., and Ackman, R. G. (1990) Nervonic acids versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatographic analysis of fish oil longer-chain n-3 polyunsaturated acid methyl esters, *J. Chromatogr. B.* 533, 1-10.

22. USDA. (2000) *Nutrient Database for Standard Reference*. Release 13, NDB n° 13390, n° 01125, n° 01133.
23. Li-Chan, E.C.Y., Powrie, W.D., and Nakai, S. (1995) The chemistry of eggs and egg products, in *Egg Science and Technology* (Stadelman, W.J, and Cotterill, O.J., eds.) 4th, p 591, New York, Food Products Press.
24. Simopoulos, A. P. (2000) Symposium: role of poultry products in enriching the human diet with *n*-3 PUFA, *Poult. Sci.* 79, 961-970.
25. Schaefer, E. J. (2002) Lipoproteins, nutrition and heart disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 75,191-212.
26. Tsai, L.S., and Hudson, C.A. (1984) Cholesterol oxides in commercial dry egg products: isolation and identification, *J. Food Sci.* 49, 1245-1248.

CAPÍTULO 4

EFEITO DA ESTOCAGEM NA FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL E ALTERAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM OVO EM PÓ

**EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO PARA A REVISTA
JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY**

RESUMO

Os teores de colesterol, óxidos de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos foram determinados em duas marcas comerciais (A e B) de ovo em pó. De cada marca foram analisados dois lotes com diferentes datas de produção e as amostras foram analisadas no tempo zero e mensalmente até os seus prazos de validade. O valor médio de colesterol da marca A foi de 1716 e da marca B de 1570 mg/100g de ovo. Os óxidos de colesterol identificados e quantificados foram 7-cetocolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 7 α -hidroxicolesterol, 5,6 α -epoxicolesterol e 5,6 β -epoxicolesterol, os quais elevaram-se durante o período de estocagem. Na marca A, as concentrações de 7-cetocolesterol aumentaram de 2,5 para 20,6 μ g/g, de 7 β -hidroxicolesterol de 2,9 para 31,8 μ g/g, de 7 α -hidroxicolesterol de 5,1 para 28,2 μ g/g, de 5,6 α -epoxicolesterol de 5,7 para 43,4 μ g/g e de 5,6 β -epoxicolesterol de 5,4 para 20,3 μ g/g. Na marca B, as concentrações de 7-cetocolesterol aumentaram de 1,3 para 29,9 μ g/g, de 7 β -hidroxicolesterol de 4,9 para 50,7 μ g/g, de 7 α -OH de 4,2 para 35,1 μ g/g, de 5,6 α -epoxicolesterol de 3,2 para 33,9 μ g/g e de 5,6 β -epoxicolesterol de 8,8 para 77,1 μ g/g. Os valores de lipídios totais de 35 g/100g e de umidade de 3 g/100g foram constantes durante o período de estocagem. Os principais ácidos graxos determinados em todas as amostras foram: C14:0, C16:0, C18:0, C16:1 n7, C18:1 n9, C18:2 n6, C20:4 n6, C18:3 n3 e C18:1 n9 *trans*. A estocagem ocasionou redução dos ácidos graxos poliinsaturados evidenciando que ocorreu oxidação lipídica com produção de radicais livres que contribuíram para o aumento dos óxidos de colesterol.

INTRODUÇÃO

O grande consumo de alimentos industrializados que utilizam ovos em sua fabricação, como produtos de panificação e massas, impôs a necessidade da obtenção de matéria-prima que apresente maior tempo de estocagem, o que resultou no uso do ovo em pó. No entanto, o ovo é um alimento rico em colesterol e lipídios e o processo de produção de ovo em pó por “spray-dryer” utiliza altas temperaturas que aceleram as reações entre os lipídios e o oxigênio molecular, ocasionando a formação de óxidos de colesterol (1,2). Além disso, os ácidos graxos poliinsaturados presentes nos ovos são compostos extremamente suscetíveis à oxidação, originando principalmente radicais livres que promovem a formação dos óxidos de colesterol. Em adição, as condições de transporte e estocagem do ovo em pó, também contribuem para a degradação do colesterol e dos ácidos graxos.

Os óxidos de colesterol normalmente encontrados em amostras de ovo em pó são: 7α -hidroxicolesterol (7α -OH) e 7β -hidroxicolesterol (7β -OH) e seu produto de desidrogenação, o 7-cetocolesterol (7-ceto). Além desses, o $5,6\alpha$ -epoxicolesterol ($5,6\alpha$ -epoxi) e o $5,6\beta$ -epoxicolesterol ($5,6\beta$ -epoxi) e seus produto de hidratação, o colestanoltriol, assim como, os óxidos formados pela oxidação da cadeia lateral do colesterol tais como o 20α -hidroxicolesterol (20α -OH) e o 25-hidroxicolesterol (25-OH) foram determinados (3,4).

Os óxidos de colesterol são aterogênicos, citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (5,6) e estão também relacionados com doenças degenerativas, como Parkinson e Alzheimer e o diabetes (7,8). Dentre estes óxidos, o 25-OH e o triol são descritos como sendo os mais aterogênicos (9).

Ácidos graxos *trans* têm sido associado ao desenvolvimento de enfermidades cardiovasculares, devido ao aumento de LDL-colesterol e Lp(a) sanguíneo, de forma similar ao que acontece com o consumo de ácidos graxos saturados (10,11). Por outro lado, os ácidos graxos *trans* são considerados mais preocupantes que os ácidos graxos saturados por diminuírem o teor de HDL-colesterol (12). Em adição, a resolução RDC n° 360 da ANVISA (13),

estabelece que o valor de gordura trans seja declarado no rótulo, considerando significativo acima de 0,2 g/100 g.

Embora, os efeitos prejudiciais à saúde com o consumo contínuo de alimentos contendo níveis significativos de óxidos de colesterol e ácidos graxos *trans* ainda sejam questão de estudos, torna-se necessário o aperfeiçoamento dos sistemas de produção e distribuição, além das técnicas de estocagem comercialmente utilizadas, visando minimizar a produção destes compostos em alimentos processados. Em adição, é necessário o desenvolvimento de pesquisas sobre as alterações ocorridas nos teores de ácidos graxos durante o processamento e estocagem destes alimentos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi verificar a formação de óxidos de colesterol e a alteração da composição de ácidos graxos em ovo em pó durante o período de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material. Os padrões de colesterol e óxidos de colesterol: colest-5-ene-3 β ,19-diol (19-OH), colest-5-ene-3 β ,20 α -diol (20 α -OH), colest-5-ene-3 β ,22[R]-diol (22(R)-OH), colest-5-ene-3 β ,22[S]-diol (22(S)-OH), colest-5-ene-3 β ,25diol (25-OH), 3 β -hidroxicolest-5-ene-7-one (7-ceto), colest-5-ene-3 β ,7 β -diol (7 β -OH), 5,6- α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol (5,6 α -epoxicolesterol), 5,6- β -epoxi-5 β -colestan-3 β -ol (5,6 β -epoxicolesterol) e colestan-3 β -5 α -6 β -triol (triol) foram obtidos de Sigma (Miliford, MA, USA). Colest-5-ene-3 β ,24[S]-diol (24(S)-OH) e colest-5-ene-3 β ,7 α -diol (7 α -OH) foram adquiridos de Steraloids (Newport, RI, USA) e o padrão de referência de ovo integral em pó (SRM 1846) de NIST (Gaithersburg, MD, USA). Um total de 37 padrões de éster metílico de ácidos graxos (FAME) do 4:0 ao 24:0 da marca Supelco (Bellefonte, PA, USA) foram usados para identificação. Os padrões internos utilizados para a quantificação foram os ésteres metílicos do ácido tricosanóico (23:0) e do ácido tridecanóico (13:0) da marca Sigma (Miliford, MA, USA) com 99% de pureza e o padrão de

referência de ovo integral em pó (SRM 8415) de NIST (Gaithersburg, MD, USA).

Amostras. Duas marcas comerciais (A e B) de ovo em pó foram adquiridas diretamente da fábrica. De cada marca foram analisados dois lotes com diferentes datas de produção. As amostras constituídas de 3 kg foram homogeneizadas e embaladas a vácuo em sacos de polietileno contendo 100 g e armazenadas no escuro a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. As amostras foram analisadas no tempo zero e mensalmente até o prazo de validade de 6 meses para a marca A e 12 meses para a marca B. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Extração de Lipídios. Os lipídios foram extraídos de acordo com Folch et al. (14). Alíquotas de 10 ml foram tomadas e os lipídios totais determinados gravimetricamente.

Determinação de Umidade. Alíquotas de $1 \pm 0,5$ g foram secas em estufa a 110°C até peso constante, de acordo com metodologia da AOAC (15).

Determinação de Ácidos Graxos. O extrato lipídico foi seco em rota evaporador e $25 \pm 0,1$ mg do óleo obtido foram metiladas de acordo com Joseph and Ackman (16). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo gasoso (Varian 3400 CX), com detector por ionização em chama, injetor split, coluna CP-SIL 88 (100 m, 0,25 mm, 0,20 μm) e workstation star. As condições cromatográficas foram de acordo com Mazalli e Bragagnolo (17). Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos padrões com os da amostra e a quantificação foi realizada por padronização interna utilizando os ésteres metílicos do ácido tricosanóico e do ácido tridecanóico como padrões internos. Os resultados foram calculados em mg/100 g de amostra de acordo com a AOCS (18). O método foi validado utilizando padrão de referência certificado

de ovo em pó (SRM 8415, NIST), cujos resultados obtidos foram semelhantes ao especificado pelo material de referência.

Determinação Simultânea de Colesterol e Óxidos de Colesterol por CLAE-UV-IR (cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta e índice de refração). A separação e quantificação do colesterol e dos óxidos 19-OH, 20 α -OH, 22(R)-OH, 24(S)-OH, 22(S)-OH, 25-OH, 26-OH, 7-ceto, 7 β -OH, 7 α -OH, 5,6 α -epoxi, 5,6 β -epoxi e triol foi de acordo com Mazalli et al (19). Resumidamente, foi realizada a saponificação da amostra com KOH no escuro por 18 horas e a matéria insaponificável foi extraída 5 vezes com éter etílico. A fração do éter etílico foi concentrada e o colesterol e os óxidos de colesterol determinados por cromatografia líquida. Um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu foi utilizado com detectors UV (SPD-10AV_{vp}) e índice de refração (RID-10A) em série. A coluna analítica usada foi Nova Pack CN HP, 300 mm x 3.9 mm x 4 μ m (Waters, Millford, MA, USA) à temperatura de 32°C. A quantificação foi realizada por padronização externa e a confirmação do colesterol e dos óxidos de colesterol foi baseada na identificação do íon molecular e análise dos fragmentos usando cromatógrafo líquido com interface de ionização química à pressão atmosférica e detector de massas.

A recuperação do colesterol variou de 92 a 102% e dos óxidos de colesterol de 93 a 96%. Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com Long et al (20). Os LD encontrados para os óxidos de colesterol variaram de 0,002 a 0,031 μ g/g e para o colesterol o LD foi de 0,026 μ g/g. Os LQ encontrados para os óxidos de colesterol variaram de 0,002 a 0,079 μ g/g e para o colesterol o LQ foi de 0,088 μ g/g. O teor de colesterol do material de referência certificado (SRM 1846, NIST) foi de 19 $\pm$ 0,2 mg/g de gema, sendo igual ao valor referido no material de referência certificado.

Análises estatísticas. Foi realizada análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos de lipídios totais, umidade, colesterol, óxidos de colesterol e ácidos

graxos utilizando o software Statistic 5.5. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teores de Lipídios Totais e Umidade em Ovo em Pó. O teor de umidade dos ovos em pó não variou entre os lotes e as marcas durante a estocagem. Mesmo assim, os resultados de lipídios totais, ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol foram expressos na base seca. Os teores de lipídios totais entre os lotes foram semelhantes e expressos como média dos dois lotes analisados em triplicata (**Tabela 1**). Não houve redução significativa do teor de lipídios totais durante o período de armazenamento tanto na marca A quanto na marca B. Em ambas as marcas de ovo em pó, o teor de lipídios totais foi inferior e o teor de umidade foi semelhante aos valores relatados pelo USDA (2000) (21).

Composição de Ácidos Graxos em Ovo em Pó. Os ácidos graxos não apresentaram resultados significativamente diferentes entre lotes analisados tanto na marca A como na B e por isso foram expressos pela média do lote. A composição de ácidos graxos em ambas as marcas foi determinado no tempo zero e mensalmente até o tempo final de seus prazos de validade. De um total de 29 ácidos graxos identificados, os principais determinados nos ovos em pó das marca A e B foram: C14:0, C16:0, C18:0, C16:1 n7, C18:1 n9, C18:2 n6, C20:4 n6, C18:3 n3 e C18:1 n9 *trans*. Nos ovos não foram identificados os ácidos graxos C4:0; C6:0; C8:0; C10:0; C11:0; C12:0, C13:0 e C23:0 e os ácidos graxos C15:1 n9; C17:1 n7, C22:1 n9 e C22:2 n6 foram encontrados em quantidades de traços (menos que 1 mg/100 g).

Tabela 1. Valores médios de lipídios totais (g/100g, base seca) e umidade (g/100g) de ovo integral desidratado armazenados no escuro a 25°C e analisados no tempo zero e mensalmente até o prazo de validade de 6 meses para a marca A e 12 meses para a marca B.

TEMPO (meses)	LIPÍDIOS		UMIDADE	
	MARCA A	MARCA B	MARCA A	MARCA B
	MED $\pm$ DP ^a	MED $\pm$ DP ^a	MED $\pm$ DP ^a	MED $\pm$ DP ^a
0	35 $\pm$ 1 a	35 $\pm$ 1 a	2,8 $\pm$ 0,3 a	3,1 $\pm$ 0,6 a
1	35 $\pm$ 0 a	35 $\pm$ 1 a	3,1 $\pm$ 0,2 a	2,8 $\pm$ 0,3 a
2	35 $\pm$ 1 a	35 $\pm$ 0 a	2,9 $\pm$ 0,3 a	3,1 $\pm$ 0,1 a
3	35 $\pm$ 1 a	35 $\pm$ 1 a	2,7 $\pm$ 0,1 a	3,1 $\pm$ 0,2 a
4	36 $\pm$ 0 a	35 $\pm$ 1 a	3,0 $\pm$ 0,4 a	3,1 $\pm$ 0,2 a
5	35 $\pm$ 1 a	34 $\pm$ 1 a	2,9 $\pm$ 0,2 a	2,8 $\pm$ 0,3 a
6	34 $\pm$ 1 a	34 $\pm$ 1 a	3,1 $\pm$ 0,1 a	3,3 $\pm$ 0,3 a
7	-	35 $\pm$ 0 a	2,9 $\pm$ 0,0 a	3,2 $\pm$ 0,3 a
8	-	34 $\pm$ 0 a	-	2,8 $\pm$ 0,1 a
9	-	34 $\pm$ 1 a	-	2,8 $\pm$ 0,3 a
10	-	34 $\pm$ 1 a	-	2,8 $\pm$ 0,0 a
11	-	34 $\pm$ 1 a	-	3,1 $\pm$ 0,0 a
12	-	34 $\pm$ 1 a	-	2,8 $\pm$ 0,1 a

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos de mesma letra minúscula em cada coluna não diferem (P> 0.05).

Em geral, para os ácidos graxos saturados (**Tabela 2**) e ácidos graxos monoinsaturados (**Tabela 3**) não foram observadas diferenças significativas entre os meses de estocagem. Somente os ácidos graxos poliinsaturados C18:2 n6 e C20:4 n6 (**Tabela 4**) e ácidos graxos poliinsaturados C18:3 n3 e C22:6 n3 (**Tabela 5**) de ambas as marcas reduziram significativamente no período de estocagem. Na marca A e B, o C18:2 n6 reduziu até 3 meses e 6 meses e o C20:4 n6 reduziu até 3 meses e 6 meses, respectivamente. Na marca A, o C18:3 n3 e o C22:6 n3 reduziram até o mês final de estocagem. Na marca B, o C18:3 n3 reduziu até 12 meses e o C22:6 n3 até 6 meses.

Nas amostras de ovo em pó tanto na marca A, quanto na marca B, os ácidos graxos insaturados foram os majoritários (**Tabela 6**).

Tabela 2. Concentração de ácidos graxos saturados (mg/100g, base seca) em ovo integral desidratado armazenado a 25°C e analisado no tempo zero e mensalmente até o prazo de validade de 6 meses para a marca A e 12 meses para a marca B.

Marca A									
TEMPOS	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C21:0	C22:0	C24:0
0	947 ± 8 a	160 ± 3 a	5906 ± 44 a	414 ± 15 a	4049 ± 139 a	129 ± 4 a	178 ± 4 a	201 ± 3 a	64 ± 2 a
1	944 ± 6 a	158 ± 4 a	5935 ± 36 a	399 ± 18 a	3998 ± 115 a	131 ± 3 a	176 ± 2 a	200 ± 4 a	64 ± 3 a
2	948 ± 5 a	161 ± 3 a	5888 ± 45 a	421 ± 17 a	4015 ± 108 a	127 ± 4 a	180 ± 4 a	198 ± 4 a	60 ± 3 a
3	942 ± 5 a	160 ± 4 a	5889 ± 39 a	414 ± 4 a	4049 ± 100 a	129 ± 4 a	177 ± 4 a	200 ± 2 a	61 ± 2 a
4	943 ± 6 a	155 ± 5 a	5905 ± 52 a	425 ± 11 a	4102 ± 130 a	129 ± 4 a	181 ± 4 a	201 ± 3 a	64 ± 2 a
5	944 ± 4 a	162 ± 4 a	5913 ± 48 a	415 ± 12 a	4111 ± 132 a	130 ± 2 a	177 ± 2 a	204 ± 2 a	62 ± 3 a
6	941 ± 8 a	162 ± 2 a	5891 ± 31 a	409 ± 11 a	4171 ± 71 a	131 ± 4 a	178 ± 3 a	203 ± 3 a	64 ± 3 a
MED ± DP ^a	944 ± 2	160 ± 2	5904 ± 16	414 ± 8	4071 ± 56	129 ± 1	178 ± 2	201 ± 2	63 ± 2
Marca B									
TEMPOS	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C21:0	C22:0	C24:0
0	988 ± 6 a	162 ± 2 a	6150 ± 40 a	472 ± 5 a	4230 ± 70 a	292 ± 3 a	231 ± 4 a	103 ± 4 a	42 ± 1 a
1	990 ± 4 a	161 ± 2 a	6155 ± 45 a	469 ± 5 a	4234 ± 74 a	290 ± 3 a	228 ± 5 a	102 ± 5 a	40 ± 2 a
2	984 ± 6 a	160 ± 3 a	6152 ± 38 a	475 ± 4 a	4198 ± 75 a	290 ± 2 a	225 ± 6 a	100 ± 4 a	40 ± 2 a
3	988 ± 5 a	165 ± 3 a	6148 ± 45 a	471 ± 4 a	4241 ± 55 a	296 ± 4 a	232 ± 4 a	100 ± 4 a	41 ± 2 a
4	991 ± 6 a	164 ± 3 a	6170 ± 47 a	464 ± 7 a	4222 ± 78 a	292 ± 3 a	231 ± 4 a	104 ± 5 a	39 ± 2 a
5	984 ± 4 a	162 ± 3 a	6169 ± 42 a	470 ± 6 a	4196 ± 81 a	295 ± 3 a	228 ± 5 a	101 ± 4 a	41 ± 2 a
6	990 ± 4 a	165 ± 4 a	6160 ± 28 a	465 ± 5 a	4223 ± 62 a	296 ± 4 a	226 ± 5 a	103 ± 2 a	42 ± 2 a
7	991 ± 6 a	164 ± 3 a	6145 ± 32 a	467 ± 6 a	4235 ± 65 a	291 ± 4 a	225 ± 5 a	102 ± 3 a	40 ± 2 a
8	984 ± 7 a	160 ± 3 a	6148 ± 40 a	464 ± 6 a	4244 ± 68 a	291 ± 3 a	235 ± 3 a	102 ± 3 a	41 ± 1 a
9	990 ± 4 a	159 ± 4 a	6161 ± 36 a	463 ± 7 a	4242 ± 74 a	295 ± 4 a	229 ± 4 a	98 ± 3 a	40 ± 1 a
10	985 ± 6 a	159 ± 4 a	6154 ± 39 a	470 ± 6 a	4255 ± 55 a	292 ± 3 a	230 ± 4 a	100 ± 3 a	41 ± 2 a
11	983 ± 6 a	161 ± 3 a	6172 ± 51 a	472 ± 5 a	4224 ± 60 a	297 ± 5 a	230 ± 5 a	101 ± 4 a	40 ± 1 a
12	992 ± 4 a	158 ± 3 a	6161 ± 32 a	463 ± 8 a	4238 ± 58 a	293 ± 3 a	233 ± 8 a	102 ± 4 a	42 ± 2 a
MED ± DP ^a	988 ± 3	162 ± 2	6157 ± 9	468 ± 4	4229 ± 16	293 ± 2	229 ± 3	101 ± 2	41 ± 1

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos de mesma letra minúscula em cada coluna não diferem (P> 0.05).

Tabela 3. Concentração de ácidos graxos monoinsaturados (mg/100g, base seca) em ovo integral desidratado (marca A) armazenado a 25°C e analisado no tempo zero e mensalmente até o prazo de validade de 6 meses para a marca A e 12 meses para a marca B.

Marca A					
TEMPOS	C14:1 n9	C16:1 n7	C18:1 n9	C20:1 n9	C24:1 n9
0	130 ± 2 a	1153 ± 53 a	4804 ± 111 a	38 ± 2 a	59 ± 4 a
1	130 ± 3 a	1139 ± 50 a	4789 ± 95 a	36 ± 2 a	56 ± 2 a
2	128 ± 3 a	1168 ± 45 a	4825 ± 115 a	35 ± 1 a	56 ± 3 a
3	132 ± 1 a	1160 ± 39 a	4789 ± 126 a	36 ± 2 a	57 ± 1 a
4	130 ± 2 a	1142 ± 41 a	4832 ± 115 a	35 ± 2 a	55 ± 2 a
5	130 ± 2 a	1159 ± 52 a	4792 ± 98 a	33 ± 2 a	54 ± 2 a
6	128 ± 2 a	1150 ± 60 a	4815 ± 105 a	35 ± 2 a	55 ± 2 a
MED ± DP ^a	130 ± 1	1153 ± 10	4807 ± 16	35 ± 1	56 ± 2
Marca B					
TEMPOS	C14:1 n9	C16:1 n7	C18:1 n9	C20:1 n9	C24:1 n9
0	121 ± 5 a	1368 ± 65 a	8977 ± 454 a	81 ± 3 a	43 ± 2 a
1	117 ± 4 a	1422 ± 58 a	8679 ± 423 a	79 ± 2 a	43 ± 2 a
2	126 ± 4 a	1378 ± 46 a	8704 ± 434 a	80 ± 3 a	42 ± 1 a
3	118 ± 5 a	1391 ± 70 a	8529 ± 421 a	82 ± 2 a	44 ± 2 a
4	123 ± 3 a	1402 ± 54 a	8666 ± 359 a	80 ± 3 a	40 ± 2 a
5	121 ± 4 a	1359 ± 48 a	8821 ± 418 a	79 ± 2 a	44 ± 2 a
6	119 ± 4 a	1374 ± 85 a	8784 ± 443 a	79 ± 3 a	40 ± 1 a
7	125 ± 5 a	1415 ± 49 a	9201 ± 417 a	83 ± 3 a	41 ± 2 a
8	118 ± 4 a	1343 ± 41 a	8915 ± 392 a	83 ± 3 a	44 ± 2 a
9	123 ± 5 a	1395 ± 54 a	9222 ± 389 a	81 ± 3 a	41 ± 2 a
10	125 ± 4 a	1411 ± 62 a	8724 ± 367 a	79 ± 2 a	41 ± 2 a
11	119 ± 5 a	1409 ± 63 a	8888 ± 412 a	80 ± 3 a	43 ± 2 a
12	124 ± 1 a	1347 ± 52 a	8909 ± 479 a	78 ± 3 a	42 ± 1 a
MED ± DP ^a	121 ± 3	1386 ± 25	8848 ± 195	80 ± 2	42 ± 1

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos de mesma letra minúscula em cada coluna não diferem (P> 0.05).

Tabela 4. Concentração de ácidos graxos poliinsaturados n6 (mg/100g, base seca) em ovo integral desidratado (marca A) armazenado a 25°C e analisado no tempo zero e mensalmente até o prazo de validade de 6 meses para a marca A e 12 meses para a marca B

Marca A					
TEMPOS	C18:2 n6	C18:3 n6	C20:2 n6	C20:3 n6	C20:4 n6
0	3986 ± 166 a	34 ± 1 a	38 ± 1 a	33 ± 1 a	319 ± 15 a
1	3929 ± 131 a	33 ± 1 a	39 ± 2 a	32 ± 1 a	323 ± 15 a
2	3955 ± 158 a	34 ± 1 a	37 ± 2 a	33 ± 1 a	340 ± 18 a
3	3300 ± 60 b	33 ± 1 a	37 ± 2 a	32 ± 1 a	206 ± 8 b
4	3318 ± 74 b	34 ± 1 a	37 ± 2 a	32 ± 0 a	195 ± 11 b
5	3329 ± 52 b	33 ± 1 a	38 ± 2 a	33 ± 2 a	201 ± 15 b
6	3301 ± 62 b	34 ± 1 a	39 ± 1 a	32 ± 1 a	194 ± 17 b
MÉDIAS ± DP ^a	3588 ± 320	34 ± 0	38 ± 1	32 ± 0	254 ± 64
Marca B					
TEMPOS	C18:2 n6	C18:3 n6	C20:2 n6	C20:3 n6	C20:4 n6
0	3777 ± 226 a	26 ± 1 a	21 ± 1 a	22 ± 1 a	262 ± 7 a
1	3789 ± 211 a	26 ± 2 a	21 ± 0 a	20 ± 2 a	264 ± 9 a
2	3868 ± 187 a	25 ± 1 a	20 ± 1 a	20 ± 1 a	265 ± 9 a
3	3855 ± 225 a	25 ± 1 a	20 ± 1 a	21 ± 1 a	263 ± 9 a
4	3799 ± 242 a	24 ± 1 a	21 ± 0 a	21 ± 1 a	264 ± 8 a
5	3844 ± 121 a	25 ± 1 a	21 ± 1 a	20 ± 1 a	262 ± 8 a
6	3440 ± 75 ab	25 ± 1 a	20 ± 1 a	21 ± 1 a	234 ± 4 b
7	3432 ± 54 b	26 ± 2 a	20 ± 1 a	22 ± 1 a	232 ± 4 b
8	3411 ± 72 b	26 ± 1 a	20 ± 1 a	20 ± 1 a	236 ± 5 b
9	3369 ± 85 b	25 ± 1 a	21 ± 1 a	22 ± 1 a	235 ± 4 b
10	3401 ± 78 b	25 ± 1 a	20 ± 1 a	20 ± 1 a	237 ± 8 b
11	3396 ± 90 b	25 ± 1 a	20 ± 1 a	20 ± 1 a	233 ± 8 b
12	2845 ± 74 b	25 ± 2 a	20 ± 1 a	20 ± 1 a	214 ± 6 b
MÉDIAS ± DP ^a	3556 ± 287	25 ± 1	20 ± 0	21 ± 1	246 ± 17

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos de mesma letra minúscula em cada coluna não diferem (P> 0.05).

Tabela 5 Concentração de ácidos graxos poliinsaturados n3 e ácidos graxos trans (ovo integral desidratado (marca A) armazenado a 25°C e analisado no tempo zero e mensalmente até o prazo de validade de 6 meses para a marca A e 12 meses para a marca B

Marca A						
TEMPOS	C18:3 n3	C20:3 n3	C20:5 n3	C22:6 n3	C18:1 n9t	C18:2 n6t
0	455 ± 11 a	30 ± 1 a	41 ± 1 a	774 ± 33 a	1777 ± 177 a	31 ± 3 a
1	458 ± 10 a	32 ± 2 a	40 ± 2 a	800 ± 41 a	1645 ± 159 a	29 ± 2 a
2	460 ± 9 a	31 ± 1 a	41 ± 2 a	805 ± 39 a	1802 ± 132 a	30 ± 2 a
3	390 ± 9 b	24 ± 1 b	39 ± 1 a	775 ± 12 a	1735 ± 155 a	32 ± 2 a
4	394 ± 6 b	23 ± 1 b	36 ± 1 a	778 ± 18 a	1836 ± 160 a	28 ± 2 a
5	386 ± 5 b	23 ± 1 b	36 ± 1 a	764 ± 14 a	1713 ± 129 a	30 ± 2 a
6	321 ± 6 c	18 ± 1 b	37 ± 1 a	505 ± 10 b	1702 ± 134 a	30 ± 2 a
MÉDIAS ± DP ^a	409 ± 48	26 ± 5 b	39 ± 2	743 ± 98	1744 ± 60 a	30 ± 1
Marca B						
TEMPOS	C18:3 n3	C20:3 n3	C20:5 n3	C22:6 n3	C18:1 n9t	C18:2 n6t
0	672 ± 14 a	26 ± 1 a	32 ± 1 a	817 ± 46 a	2407 ± 80 a	44 ± 2 a
1	662 ± 16 a	26 ± 1 a	32 ± 1 a	815 ± 44 a	2330 ± 92 a	43 ± 2 a
2	675 ± 12 a	25 ± 2 a	31 ± 1 a	825 ± 46 a	2458 ± 85 a	44 ± 1 a
3	677 ± 15 a	26 ± 1 a	31 ± 1 a	829 ± 39 a	2401 ± 91 a	42 ± 2 a
4	649 ± 18 a	25 ± 1 a	31 ± 1 a	831 ± 43 a	2333 ± 75 a	42 ± 1 a
5	655 ± 17 a	25 ± 1 a	31 ± 1 a	818 ± 52 a	2356 ± 70 a	41 ± 2 a
6	607 ± 10 a	26 ± 1 a	31 ± 1 a	543 ± 32 b	2330 ± 76 a	43 ± 1 a
7	607 ± 11 a	26 ± 1 a	31 ± 1 a	532 ± 39 b	2410 ± 81 a	41 ± 2 a
8	600 ± 15 a	26 ± 1 a	31 ± 1 a	555 ± 44 b	2345 ± 73 a	44 ± 2 a
9	611 ± 11 a	25 ± 1 a	31 ± 1 a	561 ± 36 b	2444 ± 70 a	42 ± 2 a
10	615 ± 12 a	25 ± 1 a	31 ± 1 a	533 ± 48 b	2423 ± 68 a	41 ± 2 a
11	600 ± 16 a	26 ± 1 a	32 ± 1 a	496 ± 50 b	2331 ± 79 a	43 ± 2 a
12	507 ± 10 b	25 ± 1 a	31 ± 1 a	544 ± 45 b	2260 ± 79 a	43 ± 1 a
MÉDIAS ± DP ^a	626 ± 45	26 ± 0	31 ± 0	669 ± 143 b	2371 ± 55 a	43 ± 1

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos de mesma letra minúscula em cada coluna não diferem (P> 0.05).

Tabela 6. Concentração de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e ácidos graxos *trans* em ovo integral desidratado analisado no tempo zero (T0) e no último período de estocagem de 6 meses (Tf) para a marca A e 12 meses (Tf) para a marca B.

		MARCA A	MARCA B
		mg/100 g	
Saturados (SAT)	T0	12048	12670
	Tf	12150	12682
Monoinsaturados (MONO)	T0	6184	10590
	Tf	6183	10500
PUFA n6	T0	4410	4108
	Tf	3600	3124
PUFA n3	T0	1300	1547
	Tf	881	1107
Poliinsaturados (PUFA)	T0	5710	5655
	Tf	4481	4231
Insaturados	T0	11894	16245
	Tf	10664	14731
Ácidos graxos <i>trans</i>	T0	1808	2451
	Tf	1774	2303
Relação			
PUFA / SAT	T0	0,47	0,45
	Tf	0,37	0,33
PUFA n6 / PUFA n3	T0	3,39	2,71
	Tf	4,08	2,82

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos de mesma letra minúscula em cada coluna não diferem ($P > 0.05$).

Na marca A, no tempo zero, a concentração média de saturados, monoinsaturados e poliinsaturados foram 12,0, 6,2 e 5,7 g/100g de ovo, respectivamente. No tempo final de estocagem de 6 meses houve redução de 18% de poliinsaturados n6 e de 32% de poliinsaturados n3. Na marca B, a concentração média de saturados e de monoinsaturados foi superior e semelhante de poliinsaturados ao da marca A. No tempo final de estocagem de 12 meses a redução de poliinsaturados n6 foi de 24% e poliinsaturados n3 de 28%.

No presente estudo, as amostras foram embaladas a vácuo e armazenadas a 25 °C no escuro e mesmo assim ocorreram reduções significativas dos ácidos graxos poliinsaturados. No entanto, Guardiola et al. (22) observaram que ovos em pó embalados a vácuo em folhas de alumínio e sem exposição à luz evitaram a perda de muitos ácidos graxos poliinsaturados, especialmente C20:4 n6 e C22:6 n3.

Os ácidos graxos poliinsaturados apresentam baixa estabilidade oxidativa (23). Além disso, todo o material de origem biológica contém pequenas quantidades de metais de transição, como ferro e cobre, os quais não são completamente removidos pelo processamento de alimentos. Estes metais apresentam dois ou mais estados de valência, tornando-os susceptíveis à oxidação-redução e podem ainda abstrair hidrogênio de ácidos graxos, além de controlar a velocidade de autooxidação. No entanto, para que os metais tenham atividade devem estar no menor estado de valência que pode ser mantido por doadores de elétrons, como por exemplo, a cisteína presente nos ovos (24). Provavelmente, neste estudo, a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados também tenha sido favorecida pela presença de íons metais que são potentes pró-oxidantes, associada à baixa atividade de água do ovo em pó.

Altas concentrações de ácidos graxos *trans* foram observadas em ambas as marcas de ovo em pó (**Tabela 6**) devido, provavelmente, a presença de óxidos nítrico e nitroso produzidos no processo por “spray-dryer” pelo aquecimento direto do ar através da combustão de gás (25) que serviu de catalisador. Ácidos graxos insaturados *cis* quando aquecidos em presença de catalisadores, como óxidos de nitrogênio, são transformados em seus estereoisômeros *trans*. Além disso, o óxido nitroso é considerado um radical livre, iniciador da oxidação de lipídios insaturados em sistemas modelos (26).

Teores de Colesterol e Óxidos de Colesterol em Ovo em Pó. Não houve diferença significativa no teor de colesterol entre os tempos analisados durante a estocagem tanto para a marca A quanto para a marca B. No entanto, a

marca A apresentou resultados maiores que a marca B (**Tabela 7**). Os valores médios de colesterol da marca A foram de 1716 e da marca B de 1570 mg/100g de ovo sendo semelhantes e inferiores aos valores citados pelo USDA, respectivamente (21).

Foram identificados e quantificados em ambas as marcas de ovo em pó 5 óxidos: 7-ceto, 7 β -OH, 7 α -OH, 5,6 β -epoxi e 5,6 α -epoxi. Os óxidos de colesterol apresentaram resultados significativamente diferentes nos lotes analisados tanto na marca A quanto na B e por isso foram expressos em relação ao lote (**Tabelas 8 e 9**). No tempo zero, o teor dos óxidos de colesterol foi diferente entre os lotes e entre as marcas, os quais são, provavelmente, devido as diferenças nas temperaturas utilizadas durante o processamento e principalmente pelas diferenças nas concentrações de óxidos de nitrogênio produzidos na combustão do gás durante o processo de spray-drier. De acordo com Morgan e Armstrong (2) a quantidade dos óxidos de colesterol em ovo em pó aumenta proporcionalmente com a concentração de óxido nítrico produzido na combustão do gás no processo de “spray-drying”.

Em ambas as marcas, o teor dos óxidos de colesterol foi maior nos ovos dos lotes 1 e elevaram-se significativamente com o aumento do tempo de armazenamento. Na marca A (**Tabela 8**) no lote 1, o teor de 7-ceto aumentou do tempo 0 até 3 meses e no 7 α -OH e 5,6 β -epoxi o aumento foi até 4 e 5 meses, respectivamente. No lote 2, houve aumento do 7-ceto até 5 meses e do 7 α -OH e 5,6 β -epoxi até o tempo final de estocagem. Em ambos os lotes, o óxidos 7 β -OH e 5,6 α -epoxi aumentaram do tempo 0 até o tempo 5.

Na marca B (**Tabela 9**) no lote 1, o 7-ceto e o 5,6 α -epoxi aumentaram do tempo 0 até 9 meses e o 7 β -OH, 7 α -OH e 5,6 β -epoxi até 10 meses. No lote 2, o teor de 7-ceto, 7 β -OH e 5,6 α -epoxi aumentaram do tempo 0 até 11 meses e o 7 α -OH e 5,6 α -epoxi elevaram-se até o tempo final de armazenamento.

Pesquisas em amostras de ovo em pó também verificaram a presença dos óxidos 7-ceto, 7 α -OH, 7 β -OH, 5,6 β -epoxi e 5,6 α -epoxi (27, 28, 29). Além disso, quantidade de traços de 19-OH, 20-OH e 25-OH foram determinados em

Tabela. 7. Valores médios de colesterol (mg/100g, base seca) de ovo integral desidratado armazenados a 25 °C, no escuro e analisados no tempo zero e mensalmente até o prazo de validade de 6 meses para a marca A e 12 meses para a marca B.

	Marca A	Marca B
TEMPOS	MÉDIAS $\pm$ DP ^a	MÉDIAS $\pm$ DP ^a
0	1717 $\pm$ 3 a	1566 $\pm$ 111 a
1	1713 $\pm$ 3 a	1580 $\pm$ 111 a
2	1719 $\pm$ 6 a	1558 $\pm$ 88 a
3	1712 $\pm$ 11 a	1562 $\pm$ 103 a
4	1720 $\pm$ 2 a	1581 $\pm$ 100 a
5	1720 $\pm$ 7 a	1562 $\pm$ 123 a
6	1710 $\pm$ 13 a	1583 $\pm$ 109 a
7	-	1575 $\pm$ 84 a
8	-	1570 $\pm$ 109 a
9	-	1571 $\pm$ 119 a
10	-	1563 $\pm$ 84 a
11	-	1576 $\pm$ 92 a
12	-	1564 $\pm$ 78 a

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos de mesma letra minúscula em cada coluna não diferem (P> 0.05).

ovo em pó (3). No entanto, estes óxidos não foram confirmados por espectrometria de massas. Por outro lado, 25-OH e triol foram observados em amostras de ovo em pó que sofreram aquecimento (27).

Nos resultados deste estudo, todos os óxidos em ambos lotes e marcas de ovo em pó elevaram-se com o aumento do período de estocagem, o qual pode-se atribuir à temperatura de armazenamento e a baixa atividade de água do produto que favorece a oxidação lipídica. Soma-se ao fato que todos os ácidos graxos poliinsaturados reduziram suas concentrações durante a estocagem e, portanto, podem ter sofrido oxidação com a possível formação de radicais livres e peróxidos que podem ter contribuído para o aumento dos óxidos de colesterol.

Tabela 8. Valores médios dos óxidos ($\mu\text{g/g}$, base seca) de ovo integral desidratado (marca A) armazenadas a 25°C , no escuro e analisadas no tempo zero e por 6 períodos mensais.

LOTE 1					
TEMPOS	7-ceto MÉDIAS $\pm$ DP ^a	7 β -OH MÉDIAS $\pm$ DP ^a	7 α -OH MÉDIAS $\pm$ DP ^a	5,6 α -epoxi MÉDIAS $\pm$ DP ^a	5,6 β -epoxi MÉDIAS $\pm$ DP ^a
0	3 $\pm$ 0 c	6 $\pm$ 1 d	5 $\pm$ 1 d	10 $\pm$ 1 c	18 $\pm$ 2 e
1	4 $\pm$ 1 bc	8 $\pm$ 1 d	7 $\pm$ 1 cd	10 $\pm$ 1 c	20 $\pm$ 1 e
2	8 $\pm$ 1 b	14 $\pm$ 2 c	10 $\pm$ 1 c	11 $\pm$ 2 c	29 $\pm$ 2 d
3	17 $\pm$ 2 a	21 $\pm$ 2 b	17 $\pm$ 2 b	12 $\pm$ 1 c	31 $\pm$ 3 d
4	20 $\pm$ 2 a	24 $\pm$ 3 b	25 $\pm$ 2 a	16 $\pm$ 1 b	33 $\pm$ 3 cd
5	20 $\pm$ 3 a	30 $\pm$ 2 a	28 $\pm$ 2 a	18 $\pm$ 2 ab	38 $\pm$ 3 bc
6	21 $\pm$ 3 a	32 $\pm$ 3 a	28 $\pm$ 2 a	20 $\pm$ 2 a	43 $\pm$ 5 ab
MÉDIA	13 $\pm$ 8 a	19 $\pm$ 10 a	17 $\pm$ 10 a	14 $\pm$ 4 a	30 $\pm$ 9 a
LOTE 2					
TEMPOS	7-ceto MÉDIAS $\pm$ DP ^a	7 β -OH MÉDIAS $\pm$ DP ^a	7 α -OH MÉDIAS $\pm$ DP ^a	5,6 α -epoxi MÉDIAS $\pm$ DP ^a	5,6 β -epoxi MÉDIAS $\pm$ DP ^a
0	8 $\pm$ 1 d	3 $\pm$ 0 e	6 $\pm$ 1 d	5 $\pm$ 1 c	6 $\pm$ 1 g
1	10 $\pm$ 1 cd	3 $\pm$ 0 e	6 $\pm$ 1 d	8 $\pm$ 1 c	9 $\pm$ 1 fg
2	10 $\pm$ 1 cd	4 $\pm$ 1 de	7 $\pm$ 1 cd	8 $\pm$ 0 c	10 $\pm$ 1 ef
3	13 $\pm$ 1 bc	6 $\pm$ 1 d	10 $\pm$ 1c	11 $\pm$ 1 b	13 $\pm$ 1 de
4	13 $\pm$ 2 bc	10 $\pm$ 1 b	11 $\pm$ 1 c	11 $\pm$ 2 b	23 $\pm$ 2 c
5	16 $\pm$ 2 ab	15 $\pm$ 2 a	17 $\pm$ 2 b	14 $\pm$ 1 ab	29 $\pm$ 3 b
6	19 $\pm$ 2 a	16 $\pm$ 1 a	21 $\pm$ 3 a	16 $\pm$ 1 a	34 $\pm$ 3 a
MÉDIA	13 $\pm$ 4 a	8 $\pm$ 6 a	11 $\pm$ 6 b	10 $\pm$ 4 b	18 $\pm$ 11 b

^a Médias e desvio padrão de amostras em triplicata. Valores seguidos de mesma letra minúscula em cada coluna não diferem ($P > 0.05$).

Tabela 9. Valores médios dos óxidos ($\mu\text{g/g}$, base seca) de ovo integral desidratado (marca B) armazenadas a 25 °C, no escuro e analisadas no tempo zero e por 12 períodos mensais.

LOTE 1					
TEMPOS	7-ceto MED $\pm$ DP ^a	7 β -OH MED $\pm$ DP ^a	7 α -OH MED $\pm$ DP ^a	5,6 α -epoxi MED $\pm$ DP ^a	5,6 β -epoxi MED $\pm$ DP ^a
0	1 $\pm$ 0 e	6 $\pm$ 1 g	9 $\pm$ 1 g	7 $\pm$ 1 g	16 $\pm$ 2 d
1	2 $\pm$ 0 e	10 $\pm$ 1 fg	15 $\pm$ 2 f	11 $\pm$ 1 efg	17 $\pm$ 1 d
2	3 $\pm$ 0 e	17 $\pm$ 2 ef	16 $\pm$ 1 ef	10 $\pm$ 1 fg	18 $\pm$ 3 d
3	3 $\pm$ 0 e	18 $\pm$ 1 e	16 $\pm$ 1 ef	12 $\pm$ 1 defg	22 $\pm$ 2 cd
4	5 $\pm$ 0 e	20 $\pm$ 2 cde	18 $\pm$ 1 def	15 $\pm$ 1 def	28 $\pm$ 2 cd
5	11 $\pm$ 2 d	20 $\pm$ 2 cde	19 $\pm$ 2 def	16 $\pm$ 1 de	29 $\pm$ 2 cd
6	16 $\pm$ 1 c	26 $\pm$ 4 cde	19 $\pm$ 1 cdef	16 $\pm$ 1 cd	32 $\pm$ 3 c
7	21 $\pm$ 2 b	27 $\pm$ 4 cd	21 $\pm$ 2 cde	21 $\pm$ 2 c	36 $\pm$ 5 c
8	24 $\pm$ 3 b	29 $\pm$ 3 c	23 $\pm$ 3 cd	27 $\pm$ 4 b	53 $\pm$ 6 b
9	28 $\pm$ 2 ab	33 $\pm$ 3 bc	24 $\pm$ 3 bc	29 $\pm$ 1 ab	60 $\pm$ 10 b
10	28 $\pm$ 1 a	43 $\pm$ 3 a	30 $\pm$ 2 ab	33 $\pm$ 3 a	70 $\pm$ 7 ab
11	31 $\pm$ 2 a	45 $\pm$ 4 a	33 $\pm$ 3 a	34 $\pm$ 3 a	70 $\pm$ 11 ab
12	30 $\pm$ 3 a	51 $\pm$ 8 a	35 $\pm$ 4 a	34 $\pm$ 3 a	77 $\pm$ 6 a
MÉDIA	15 $\pm$ 12 a	26 $\pm$ 13 a	21 $\pm$ 8 a	20 $\pm$ 10 a	41 $\pm$ 22 a
LOTE 2					
TEMPOS	7-ceto MED $\pm$ DP ^a	7 β -OH MED $\pm$ DP ^a	7 α -OH MED $\pm$ DP ^a	5,6 α -epoxi MED $\pm$ DP ^a	5,6 β -epoxi MED $\pm$ DP ^a
0	2 $\pm$ 0 g	5 $\pm$ 1 h	4 $\pm$ 1 g	3 $\pm$ 0 e	9 $\pm$ 1 g
1	2 $\pm$ 0 g	5 $\pm$ 1 gh	5 $\pm$ 0 g	4 $\pm$ 1 e	12 $\pm$ 2 g
2	2 $\pm$ 0 g	7 $\pm$ 1 fg	6 $\pm$ 1 g	4 $\pm$ 1 e	13 $\pm$ 2 fg
3	3 $\pm$ 0 g	10 $\pm$ 1 e	7 $\pm$ 1 g	5 $\pm$ 1 e	13 $\pm$ 2 fg
4	3 $\pm$ 0 g	10 $\pm$ 1 e	12 $\pm$ 2 f	11 $\pm$ 2 d	17 $\pm$ 3 ef
5	6 $\pm$ 1 f	10 $\pm$ 1 e	14 $\pm$ 1 ef	14 $\pm$ 2 cd	23 $\pm$ 2 de
6	7 $\pm$ 1 ef	17 $\pm$ 2 d	15 $\pm$ 1 def	14 $\pm$ 1 c	23 $\pm$ 2 de
7	10 $\pm$ 1 d	18 $\pm$ 2 d	16 $\pm$ 2 de	15 $\pm$ 1 c	23 $\pm$ 2 de
8	13 $\pm$ 1 c	18 $\pm$ 1 d	18 $\pm$ 1 cd	15 $\pm$ 1 c	29 $\pm$ 2 cd
9	13 $\pm$ 1 c	24 $\pm$ 3 c	20 $\pm$ 2 c	21 $\pm$ 2 b	31 $\pm$ 4 c
10	15 $\pm$ 1 b	34 $\pm$ 3 b	20 $\pm$ 1 c	22 $\pm$ 2 b	33 $\pm$ 3 c
11	18 $\pm$ 1 a	41 $\pm$ 4 a	26 $\pm$ 1 b	23 $\pm$ 3 ab	40 $\pm$ 3 b
12	18 $\pm$ 1 a	40 $\pm$ 2 a	33 $\pm$ 4 a	27 $\pm$ 2 a	48 $\pm$ 6 a
MÉDIA	9 $\pm$ 6 b	18 $\pm$ 13 b	15 $\pm$ 9 b	14 $\pm$ 8 b	24 $\pm$ 12 b

^a Médias e desvio padrão de amostras em triplicata. Valores seguidos de mesma letra minúscula em cada coluna não diferem ($P > 0.05$).

Vários pesquisadores (2,3,28,30,31,32) também verificaram o aumento de óxidos de colesterol durante a estocagem de ovo em pó. Obara et al (3), verificaram que em amostras de ovo em pó armazenados à temperatura ambiente por 3 meses ocorreu um acúmulo de óxidos de colesterol devido a baixa atividade de água.

Na literatura existem poucos estudos que relacionam a formação de óxidos de colesterol com a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados em ovos. Whale et al. (33) verificaram que ocorreram mudanças marcantes na concentração de produtos de peroxidação lipídica (TBARS), ácidos graxos livres, oxidação de ácidos graxos e formação de óxidos de colesterol como 25-OH, 7-ceto, 7 β -OH, epóxidos e triol em ovos desidratados por “spray drier” estocados à temperatura ambiente e expostos ao ar e à luz por 18 meses.

Em conclusão, nas amostras de ovo em pó não houve formação de nenhum óxido durante a estocagem, além daqueles identificados no tempo zero. Por outro lado, os teores dos óxidos 7-ceto, 7 β -OH, 7 α -OH, 5,6 α -epoxi e 5,6 β -epoxi elevaram-se durante os períodos de armazenamento com simultânea diminuição dos ácidos graxos poliinsaturados. O teor de ácidos graxos *trans* foi elevado em ambas marcas de ovo em pó. A presença de elevados teores de óxidos de colesterol e ácidos graxos *trans* é preocupante e pode causar danos à saúde, uma vez que estes ovos são utilizados em vários produtos alimentícios amplamente consumidos pela população, principalmente a público infantil. No entanto, cabe lembrar que todos os resultados estão expressos em base seca e que a quantidade que será utilizada nos produtos alimentícios irá depender da composição do produto.

LITERATURA CITADA

- (1) Tsai, L.S.; Hudson, C.A. Cholesterol oxides in ovo em pó dry egg products: isolation and identification. *J. Food Sci.* **1984**, *49*, 1245-1248.
- (2) Morgan, J. N.; Armstrong, D. J. Quantification of cholesterol oxidation in egg yolk powder spray-dried with direc heating. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 43-45.

- (3) Obara, A.; Obiedzinski, M.; Kolczak, T. The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray and freeze-dried egg powders. *Food Chem.* **2006**, 95, 173-179.
- (4) Paniangvait, P.; King, A.J.; Jones, A.D.; German, B.G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.* **1995**, 60, 1159-1174.
- (5) Guardiola, F.; Codony, R.; Addis, P.B.; Rafecas, M. Biological effects of oxysterols: current status, *Food Chem. Toxic.* **1996**, 34, 193-211.
- (6) Sevanian, A.; Peterson, A.R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxic.* **1986**, 24, 1103-1110.
- (7) Imao, K.; Wang, H.; Komatsu, M.; Hiramatsu, M. Free radical scavenging activity of fermented papaya preparation and its effect on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in iron-induced epileptic foci of rats, *Mol. Biol. Int.* **1998**, 45, 11-23.
- (8) Hino, T.; Kawanish, S.; Yasui, H.; Oka, S.; Sakurai. HHTHQ na antilipid-peroxidative compound: its chemical and biochemical characterizations *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**, 1425, 47-60.
- (9) Peng, S.K.; Hu, B.; Morin, R.J. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. *J. Clin. Lab. Anal.* **1991**, 5, 144-152.
- (10) Clevidence, B.A.; Judd, J. T.; Schaefer, E.J.; Jenner, J. L.; Lichtenstein, A.H.; Muesing, R.A.; Wittes, J.; Sunkin, M.E. Plasma lipoprotein (a) levels in men and women consuming diets enriched in saturated, cis or trans-monounsaturated fatty acids. *Arterios. Thromb. Vasc. Bio.* **1997**, 17, 1657-1661.
- (11) Oh, K.; Hu, F.B.; Manson, J.E.; Stampfer, M.J.; Willett, W.C. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 Years of follow-up of the nurses' health study. *Am. J. Epid.* **2005**, 161, 672-679.
- (12) Lambertson, G. Trans fatty acids topic for lipidforum. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, 3, 196-197.
- (13) ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Available from: Internet: <http://www.anvisa.gov.br/rdc360>. 1993.

- (14) Folch, J.; Less, M.; Stanley, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, 226, 497.
- (15) AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th edn.(Arlington,ed.), AOAC International, Official Method 963. 33. **1997**.
- (16) Josepf, J.D.; Ackman, R.G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study, *J. AOAC Intern.* **1992**, 75, 488-506.
- (17) Mazalli, M.R.; Bragagnolo, N. Estudo comparativo entre métodos e validação do método para determinação de ácidos graxos em ovos. *Lipids*, submetido.
- (18) AOCS. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, 4th, edn. (Firestone, D., ed.), American Oil Chemists' Society Press, Champaign, Official Method Ce 1b-89. **1989**.
- (19) Mazalli, M.R.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlim, M.N.; Bragagnolo, N. HPLC Method for Quantification and characterization of cholesterol and its oxidation products in eggs. *Lipids*, submetido.
- (20) Long, G.L.; Winefordner, J.D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* **1983**, 55, 712-724.,
- (21) USDA. *Nutrient Database for Standard Reference*. Release 13, Poultry Products. Nutrient Data Laboratory, Agricultural Research Service: Beltsville, MD, **2000**; NDB nº 01133.
- (22) Guardiola, F.; Codony, R.; Manich, A.; Rafecas, M.; Boatella, J. Stability of polyunsaturated fatty acids in eggs powder processed and stored under various conditions, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 2254-2259.
- (23) Smith, L.L. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. *Lipids*. **1996**, 31, 453-487.
- (24) Gordon, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. *Antioxidantes in food pratical applications*. edited by Jan Porkorny, Nedyalka Yanishlieva and Michael Gordon, CRC Press, Washington, DC, **2001**.

- (25) Wheeler, W. H. Chemical and engineering aspects of low NO_x concentration. *Chem. Eng.* **1980**, 362, 693-699.
- (26) Pryor, W.A.; Lightsey, J.W. Mechanism of nitrogen dioxide reactions: Initiation of lipid peroxidation and production of nitrous acid. *Sci.* **1981**, 214, 435-437.
- (27) Fontana, A.; Antoniazzi, F.; Ciavatta, M. L.; Trivillone, E.; Cimino, G. H-NMR study of cholesterol autoxidation in egg powder and cookies exposed to adverse storage. *J. Food. Sci.* **1993**, 58, 1286-1290, .
- (28) Fontana, A.; Antoniazzi, F.; Cimino, G.; Mazza, G.; Trivillone, E.; Zalone, B. High-Resolution NMR detection study of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk. *J. Food. Sci.* **1992**, 57, 869-872.
- (29). Shu-Mei, L.; 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.* **1995**, 43, 1127-1131.
- (30) 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.* **1995**, 43, 1127-1131.
- (31) Huber, K. C.; Pike, O. A.; Huber, C. S. Antioxidant inhibition of cholesterol oxidation in a spray-dried food system during accelerated storage. *J. Food. Sci.* **1995**, 60, 909-916.
- (32) Zadeh, J. N.; Applqvist, L. A. Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J. Food Sci.* **1987**, 52, 57-67.
- (33) Whale, K.W.J.; Hoppe, P.P.; McIntosh, G. Effects of storage and various intrinsic vitamin E concentrations on lipid oxidation in dried egg powders. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, 61, 463-469.

CAPÍTULO 5

**EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E TEMPO DE
ESTOCAGEM NA FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL E
NA ALTERAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM
OVOS ENRIQUECIDOS COM ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3**

**EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO PARA A REVISTA
JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY**

RESUMO

Os teores de colesterol, óxidos de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos foram determinados em ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3. Dois lotes constituídos de 30 dúzias de ovos cada foram distribuídos do seguinte modo: 15 dúzias foram armazenadas à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro e 15 dúzias foram armazenadas a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 45 dias. As amostras foram analisadas no tempo zero e a cada 15 dias. Em cada tempo (0, 1, 2 e 3) e nas temperaturas de armazenamento (25°C e 5°C), foram separados 36 ovos que foram divididos em 3 dúzias de ovos. Uma das dúzias de ovos foi analisada na forma crua e as outras duas foram submetidas a dois tipos de tratamentos térmicos, cozimento e fritura. O teor de colesterol não foi reduzido durante os tempos de estocagem, mas foi menor nos ovos que foram fritos. As concentrações dos óxidos de colesterol 7-cetocolesterol, 7β -hidroxicolesterol e 7α -hidroxicolesterol elevaram-se durante o período de armazenamento e foram maiores nos ovos fritos. Os lipídios totais foram reduzidos nos ovos que sofreram fritura. Os principais ácidos graxos determinados nos ovos foram: C16:0, C18:0, C16:1 n7, C18:1 n9, C18:2 n6, C20:4 n6, C18:3 n3 e C22:6 n3. A maioria dos ácidos graxos apresentou valores menores nos ovos que receberam tratamentos térmicos e pequenas alterações foram observadas durante o armazenamento. As diferentes condições de estocagem somente influenciaram o óxido 7-cetocolesterol, que foi maior nos ovos armazenados a 25°C .

INTRODUÇÃO

Atualmente, nota-se um crescente interesse pelo consumo de alimentos que incluem na sua composição teores mais elevados de substâncias capazes de produzir benefícios à saúde, como os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (AGP-n3).

Estudos têm demonstrado efeitos benéficos de ácidos graxos poliinsaturados principalmente da família n3, como os ácido α -linolênico (LNA, C18:3 n3), ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 n3) e ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6 n3) sobre o nível de lipídios séricos e ação antitrombocitária sobre as plaquetas, tornando-os importantes na prevenção das doenças cardiovasculares (1,2). No entanto, as enzimas que originam os AGP-n3 através de processo de dessaturação e alongamentos são as mesmas que dão origem aos AGP-n6 havendo competição no metabolismo das duas series n-3 e n-6, e assim o excesso de n6 na dieta limita a formação dos AGP-n3 (3). Portanto, os benefícios dos AGP para a saúde humana dependem da ingestão balanceada destes ácidos, sendo geralmente aceito que a relação ideal n6/n3 é em torno de 4:1 (4).

A indústria nacional avícola, através do segmento de produção de ovos para consumo, consciente dos benefícios para a saúde humana dos AGP-n3 tem se esforçado na elaboração de produtos diferenciados com maior valor agregado, aumentando a oferta de ovos enriquecidos com AGP-n3. O aumento do conteúdo de AGP-n3 em ovos tem sido realizado através da suplementação da dieta das galinhas poedeiras com óleo de peixe, sementes vegetais ou óleos ricos em AGP-n3 (5,6,7,8). Entretanto, este aumento no grau de insaturação dos lipídios dos ovos pode conduzir ao aumento da susceptibilidade à oxidação. Por outro lado, é comum utilizar antioxidantes como a vitamina E para a estabilização oxidativa dos AGP nas rações das aves.

A oxidação lipídica é uma das principais reações que ocorre durante o aquecimento dos alimentos a altas temperaturas, na presença de metais,

sensibilizadores naturais e oxigênio. Desta forma, os ácidos graxos podem sofrer alterações durante o preparo térmico e a estocagem dos alimentos com conseqüente perda do valor nutricional e originar principalmente radicais livres que aceleram a formação de óxidos de colesterol.

Nos alimentos, os óxidos de colesterol são formados pelo processo de oxidação não enzimática ou autooxidação. A autooxidação ocorre através de reações em cadeia complexas baseadas na formação de radicais livres com oxigênio triplete e singlete (9). Os compostos predominantes são os originados a partir da oxidação do carbono C7, sendo eles: 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 5,6 α -epoxicolesterol, 5,6 β -epoxicolesterol, 7-cetocolesterol, colest-3,5-dien-7-ona e 3 β ,5 α ,6 β -colestanoltriol (10). Os óxidos de colesterol são considerados aterogênicos, citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (11,12).

Diante do exposto, é necessário realizar estudos sobre as alterações ocorridas nos teores de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol durante o preparo térmico e a estocagem dos alimentos. Desta forma, os objetivos deste estudo foram verificar o efeito do processamento térmico e tempo de estocagem na formação de óxidos de colesterol e na alteração da composição de ácidos graxos em ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3.

MATERIAL E MÉTODOS

Material. Os padrões de colesterol e óxidos de colesterol: colest-5-ene-3 β ,19-diol (19-OH), colest-5-ene-3 β ,20 α -diol (20 α -OH), colest-5-ene-3 β ,22[R]-diol (22(R)-OH), colest-5-ene-3 β ,22[S]-diol (22(S)-OH), colest-5-ene-3 β ,25diol (25-OH), 3 β -hidroxicolest-5-ene-7-one (7-ceto), colest-5-ene-3 β ,7 β -diol (7 β -OH), 5,6- α -epoxi-5 α -colest-3 β -ol (5,6 α -epoxi), 5,6- β -epoxi-5 β -colest-3 β -ol (5,6 β -epoxi) e colest-3 β ,5 α ,6 β -triol (triol) foram obtidos de Sigma (Miliford, MA, USA). Colest-5-ene-3 β ,24[S]-diol (24(S)-OH) e colest-5-ene-3 β ,7 α -diol (7 α -OH) foram adquiridos de Steraloids (Newport, RI, USA) e o padrão de

referência de ovo integral em pó (SRM 1846) de NIST (Gaithersburg, MD, USA). Um total de 37 padrões de éster metílico de ácidos graxos (FAME) do 4:0 ao 24:0 da marca Supelco (Bellefonte, PA, USA) foram usados para identificação. Os padrões internos utilizados para a quantificação foram os ésteres metílicos do ácido tricosanóico (23:0) e do ácido tridecanóico (13:0) da marca Sigma (Miliford, MA, USA) com 99% de pureza e o padrão de referência de ovo integral em pó (SRM 8415) de NIST (Gaithersburg, MD, USA).

Amostras. Dois lotes de ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3 foram comprados diretamente da granja no dia da postura para serem analisados no dia seguinte. Os ovos com casca do lote 1 pesaram em média 51,5 g e a gema 15,4 g e do lote 2 pesaram 50,5 g e a gema 15,4 g. Todos os lotes foram constituídos de 30 dúzias de ovos, distribuídas da seguinte forma: 15 dúzias foram armazenadas à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro e 15 dúzias foram armazenadas a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 45 dias. As amostras foram analisadas no tempo zero e a cada 15 dias. Em cada tempo (0, 1, 2 e 3) e nas temperaturas de armazenamento (25°C e 5°C), foram separados 36 ovos que foram divididos em 3 dúzias de ovos. Uma das dúzias de ovos foi analisada na forma crua e as outras duas foram submetidas a dois tipos de tratamentos térmicos, cozimento: 12 ovos foram cozidos durante 5 minutos após a ebulição da água (97°C) e fritura: 12 ovos foram fritos em óleo de soja à temperatura de 190°C , por 4 minutos, em um Master Grill (Britânia, Brasil). Em ambos os tipos de preparo térmico, assim como nos ovos crus, as gemas foram separadas e homogeneizadas e as amostras foram analisadas em triplicata.

Extração de Lipídios. Os lipídios foram extraídos de acordo com Folch et al. (13). Alíquotas de 10 ml foram tomadas e os lipídios totais determinados gravimetricamente.

Determinação de Umidade. Alíquotas de $1 \pm 0,5$ g foram secas em estufa a 110°C até peso constante, de acordo com metodologia da AOAC (14).

Determinação de Ácidos Graxos. Aproximadamente 25 mg de óleo obtido do extrato lipídico foi metilado de acordo com Joseph and Ackman (15). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo gasoso (Varian 3400 CX), com detector por ionização em chama, injetor split (1:50), coluna CP-SIL 88 (100 m, 0,25 mm, 0,20 μ m) e workstation star. As condições cromatográficas foram de acordo com Mazalli e Bragagnolo (16). Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos padrões com os da amostra e a quantificação foi realizada por padronização interna utilizando os ésteres metílicos do ácido tricosanóico (23:0) e do ácido tridecanóico (13:0) como padrões internos. Os resultados foram calculados em mg/100 g de amostra de acordo com a AOCS (17). O método foi validado utilizando padrão de referência certificado de ovo em pó (SRM 8415, NIST), cujos resultados foram semelhantes ao especificado pelo material de referência.

Determinação Simultânea de Colesterol e Óxidos de Colesterol por CLAE-UV-IR (cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta e índice de refração). As etapas pré cromatográficas e a separação e quantificação do colesterol e dos óxidos 19-OH, 20 α -OH, 22(R)-OH, 24(S)-OH, 22(S)-OH, 25-OH, 26-OH, 7-ceto, 7 β -OH, 7 α -OH, 5,6 α -epoxi, 5,6 β -epoxi e triol foi de acordo com Mazalli et al. (18). Um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu foi utilizado com detectores UV (SPD-10AV_{vp}) e índice de refração (RID-10A) em série. A coluna analítica usada foi Nova Pack CN HP, 300 mm x 3.9 mm x 4 μ m (Waters, Millford, MA, USA) à temperatura de 32°C. A quantificação foi realizada por padronização externa e cromatografia líquida acoplada com interface de ionização química à pressão atmosférica e detector de massas (APCI-MS) foi utilizado para a confirmação do colesterol e dos óxidos de colesterol.

A recuperação do colesterol variou de 92 a 102% e dos óxidos de colesterol de 93 a 96%. Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com Long et al. (19). Os LD encontrados para

os óxidos de colesterol variaram de 0,002 a 0,031 µg/g e para o colesterol o LD foi de 0,026 µg/g. Os LQ encontrados para os óxidos de colesterol variaram de 0,002 a 0,079 µg/g e para o colesterol o LQ foi de 0,088 ug/g. O teor de colesterol do material de referência certificado (SRM 1846, NIST) foi de 19,0 ± 0,2 mg/g de gema, sendo igual ao valor referido no material de referência certificado.

Determinação de Vitamina E. A determinação de vitamina E foi realizada de acordo com AOCS (20). Um cromatógrafo líquido (Perkin Elmer 250) foi utilizado acoplado a um detector de fluorescência (Shimadzu RF-10 AXL) com excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. A coluna utilizada foi Li Chrosorb Si 60 (250 x 4 mm, 5 µm, Merck), fase móvel de hexano:isopropanol (99:1) e fluxo de 1,1 ml/min.

Análises Estatísticas. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) dos dados obtidos de lipídios totais, umidade, colesterol, óxidos de colesterol e ácidos graxos utilizando o software Statistic 5.5 e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teores de Lipídios Totais e Umidade em Ovos Enriquecidos com Ácidos graxos Ômega-3. Na análise dos resultados de lipídios e umidade não houve interação significativa entre os fatores avaliados: preparo, armazenamento e tempo. O teor de lipídios totais foi significativamente menor somente nos ovos que foram fritos. O menor teor de umidade, em ordem crescente foi encontrado nas gemas fritas, cozidas e cruas (**Tabela 1**). Não houve diferença significativa entre as condições de armazenamento tanto para os lipídios quanto para a umidade.

No USDA (21), estão descritos valores inferiores de lipídios em gemas cruas e semelhantes em gemas cozidas e fritas, assim como, valores semelhantes de umidade em gemas cruas.

Composição de Ácidos Graxos em Ovos Enriquecidos com Ácidos graxos Ômega-3. Os principais ácidos graxos determinados nos ovos enriquecidos com ômega-3 de um total de 29 ácidos identificados, foram: C16:0, C18:0, C16:1 n7, C18:1 n9, C18:2 n6, C20:4 n6, C18:3 n3 e C22:6 n3. Nos ovos não foram identificados os ácidos graxos C4:0; C6:0; C8:0; C10:0; C11:0; C12:0, C13:0 e C23:0 e os ácidos graxos C21:0, C17:1 n7, C15:1 n9; C22:1 n9, C24:1 n9 e C20:3 n3 foram encontrados em quantidades de traços (menos que 1 mg/100 g).

Na análise dos resultados de todos os ácidos graxos não houve interação significativa entre os fatores avaliados. O tipo de preparo da amostra e o tempo de estocagem modificaram as concentrações de alguns ácidos graxos. Por outro lado, as condições de armazenamento, não influenciaram nos resultados dos ácidos graxos.

Para os ácidos graxos saturados (**Tabelas 2 a 3**), os teores de C14:0, C15:0, C16:0, C17:0 e C20:0 foram menores tanto nas amostras cozidas como nas fritas. Para os C18:0, C22:0 e C24:0 não houve diferença significativa entre amostras cruas e as que sofreram tratamentos térmicos. Os ácidos graxos C14:0, C17:0, C18:0, C20:0 e C24:0 reduziram até o tempo 2. O C16:0 a 5°C, reduziu até o tempo 2 e o C22:0 foi reduzido até o tempo 3. Apenas a concentração do ácido C15:0 não foi alterada pelos tempos de estocagem. Os ácidos graxos saturados são estáveis à oxidação, no entanto, sofrem oxidação quando aquecidos acima de 150°C. Estudos, citados por Crnjar (22), sugerem que o principal mecanismo de oxidação térmica dos ácidos graxos saturados presentes nos triacilglicerídeos envolve a formação de monohidroperóxidos e que o ataque do oxigênio ocorre em todos os grupos metil dos ácidos graxos saturados e nas posições α , β e α' das moléculas de glicerídeos ou na porção central da molécula.

Tabela 1. Valores médios de lipídios totais (g/100g de gema, base seca) e umidade (g/100g) em de ovos enriquecidos com ômega-3 armazenadas a 25 °C e a 5 °C do tempo zero e por mais 3 períodos quinzenais.

LOTE 1										
LIPÍDIOS						UMIDADE				
25 °C						25 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	30,52	30,64	29,79	29,75	30,18 ^A	51,11	50,41	48,35	50,37	50,06 ^A
Cozido	30,51	29,73	30,15	29,25	29,91 ^A	47,60	46,56	50,85	48,33	48,33 ^B
Frito	28,48	29,03	28,30	27,41	28,31 ^B	44,79	47,83	45,35	43,65	45,40 ^C
Média ^a	29,83 ^a	29,80 ^a	29,41 ^a	28,80 ^a	29,46 ^B	47,83 ^a	48,27 ^a	48,18 ^a	47,45 ^a	47,93 ^A
5 °C						5 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	30,52	30,35	30,07	31,30	30,56 ^A	51,11	50,68	49,88	51,12	50,69 ^A
Cozido	30,51	30,33	30,46	30,97	30,57 ^A	47,60	47,95	48,01	46,52	47,57 ^B
Frito	28,48	28,66	28,14	28,45	28,43 ^B	44,79	44,98	45,03	46,18	45,25 ^C
Média ^a	29,83 ^a	29,78 ^a	28,89 ^a	29,84 ^a	29,59 ^B	47,83 ^a	47,87 ^a	47,64 ^a	47,94 ^a	47,84 ^A
LOTE 2										
25 °C						25 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	32,88	32,28	32,09	32,08	32,79 ^A	51,21	50,32	50,65	48,75	50,23 ^A
Cozido	32,37	30,97	33,72	32,04	32,74 ^A	48,20	47,68	49,01	47,55	48,11 ^B
Frito	30,83	32,60	30,24	29,80	31,45 ^B	45,10	44,68	45,81	45,32	45,23 ^C
Média ^a	32,03 ^a	31,95 ^a	32,01 ^a	31,31 ^a	32,33 ^A	48,17 ^a	47,56 ^a	48,49 ^a	47,21 ^a	47,86 ^A
5 °C						5 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	32,88	32,32	32,17	32,99	32,96 ^A	51,21	51,20	50,10	50,23	50,68 ^A
Cozido	32,37	31,66	32,50	31,58	32,52 ^A	48,20	49,15	47,55	48,04	48,23 ^B
Frito	30,83	32,00	30,97	30,45	31,06 ^B	45,10	44,35	46,10	44,71	45,06 ^C
Média ^a	32,03 ^a	31,99 ^a	31,88 ^a	31,67 ^a	31,89 ^A	48,17 ^a	48,23 ^a	47,92 ^a	47,66 ^a	47,99 ^A

^aMédias de amostras em duplicata seguidas da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05).

Tabela 2. Concentração de ácidos graxos saturados (g/100g de gema, base seca) em ovos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 armazenados a 25 e 5 °C do tempo zero e por mais 3 períodos quinzenais.

ÁCIDOS GRAXOS															
C14:0						C15:0					C16:0				
25 °C						25 °C					25 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	0,65	0,54	0,53	0,48	0,55 ^A	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09 ^A	4,22	3,84	3,69	3,86	3,90 ^A
Frito	0,50	0,48	0,48	0,47	0,48 ^B	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07 ^{AB}	4,28	3,89	3,78	3,67	3,91 ^A
Cozido	0,53	0,53	0,44	0,31	0,45 ^B	0,08	0,05	0,06	0,06	0,06 ^B	4,00	3,19	3,13	3,24	3,39 ^B
Média ^a	0,56 ^a	0,52 ^{ab}	0,48 ^{bc}	0,42 ^c	0,50 ^A	0,08 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a	0,07 ^A	4,17 ^a	3,65 ^a	3,53 ^a	3,59 ^a	3,73 ^A
5 °C						5 °C					5 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	0,65	0,53	0,45	0,50	0,53 ^A	0,09	0,08	0,06	0,05	0,07 ^A	4,25	4,18	3,88	3,84	4,03 ^A
Frito	0,50	0,50	0,44	0,43	0,46 ^{AB}	0,07	0,08	0,07	0,06	0,07 ^A	4,11	3,77	3,74	3,01	3,66 ^{AB}
Cozido	0,53	0,38	0,39	0,35	0,41 ^B	0,08	0,07	0,07	0,06	0,07 ^A	3,92	3,60	3,55	3,05	3,53 ^B
Média ^a	0,56 ^a	0,47 ^{ab}	0,42 ^{bc}	0,43 ^c	0,47 ^A	0,08 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a	0,06 ^a	0,07 ^A	4,09 ^a	3,85 ^a	3,72 ^b	3,30 ^b	3,74 ^A
C17:0						C18:0					C20:0				
25 °C						25 °C					25 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	0,27	0,24	0,23	0,23	0,24 ^A	1,69	1,36	1,41	1,28	1,44 ^A	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09 ^A
Frito	0,25	0,24	0,24	0,23	0,24 ^A	1,48	1,39	1,28	1,24	1,34 ^A	0,01	0,08	0,07	0,07	0,08 ^{AB}
Cozido	0,24	0,20	0,14	0,14	0,18 ^B	1,59	1,35	1,31	1,25	1,38 ^A	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07 ^B
Média ^a	0,25 ^a	0,23 ^{ab}	0,20 ^b	0,20 ^b	0,22 ^A	1,59 ^a	1,35 ^b	1,31 ^{bc}	1,25 ^c	1,38 ^A	0,09 ^a	0,08 ^b	0,08 ^b	0,08 ^b	0,08 ^A
5 °C						5 °C					5 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	0,27	0,27	0,20	0,16	0,22 ^A	1,69	1,45	1,24	1,22	1,40 ^A	0,10	0,09	0,09	0,08	0,09 ^A
Frito	0,25	0,24	0,20	0,20	0,22 ^A	1,48	1,41	1,33	1,24	1,36 ^A	0,01	0,09	0,07	0,06	0,08 ^{AB}
Cozido	0,24	0,22	0,20	0,14	0,20 ^B	1,61	1,49	1,34	1,19	1,40 ^A	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07 ^B
Média ^a	0,25 ^a	0,24 ^{ab}	0,20 ^b	0,16 ^c	0,21 ^A	1,59 ^a	1,45 ^a	1,30 ^b	1,21 ^c	1,39 ^A	0,09 ^a	0,09 ^b	0,08 ^b	0,07 ^b	0,08 ^A

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05).

Tabela 3. Concentração de ácidos graxos saturados (g/100g de gema, base seca) em ovos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 armazenados a 25 e 5 °C do tempo zero e por mais 3 períodos quinzenais.

ÁCIDOS GRAXOS										
C22:0						C24:0				
25 °C						25 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	0,10	0,09	0,08	0,07	0,09 ^A	0,016	0,015	0,015	0,014	0,015 ^A
Frito	0,10	0,08	0,07	0,06	0,08 ^A	0,015	0,015	0,014	0,012	0,014 ^A
Cozido	0,10	0,08	0,08	0,05	0,08 ^A	0,015	0,014	0,013	0,011	0,014 ^A
Média ^a	0,10 ^a	0,08 ^b	0,08 ^b	0,06 ^c	0,08 ^A	0,015 ^a	0,015 ^a	0,014 ^{ab}	0,013 ^b	0,014 ^A
5 °C						5 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	0,10	0,09	0,09	0,07	0,09 ^A	0,016	0,015	0,015	0,014	0,015 ^A
Frito	0,10	0,08	0,08	0,07	0,08 ^A	0,015	0,015	0,015	0,013	0,015 ^A
Cozido	0,10	0,08	0,08	0,06	0,07 ^A	0,015	0,014	0,013	0,011	0,013 ^A
Média ^a	0,10 ^a	0,08 ^b	0,08 ^b	0,07 ^c	0,08 ^A	0,015 ^a	0,015 ^a	0,014 ^{ab}	0,012 ^b	0,014 ^A

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05).

Para os ácidos graxos monoinsaturados (**Tabela 4**), os ácidos graxos C14:1 n9 e C18:1 n9 foram menores nas amostras fritas e do C17:1 n7 nas cozidas. O C20:1 n9 foi menor tanto nas amostras que foram cozidas como nas que foram fritas. A concentração do C16:1 n7 foi semelhante nas amostras cruas, cozidas e fritas. Os C14:1 n9 e o C16:1 n7 reduziram até o tempo 1 e os C17:1 n7, C18:1 n9 e o C20:1 n9 até o tempo final de armazenamento.

Para os ácidos graxos poliinsaturados n6 (**Tabela 5**), os valores dos C18:2 n6, C18:3 n6 e C20:2 n6 foram menores nos ovos cozidos como nos fritos e dos C20:4 n6 e C20:3 n6 foram nos ovos fritos. A redução do C20:3 n6 ocorreu até o tempo 1, do C18:2 n6 e C20:2 n6 até o tempo 2 e dos C18:3 n6 e C20:4 n6 até o período final de estocagem.

Para os ácidos graxos poliinsaturados n3 (**Tabelas 6**), os ácidos C18:3 n3 e C20:5 n3 foram menores tanto nos ovos cozidos como nos que foram fritos. Para o C22:6 n3 o menor teor foi observado nos ovos fritos. Nos tempos de estocagem o C18:3 n3 foi reduzido até o tempo 1 e os C20:5 n3 e C22:6 n3 até o tempo 3.

Para os ácidos C18:1 n9t e C18:2 n6t (**Tabela 6**), não houve diferença entre os valores determinados nos ovos crus, cozidos ou fritos. O C18:1 n9t foi reduzido até o tempo 1 e o C18:2 n6t até o ultimo período de armazenamento.

Nos resultados da concentração média de ácidos graxos entre as gemas cruas, cozidas e fritas (**Tabela 7**) verificou-se que o preparo térmico dos ovos, assim como os tempos de estocagem, reduziram a concentração de monoinsaturados e poliinsaturados. Nahtigal et al. (23) verificaram perdas significativas no teor de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados quando ovos foram cozidos e fritos. Koo et al. (24) verificaram que quando ovos enriquecidos com DHA foram estocados a 4°C por 3 semanas, o conteúdo total de ácidos graxos foi maior durante as duas primeiras semanas e decresceu na terceira semana.

Tabela 4. Concentração de ácidos graxos monoinsaturados (g/100g de gema, base seca) em ovos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 armazenados a 25 e 5 °C do tempo zero e por mais 3 períodos quinzenais.

ÁCIDOS GRAXOS															
C14:1 n9						C16:1 n7					C17:1 n7				
25 °C						25 °C					25 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	0,11	0,10	0,11	0,09	0,10 ^A	5,25	4,99	4,27	3,90	4,60 ^A	0,24	0,17	0,14	0,10	0,16 ^A
Frito	0,09	0,08	0,08	0,06	0,08 ^B	4,92	4,58	4,19	3,82	4,38 ^A	0,20	0,16	0,15	0,10	0,15 ^{AB}
Cozido	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10 ^A	4,71	4,35	3,96	3,17	4,05 ^A	0,17	0,15	0,12	0,12	0,14 ^B
Média ^a	0,10 ^a	0,09 ^{ab}	0,09 ^{ab}	0,08 ^b	0,09 ^A	4,96 ^a	4,64 ^{ab}	4,14 ^b	3,63 ^b	4,34 ^A	0,20 ^a	0,16 ^b	0,14 ^b	0,11 ^c	0,15 ^A
5 °C						5 °C					5 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	0,11	0,09	0,09	0,09	0,10 ^A	5,25	4,93	3,95	3,27	4,35	0,24	0,16	0,13	0,08	0,15 ^A
Frito	0,09	0,08	0,08	0,06	0,08 ^B	4,92	4,19	4,37	3,30	4,19	0,20	0,16	0,12	0,09	0,14 ^{AB}
Cozido	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10 ^A	4,71	4,51	3,96	3,98	4,29	0,17	0,13	0,10	0,09	0,12 ^B
Média ^a	0,10 ^a	0,09 ^{ab}	0,09 ^{ab}	0,09 ^b	0,09 ^A	4,96 ^a	4,54 ^{ab}	4,09 ^b	3,52 ^b	4,28 ^A	0,20 ^a	0,15 ^b	0,12 ^c	0,09 ^d	0,14 ^A
C18:1 n9						C20:1 n9									
25 °C						25 °C					25 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	6,64	6,06	5,74	5,40	5,96 ^A	0,38	0,35	0,35	0,31	0,35 ^A					
Cozido	6,09	5,99	5,59	5,10	5,69 ^B	0,37	0,35	0,33	0,30	0,33 ^{AB}					
Frito	5,97	5,05	4,54	4,37	4,98 ^C	0,34	0,33	0,30	0,29	0,31 ^B					
Média ^a	6,23 ^a	5,70 ^b	5,29 ^c	4,96 ^d	5,54 ^A	0,36 ^a	0,34 ^{ab}	0,33 ^{bc}	0,30 ^c	0,33 ^A					
5 °C						5 °C					5 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	6,64	6,10	5,76	5,26	5,94 ^A	0,38	0,38	0,32	0,31	0,35 ^A					
Cozido	6,09	5,96	5,51	4,88	5,61 ^B	0,37	0,36	0,34	0,27	0,33 ^{AB}					
Frito	5,97	4,87	4,63	4,12	4,90 ^C	0,34	0,32	0,31	0,28	0,31 ^B					
Média	6,23 ^a	5,64 ^b	5,30 ^c	4,75 ^d	5,48 ^A	0,36 ^a	0,35 ^{ab}	0,32 ^{bc}	0,29 ^c	0,33 ^A					

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05).

Tabela 5. Concentração de ácidos graxos poliinsaturados n6 (g/100g de gema, base seca) em ovos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 armazenados a 25 e 5°C do tempo zero e por mais 3 períodos quinzenais.

ÁCIDOS GRAXOS															
C18:2 n6						C18:3 n6					C20:2 n6				
25°C						25°C					25°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	5,31	4,94	4,69	4,50	4,86 ^A	0,016	0,012	0,010	0,008	0,011 ^A	0,29	0,28	0,26	0,25	0,27 ^A
Frito	5,05	4,64	4,60	4,34	4,66 ^{AB}	0,012	0,012	0,009	0,007	0,010 ^{AB}	0,28	0,25	0,23	0,22	0,25 ^B
Cozido	5,13	4,43	4,08	4,43	4,51 ^B	0,010	0,010	0,010	0,009	0,010 ^B	0,25	0,25	0,22	0,20	0,23 ^B
Média ^a	5,16 ^a	4,67 ^b	4,46 ^{bc}	4,43 ^c	4,68 ^B	0,013 ^a	0,011 ^a	0,010 ^a	0,008 ^b	0,010 ^A	0,27 ^a	0,26 ^a	0,24 ^{ab}	0,22 ^b	0,25 ^A
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	5,31	4,64	4,60	4,34	4,72 ^A	0,016	0,015	0,011	0,008	0,013 ^A	0,29	0,26	0,22	0,21	0,24 ^A
Frito	5,05	4,75	4,34	3,86	4,50 ^{AB}	0,012	0,011	0,009	0,007	0,010 ^B	0,28	0,25	0,22	0,21	0,24 ^{AB}
Cozido	5,13	4,81	4,43	2,92	4,32 ^B	0,010	0,008	0,009	0,009	0,009 ^B	0,25	0,24	0,23	0,19	0,23 ^B
Média ^a	5,16 ^a	4,76 ^b	4,46 ^{bc}	3,71 ^c	4,51 ^B	0,013 ^a	0,011 ^a	0,010 ^a	0,008 ^b	0,010 ^A	0,27 ^a	0,25 ^a	0,22 ^{ab}	0,20 ^b	0,24 ^A
C20:3 n6						C20:4 n6									
5°C						5°C									
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média					
Cru	0,025	0,021	0,021	0,020	0,022 ^A	0,20	0,17	0,14	0,10	0,15 ^A					
Cozido	0,022	0,019	0,018	0,017	0,019 ^A	0,15	0,14	0,14	0,13	0,14 ^{AB}					
Frito	0,019	0,019	0,014	0,009	0,015 ^B	0,13	0,10	0,09	0,07	0,01 ^B					
Média ^a	0,022 ^a	0,020 ^{ab}	0,018 ^{ab}	0,015 ^b	0,019 ^A	0,16 ^a	0,14 ^{ab}	0,12 ^b	0,10 ^c	0,13 ^A					
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média					
Cru	0,025	0,020	0,020	0,013	0,019 ^A	0,20	0,12	0,10	0,10	0,13 ^A					
Cozido	0,022	0,020	0,020	0,017	0,020 ^A	0,15	0,14	0,13	0,10	0,13 ^A					
Frito	0,019	0,016	0,014	0,014	0,016 ^B	0,13	0,10	0,10	0,08	0,10 ^B					
Média ^a	0,022 ^a	0,019 ^{ab}	0,018 ^{ab}	0,015 ^b	0,018 ^A	0,16 ^a	0,12 ^{ab}	0,11 ^b	0,09 ^c	0,12 ^A					

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05).

Tabela 6. Concentração de ácidos graxos poliinsaturados n3 e ácidos graxos *trans* (g/100g de gema, base seca) em ovos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 armazenados a 25 e 5 °C do tempo zero e por mais 3 períodos quinzenais.

ÁCIDOS GRAXOS															
C18:3 n3						C20:5 n3					C22:6 n3				
25 °C						25 °C					25 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	1,82	1,69	1,65	1,56	1,68 ^A	0,014	0,012	0,010	0,010	0,011 ^A	0,26	0,24	0,23	0,19	0,23 ^A
Cozido	1,59	1,36	1,24	1,15	1,33 ^{BC}	0,010	0,009	0,008	0,005	0,008 ^B	0,22	0,21	0,15	0,12	0,17 ^B
Frito	0,83	0,71	0,53	0,57	0,66 ^C	0,011	0,010	0,008	0,004	0,008 ^B	0,14	0,13	0,13	0,12	0,13 ^C
Média ^a	1,41 ^a	1,25 ^{ab}	1,14 ^b	1,09 ^b	1,22 ^A	0,012 ^a	0,010 ^{ab}	0,009 ^b	0,006 ^c	0,009 ^A	0,21 ^a	0,19 ^{ab}	0,17 ^b	0,14 ^c	0,18 ^A
5 °C						5 °C					5 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	1,82	1,67	1,60	1,16	1,56 ^A	0,014	0,012	0,012	0,011	0,012 ^A	0,26	0,21	0,20	0,20	0,22 ^A
Cozido	1,59	1,33	1,27	1,10	1,32 ^{BC}	0,010	0,009	0,008	0,005	0,008 ^B	0,22	0,21	0,14	0,12	0,17 ^B
Frito	1,09	1,01	0,93	0,99	1,00 ^C	0,011	0,010	0,006	0,004	0,007 ^B	0,14	0,12	0,12	0,11	0,12 ^C
Média ^a	1,50 ^a	1,34 ^{ab}	1,27 ^b	1,08 ^b	1,29 ^A	0,012 ^a	0,010 ^{ab}	0,009 ^b	0,006 ^c	0,009 ^A	0,21 ^a	0,18 ^{ab}	0,15 ^{bc}	0,15 ^c	0,17 ^A
C18:1 n9t						C18:2 n6t ^b									
25 °C						25 °C									
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média					
Cru	0,034	0,027	0,024	0,020	0,026 ^A	0,013	0,012	0,010	0,009	0,011 ^A					
Cozido	0,023	0,022	0,021	0,021	0,022 ^A	0,010	0,009	0,009	0,008	0,009 ^A					
Frito	0,019	0,023	0,018	0,015	0,020 ^A	0,010	0,010	0,009	0,006	0,009 ^A					
Média ^a	0,025 ^a	0,023 ^{ab}	0,021 ^{ab}	0,019 ^b	0,023 ^A	0,011 ^a	0,011 ^{ab}	0,010 ^{ab}	0,008 ^b	0,010 ^A					
5 °C						5 °C									
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a					
Cru	0,034	0,031	0,020	0,019	0,026 ^A	0,013	0,013	0,011	0,010	0,011 ^A					
Cozido	0,023	0,023	0,021	0,018	0,021 ^A	0,010	0,010	0,009	0,008	0,009 ^A					
Frito	0,019	0,018	0,020	0,015	0,018 ^A	0,010	0,009	0,009	0,007	0,009 ^A					
Média ^a	0,025 ^a	0,024 ^{ab}	0,019 ^{ab}	0,017 ^b	0,022 ^A	0,011 ^a	0,011 ^{ab}	0,010 ^{ab}	0,008 ^b	0,010 ^A					

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05), ^b (9c, 12t + 9t, 12c

Teores de Vitamina E em Ovos Enriquecidos com ácidos graxos Ômega-

3. Os teores de vitamina E foram determinados uma vez que, sendo as aves alimentadas com dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, é importante a adição de antioxidantes como a vitamina E para aumentar a estabilidade oxidativa destes ácidos, e, portanto torna-se necessário conhecer os níveis de vitamina E nos ovos. O menor teor de vitamina E foi observado nos ovos fritos e não houve redução em função do tempo de estocagem. Meluzzi et al. (25) também observaram que a concentração de vitamina E não foi alterada tanto nos ovos enriquecidos com ômega-3 e vitamina E, estocados à temperatura ambiente de 20 a 25 °C por 28 dias como nos ovos de 1 dia.

O valor médio de vitamina E nos ovos crus, no lote 1 foi de 12,04 e no lote 2 de 10,89 mg/100g de ovo (**Tabela 8**). Os valores obtidos são elevados, considerando-se que por ovo o valor médio de vitamina E variou de 5,00 a 5,53 mg e segundo USDA (21), o valor de vitamina E em ovos de 50 g é de 0,525 mg. Mazalli et al. (26) encontraram valores semelhantes de vitamina E em ovos de poedeiras alimentadas com diferentes fontes de ácidos graxos (óleo de peixe, linhaça, canola, girassol e linhaça integral moída) e níveis de vitamina E (50 e 100 UI/kg de ração).

Teores de Colesterol e Óxidos de Colesterol em Ovos Enriquecidos com ácidos graxos Ômega-3. Nos resultados de colesterol, não houve interação significativa entre os fatores avaliados e não ocorreu redução durante a estocagem dos ovos. Mas houve diferença no teor de colesterol entre os lotes e nas amostras cruas em relação as que foram submetidas aos tratamentos térmicos (**Tabela 9**).

Os valores superiores de colesterol foram no lote 2 e nas amostras cruas. No lote 1, o menor teor de colesterol foi nas amostras fritas e no lote 2, não houve diferença significativa entre as amostras cruas e cozidas. Bragagnolo e Rodriguez-Amaya (27) também não encontraram diferença no teor de colesterol em ovos crus e cozidos.

Tabela 7. Concentração média de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e ácidos graxos *trans* em gema de ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3 analisada no tempo zero (T0) e no último período de estocagem de 45 dias (T3) armazenados a 25 e 5 °C.

		CRU	COZIDO	FRITO
g / 100g		MED ± DP ^a	MED ± DP ^a	MED ± DP ^a
Saturados	T0	7,14 ± 0,13	6,64 ± 0,08	6,75 ± 0,25
	T3	6,00 ± 0,01	5,05 ± 0,01	5,44 ± 0,00
Monoinsat.	T0	12,83 ± 1,14	11,58 ± 0,78	12,15 ± 1,77
	T3	9,97 ± 0,67	8,07 ± 0,01	8,89 ± 0,01
PUFA n6	T0	6,14 ± 0,42	5,65 ± 0,16	5,94 ± 0,61
	T3	5,13 ± 0,50	3,96 ± 0,01	4,46 ± 0,01
PUFA n3	T0	2,04 ± 0,32	1,77 ± 0,50	1,21 ± 0,38
	T3	1,54 ± 0,38	0,62 ± 0,01	0,61 ± 0,01
PUFA	T0	8,17 ± 0,74	7,43 ± 0,63	7,15 ± 1,00
	T3	6,67 ± 0,89	4,58 ± 0,01	5,06 ± 0,01
Ág <i>trans</i>	T0	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	T3	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01
Insaturados	T0	21,00 ± 1,87	19,00 ± 1,41	19,30 ± 2,76
	T3	16,64 ± 1,56	12,65 ± 0,01	13,96 ± 0,01
Relação				
n6/n3	T0	3,04 ± 0,27	3,29 ± 0,79	5,08 ± 1,10
	T3	3,39 ± 0,51	6,44 ± 0,07	7,31 ± 0,18
PUFA/SAT	T0	1,15 ± 0,12	1,12 ± 0,08	1,06 ± 0,11
	T3	1,11 ± 0,15	0,91 ± 0,00	0,93 ± 0,00

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata)

Os valores médios de colesterol determinados em amostras cruas foram inferiores aos valores citados pelo USDA (21). Resultados semelhantes de colesterol em ovo cru foram encontrados em outros trabalhos (27,28).

Os óxidos de colesterol encontrados nos ovos dos lotes 1 e 2 foram: 7-ceto, 7β-OH, e 7α-OH. Os maiores teores dos óxidos foram observados no lote 2 e nas amostras que sofreram fritura. Apenas para o 7-ceto não houve diferença significativa entre os lotes (**Tabela 10**).

Tabela 8. Valores médios de vitamina E (mg/100g de gema, base seca) de ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3, armazenados a 25°C e a 5°C e analisados no tempo zero e no tempo 3 de estocagem (45 dias).

Vitamina E (Lote 1)				
	Preparo	Tempo 0	Tempo 3	Média ^a
25°C	Cru	12,22	11,47	11,85 ^A
	Cozido	11,51	11,60	11,55 ^{AB}
	Frito	10,67	10,95	10,81 ^B
Média		11,47 ^a	11,34 ^a	11,40 ^A
5°C	Cru	12,22	12,24	12,23 ^A
	Cozido	11,51	11,09	11,30 ^B
	Frito	10,67	11,39	11,03 ^B
Média ^a		11,47 ^a	11,57 ^a	11,52 ^A
Vitamina E (Lote 2)				
	Preparo	Tempo 0	Tempo 3	Média ^a
25°C	Cru	11,01	11,03	11,02 ^A
	Cozido	10,02	11,40	10,71 ^A
	Frito	9,96	9,03	9,49 ^B
Média		10,33 ^a	10,49 ^a	10,41 ^A
5°C	Cru	11,01	10,54	10,77 ^A
	Cozido	10,02	10,65	10,33 ^{AB}
	Frito	9,96	10,00	9,98 ^B
Média ^a		10,33 ^a	10,40 ^a	10,36 ^A

^aMédias de amostras em triplicata seguidas da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si a (P> 0,05).

Entre os fatores avaliados: preparo, armazenamento e tempo houve interação significativa. As condições de armazenamento não influenciaram os óxidos 7 β -OH e 7 α -OH. Mas o teor de 7-ceto, no lote 1, foi maior nas amostras que foram armazenadas a 25°C.

Nos tempos de armazenamento, em ambos os lotes, tanto a 25°C, quanto a 5°C, houve aumento da quantidade dos óxidos 7-ceto e 7 α -OH do tempo zero até o tempo 3 nas gemas cruas e nas que sofreram processamento térmico. Por outro lado, o teor de 7 β -OH foi reduzido até o tempo 1, no lote 1, em ambas condições de armazenamento, nas amostras cozidas e cruas. Somente nas amostras fritas, a quantidade deste óxido aumentou com o aumento do

Tabela 9. Valores médios de colesterol (mg/100g de gema, base seca) de ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3 crus, cozidos e fritos armazenados a 25 °C e a 5 °C, analisados no tempo zero e quinzenalmente.

Colesterol (Lote 1)					
25 °C					
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	2401	2426	2423	2434	2421 ^A
Cozido	2350	2349	2341	2344	2346 ^B
Frito	2213	2190	2198	2211	2203 ^C
Média ^a	2321 ^a	2322 ^a	2321 ^a	2330 ^a	2323 ^B
5 °C					
Cru	2401	2430	2417	2441	2423 ^A
Cozido	2350	2342	2331	2347	2342 ^B
Frito	2213	2214	2210	2213	2212 ^C
Média ^a	2321 ^a	2328 ^a	2319 ^a	2334 ^a	2326 ^B
Colesterol (Lote 2)					
25 °C					
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	2546	2536	2522	2512	2529 ^A
Cozido	2502	2499	2501	2510	2503 ^A
Frito	2444	2437	2429	2455	2441 ^B
Média ^a	2497 ^a	2490 ^a	2484 ^a	2492 ^a	2491 ^A
5 °C					
Cru	2546	2540	2510	2521	2529 ^A
Cozido	2502	2504	2490	2515	2503 ^A
Frito	2444	2428	2439	2440	2438 ^B
Média ^a	2497 ^a	2491 ^a	2480 ^a	2492 ^a	2490 ^A

^a Médias de amostras em triplicata seguidas da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si a (P> 0,05).

tempo de estocagem. No lote 2, nas amostras cruas ocorreu redução de 7 β -OH no maior tempo de armazenamento.

No lote 1, o decréscimo médio de colesterol dos ovos crus em relação aos que foram fritos foi de 9% e no lote 2, de 4%. Enquanto que na média geral, os teores dos óxidos 7 α -OH, 7-ceto e 7 β -OH aumentaram em 52, 81 e 82% nos ovos fritos em relação aos ovos crus, respectivamente.

Tabela 10. Valores médios dos óxidos de colesterol ($\mu\text{g/g}$ de gema, base seca) em ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3 armazenados a 25°C e a 5°C do tempo zero e por mais 3 períodos quinzenais.

LOTE 1															
7-ceto						7 β -OH					7 α -OH				
25°C						25°C					25°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Frito	0,44 ^{Ac}	1,94 ^{Ab}	3,15 ^{Aa}	3,61 ^{Aa}	2,21 ^A	6,55 ^{Ac}	7,44 ^{Abc}	8,96 ^{Ab}	13,28 ^{Aa}	9,05 ^A	8,80 ^{Ab}	9,72 ^{Ab}	14,55 ^{Aa}	16,92 ^{Aa}	12,50 ^A
Cozido	0,16 ^{Ac}	0,39 ^{Bc}	1,66 ^{Bb}	3,78 ^{Aa}	1,57 ^B	5,50 ^{Aa}	0,92 ^{Bc}	1,31 ^{Bbc}	1,50 ^{Bb}	2,30 ^B	4,09 ^{Bb}	4,38 ^{Bb}	7,08 ^{Ba}	8,47 ^{Ba}	6,01 ^B
Cru	0,00 ^{Bc}	0,86 ^{Bb}	0,98 ^{Bab}	1,49 ^{Ba}	0,83 ^C	3,02 ^{Ba}	0,61 ^{Bbc}	0,86 ^{Bb}	0,58 ^{Bc}	1,27 ^C	3,88 ^{Bc}	4,17 ^{Bbc}	4,31 ^{Cb}	8,98 ^{Ba}	5,34 ^B
Média ^a	0,20 ^d	1,06 ^c	1,93 ^b	2,96 ^a	1,54 ^A	5,03 ^a	2,99 ^b	3,71 ^b	5,11 ^B	4,21 ^B	5,59 ^c	6,09 ^c	8,65 ^b	11,46 ^a	7,95 ^B
5°C						5°C					5°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Frito	0,44 ^{Ac}	0,44 ^{Ac}	1,86 ^{Ab}	5,06 ^{Aa}	1,95 ^A	6,55 ^{Abc}	7,22 ^{Ab}	6,50 ^{Ac}	11,29 ^{Aa}	7,90 ^A	8,80 ^{Ac}	11,7 ^{Ab}	12,83 ^{Ab}	16,50 ^{Aa}	12,47 ^A
Cozido	0,16 ^{Bc}	0,23 ^{Bb}	0,29 ^{Bb}	0,53 ^{Ba}	0,30 ^B	5,50 ^{Aa}	1,05 ^{Bc}	1,45 ^{Bb}	1,36 ^{Bb}	2,34 ^B	4,09 ^{Bc}	4,93 ^{Bbc}	6,19 ^{Bb}	9,94 ^{Ba}	6,29 ^B
Cru	0,00 ^{Bd}	0,13 ^{Bc}	0,23 ^{Bb}	0,33 ^{Ca}	0,17 ^B	3,02 ^{Ba}	0,87 ^{Bc}	1,04 ^{Bb}	2,44 ^{Ba}	1,84 ^C	3,88 ^{Bc}	4,15 ^{Bbc}	6,98 ^{Bb}	11,21 ^{Ba}	6,55 ^B
Média ^a	0,20 ^c	0,27 ^c	0,79 ^b	1,97 ^a	0,81 ^B	5,03 ^a	3,05 ^b	3,00 ^b	5,03 ^B	4,03 ^B	5,59 ^c	6,95 ^c	8,66 ^b	12,55 ^a	8,43 ^B
LOTE 2															
25°C						25°C					25°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Frito	1,23 ^{Ac}	2,23 ^{Ab}	2,78 ^{Ab}	4,56 ^{Aa}	2,70 ^A	8,25 ^{Ac}	8,41 ^{Abc}	9,02 ^{Ab}	16,65 ^{Aa}	10,58 ^A	10,23 ^{Ab}	10,69 ^{Ab}	13,58 ^{Aa}	17,01 ^{Aa}	12,87 ^A
Cozido	0,87 ^{Ac}	1,02 ^{Bb}	1,10 ^{Bab}	1,25 ^{Ba}	1,06 ^B	2,12 ^{Cb}	1,59 ^{Bc}	2,15 ^{Bb}	4,97 ^{Ba}	2,71 ^B	3,98 ^{Bc}	4,12 ^{Bc}	8,25 ^{Bb}	11,21 ^{Aa}	6,89 ^B
Cru	0,00 ^{Bc}	0,39 ^{Cb}	0,41 ^{Cab}	0,68 ^{Ca}	0,37 ^C	4,31 ^{Ba}	1,88 ^{Bb}	0,64 ^{Cc}	0,68 ^{Cc}	1,88 ^C	4,08 ^{Bb}	4,25 ^{Bb}	6,33 ^{Ba}	7,96 ^{Ba}	5,65 ^B
Média ^a	0,70 ^d	1,21 ^c	1,43 ^b	2,16 ^a	1,37 ^A	4,89 ^b	2,71 ^c	3,94 ^b	7,43 ^A	5,02 ^A	6,09 ^c	6,35 ^c	9,39 ^b	12,06 ^a	8,47 ^A
5°C						5°C					5°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Frito	1,23 ^{Ac}	2,21 ^{Ab}	2,84 ^{Ab}	5,20 ^{Aa}	2,87 ^A	8,25 ^{Ac}	9,01 ^{Ab}	9,32 ^{Ab}	16,41 ^{Aa}	10,74 ^A	10,23 ^{Ab}	10,56 ^{Ab}	14,37 ^{Aa}	18,42 ^{Aa}	13,38 ^A
Cozido	0,87 ^{Ab}	0,98 ^{Bb}	1,26 ^{Ba}	1,52 ^{Ba}	1,16 ^B	2,12 ^{Cb}	1,33 ^{Cc}	2,69 ^{Bb}	5,02 ^{Ba}	2,79 ^B	3,98 ^{Bb}	3,96 ^{Bb}	9,51 ^{Ba}	12,84 ^{Ba}	7,57 ^B
Cru	0,00 ^{Bc}	0,41 ^{Cb}	0,54 ^{Cb}	0,95 ^{Ca}	0,47 ^C	4,31 ^{Ba}	2,11 ^{Bb}	0,42 ^{Cc}	0,21 ^{Cd}	1,76 ^C	4,08 ^{Bc}	5,01 ^{Bbc}	6,28 ^{Cb}	12,05 ^{Ba}	6,85 ^B
Média ^a	0,70 ^d	1,20 ^c	1,55 ^b	2,56 ^a	1,50 ^B	4,89 ^b	4,15 ^c	4,14 ^c	7,21 ^A	5,10 ^A	6,09 ^c	6,51 ^c	10,03 ^b	14,44 ^a	9,26 ^A

^a Médias de amostras em triplicata seguidas da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si a ($P > 0,05$).

Sarantinos et al. (29) relataram decréscimo de 14% do teor de colesterol em ovos que foram cozidos, mas houve aumento considerável na ordem de 75% de óxidos de colesterol nestes ovos.

Durante a estocagem e o preparo térmico dos ovos verificou-se que houve decréscimo no total de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, os quais são susceptíveis à oxidação, originando principalmente radicais livres e peróxidos que aceleram a formação dos óxidos de colesterol. De acordo com SMITH (9) a oxidação dos ácidos graxos ataca a porção colesteril das moléculas de éster de colesterol. Além disso, o processamento dos ovos realizados a elevadas temperaturas, acelera as reações entre os lipídios e o oxigênio molecular, ocasionando a formação de óxidos (30,31).

Sarantinos et al. (29) determinaram em ovos fritos ou cozidos de 4 a 8 $\mu\text{g/g}$ de $7\alpha\text{-OH}$ e 34 a 59 $\mu\text{g/g}$ de $7\beta\text{-OH}$, mas não encontraram o 7-ceto. Os óxidos $5,6\alpha$ e $5,6\beta$ -epóxidos são comumente encontrados em concentrações significativas em ovo em pó, variando de 1,0 a 6,10 $\mu\text{g/g}$ ($5,6\alpha$ -epoxi) e de 4,1 a 27 $\mu\text{g/g}$ ($5,6\beta$ -epoxi) por causa do processamento por “spray-dried” que utiliza temperaturas em torno de 180°C (32,33). No entanto, nos ovos que foram fritos também a 180°C , não houve formação de epóxidos, sugerindo que a temperatura não é o único fator responsável pela formação dos óxidos. Em adição no processamento por spray dried dos ovos, a superfície de contato com o oxigênio molecular é muito maior que no preparo dos ovos fritos. Além disso, a atividade de água presente nos ovos é muito maior do que no ovo em pó, protegendo os mesmos da oxidação.

No presente estudo, observou-se a presença de óxidos de colesterol no tempo zero e aumento dos óxidos de colesterol durante o armazenamento dos ovos. A presença de óxidos no tempo zero pode ser proveniente da ração fornecida às aves e que continham óxidos de colesterol ou produzidos por oxidação enzimática no metabolismo das aves. A casca dos ovos deveria exercer proteção contra oxidação lipídica durante a estocagem dos ovos (34). No entanto, como foi verificado aumento dos óxidos durante a estocagem é

possível que tenha ocorrido a penetração de oxigênio molecular através da casca.

A vitamina E não foi reduzida durante a estocagem dos ovos e simultaneamente observou-se aumento de óxidos de colesterol e diminuição de ácidos graxos insaturados, demonstrando que a vitamina E não teve efeito antioxidante, provavelmente devido à presença de grande quantidade de água nas gemas (50 g/100g) dos ovos, que impediu sua ação. Segundo Gordon (35), o mecanismo de quelação de metais pelos antioxidantes fenólicos, no caso a vitamina E, é mais efetivo em óleos do que em alimentos contendo água. Em adição, em ovos desidratados por “spray-dried” estocados à temperatura ambiente por 18 meses, expostos ao ar e à luz, ocorreram perdas gradativas de vitamina E, embora tenha ocorrido aumento simultâneo da oxidação de ácidos graxos e formação de óxidos de colesterol (36).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o processamento térmico, especialmente a fritura reduz os teores de lipídios totais, colesterol e ácidos graxos e elevam as concentrações de óxidos de colesterol nos ovos. O período de armazenamento de 45 dias dos ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3 não modificou os teores de lipídios totais e colesterol, mas reduziu consideravelmente os ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados e concomitantemente, houve aumento da concentração dos óxidos 7-ceto, 7 α -OH e 7 β -OH. Nas condições de armazenamento, apenas o óxido 7-ceto foi maior nos ovos que foram armazenados a 25°C, demonstrando a importância de se armazenar os ovos sob refrigeração para evitar a formação deste óxido. A concentração e o tipo de antioxidantes adicionados em rações comerciais enriquecidas com fonte de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 deve ser reavaliada para garantir a qualidade nutricional dos ovos.

LITERATURA CITADA

- (1) Simopoulos, A. P. Omega 3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am.J.Clin.Nutr.* **1991**, 79, 961-970.
- (2) Simopoulos, A. P. Symposium: Role of poultry products in enriching the human diet with *n*-3 pufa. *Poult. Sci.* **2000**, 79, 961-970.
- (3) Watkins, B.A. Importance of essential fatty acids and their derivatives in poultry. *J. Nutr.* **1991**, 121, 1475-1485.
- (4) Schaefer, E. J. Lipoproteins, nutrition and heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, 75, 191-212.
- (5) Van Elswyk, M.E. Nutrition and physiological effects of flax seed in diets for laying fowl. *World's. Poult. Sci. J.* **1997**, 53, 153-183.
- (6) 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.* **1995**, 74, p.1388-1394.
- (7) Cherian, G.; Wolfe, F.H.; Sim, J.S. Feeding dietary oils with tocopherols: effects on internal qualities of eggs during storage. *Food. Sci.* **1996**, 61, 15-18.
- (8) Baucells, M.D.; Crespo, N.; Barroeta, A.C.; Ferrer, S.L.; Grashorn, M.A. Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poult. Sci.* **2000**, 79, 51-59.
- (9) Smith, L. L. Cholesterol autoxidation. *Chem. Physis. Lipids*, **1987**, 44, 87-125.
- (10) Korahani, V. B. J.; Crastes de Paulet. A. Autoxidation of cholesterol fatty acid esters in solid state and aqueous dispersion. *Lipids*, **1982**, 17, 703.
- (11) Guardiola, F.; Codony, R.; Addis, P. B.; Rafecas, M. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxic.* **1996**, 34, 193-211.

- (12) Sevanian, A.; Peterson, A.R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxic.* **1986**, 24, 1103-1110.
- (13) Folch, J.; Less, M.; Stanley, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* **1957**, 226, 497.
- (14) AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th edn.(Arlington,ed.), AOAC International, Official Method 963. 33. **1997**.
- (15) Joseph, J.D.; Ackman, R.G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study, *J. AOAC Intern.* **1992**, 75, 488-506.
- (16) Mazalli, M.R.; Bragagnolo, N. Estudo comparativo entre métodos e validação do método para determinação de ácidos graxos em ovos. *Lipids*, submetido.
- (17) AOCS. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, 4th, edn. (Firestone, D., ed.), American Oil Chemists' Society Press, Champaign, **1989**, Official Method Ce 1b-89.
- (18) Mazalli, M.R.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlim, M.N.; Bragagnolo, N. HPLC Method for Quantification and characterization of cholesterol and its oxidation products in eggs. *Lipids*, submetido.
- (19) Long, G.L.; Winefordner, J.D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* **1983**, 55, 712-724.,
- (20) AOCS - American Oil Chemists' Society. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, 5 ed., edited by D. Firestone, Champaign, **1997**, Official Method Ce 8-89, 1-5.
- (21) USDA. *Nutrient Database for Standard Reference*. Release 13, Poultry Products. Nutrient Data Laboratory, Agricultural Research Service: Beltsville, MD, **2000**; NDB nº 01133.
- (22) Crnjar, E.D.; Witchwoot, A.; Nawar, W.W. Thermal oxidation of series of saturated triacylglycerols. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, 29, 39-42.

- (23) Nahtigal, B.; Smidovnik, A.; Golc-Wondra, A. Determination of fatty acids in ordinary and omega-enriched eggs, prepared in four different ways: raw, boiled for 3 and 8 minutes and fried, old 3/7 days and after 4 weeks of storage. *Czech. J. Food Sci.* **2000**, 18:138-141.
- (24) Koo; N.S.; Wang, S.G.; Park, J.M. Change of fatty acid content in egg yolk oil of various chicken eggs during storage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **2002**, 31,184-188.
- (25) Meluzzi, A.; Sirri, F; Manfreda, G; Tallarico, N; Franchini, A. Effects of dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with *n*-3 long-chain fatty acids. *Poult. Sci.*, **2000**, 79, 539-545.
- (26) Mazalli, M.R.; Faria, D.E.; Salvador, D.; Ito, D.T. A comparison of the feeding value of different sources of fat for laying hens: 2. lipid, cholesterol, and vitamin E profiles of egg yolk. *J. Appl. Poult. Res.* **2004**, 13, 280-290.
- (27) Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D. B. Comparison of the Cholesterol Content of Brazilian Chicken and Quail Eggs. *J. Food Comp. Anal.* **2002**, 16, 147-153.
- (28) Beyer, R. S.; Jensen, L. S. Cholesterol content of commercially produced eggs in Georgia. *Poult. Sci.* **1989**, 68 1703-1706.
- (29) Sanrantinos, J.; O'Dea, K.; Sinclair, A.J. Cholesterol oxides in Australian foods: Identification and quantification. *Food Australia*, **1993**, 45, 485-490.
- (30) Tsai, L.S.; Hudson, C.A. Cholesterol oxides in ovo em pó dry egg products: isolation and identification, *J. Food Sci.* **1984**, 49, 1245-1248.
- (31) Morgan, J. N.; Armstrong, D. J. Quantification of cholesterol oxidation in egg yolk powder spray-dried with direc heating. *J. Food Sci.* **1992**, 57, 43-45,
- (32) Fontana, A.; Antoniazzi, F; Ciavatta, M. L.; Trivillone, E.; Cimino, G. H-NMR study of cholesterol autoxidation en egg powder and cookies exposed to adverse storage. *J. Food. Sci.* **1993**, 58, 1286-1290.
- (33) 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. Chem.* **1995**, 43, 1127-1131.

- (34) Galobart, J., and Guardiola, F. Formation and content of cholesterol oxidation products in egg and egg products, (Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., and Savage, G.P., eds.), AOCS Press, USA, **2002**, 127-145.
- (35) Gordon, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. *Antioxidantes in food pratical applications*. edited by Jan Porkorny, Nedyalka Yanishlieva and Michael Gordon, CRC Press, Washington, DC, **2001**.
- (36) Whale, K.W.J.; Hoppe, P.P.; McIntosh, G. Effects of storage and various intrinsic vitamina E concentrations on lipid oxidation in dried egg powders. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, 61, 463-469.

CAPÍTULO 6

**EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E TEMPO DE
ESTOCAGEM NA FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL E
NA ALTERAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM
OVOS**

**EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO PARA A REVISTA
JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY**

RESUMO

Os teores de colesterol, óxidos de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos foram determinados em ovos. Dois lotes constituídos de 30 dúzias de ovos cada foram distribuídos do seguinte modo: 15 dúzias foram armazenadas à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro e 15 dúzias foram armazenadas a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, na geladeira por 21 dias. As amostras foram analisadas no tempo zero e semanalmente. Em cada tempo (0, 1, 2 e 3) e nas temperaturas de armazenamento (25°C e 5°C), foram separados 36 ovos que foram divididos em 3 dúzias de ovos. Uma das dúzias de ovos foi analisada na forma crua e as outras duas foram submetidas a dois tipos de tratamentos térmicos, cozimento e fritura. O teor de colesterol não foi reduzido durante os tempos de estocagem, mas foi menor nos ovos que foram fritos. Nos tempos de armazenamento, em ambos os lotes, tanto nas amostras cruas quanto nas cozidas e fritas os teores de 7-cetocolesterol e 7α -hidroxicolesterol aumentaram do tempo zero até o tempo 1 e posteriormente foram reduzidos. Para o 7β -hidroxicolesterol houve aumento do tempo zero até o tempo 2 e manteve-se constante. As concentrações dos óxidos de colesterol 7-cetocolesterol e 7α -hidroxicolesterol foram maiores nos ovos fritos. O 7β -hidroxicolesterol foi maior tanto nas amostras cozidas, quanto nas fritas em comparação com as cruas. As condições de armazenamento apenas influenciaram o teor de 7-cetocolesterol, que foi maior nas amostras armazenadas à 25°C . O teor dos ácidos graxos foi reduzido tanto nos ovos fritos quanto nos cozidos e o teor de lipídios totais foi reduzido apenas nos ovos que foram fritos.

INTRODUÇÃO

Luz, oxigênio, radiação, calor, ácidos graxos poliinsaturados e metais de transição são considerados responsáveis pela oxidação do colesterol (1,2,3). Deste modo, o mecanismo de oxidação do colesterol nos alimentos vai depender de sua composição, do processamento utilizado e do seu tempo de estocagem.

O ovo é um alimento que contém alto teor de lipídios e colesterol e por isso, é potencial fonte de óxidos de colesterol na dieta. Soma-se ao fato que os ácidos graxos insaturados também presentes em sua composição podem sofrer alterações durante o preparo térmico e a estocagem originando principalmente radicais livres que aceleram a formação de óxidos de colesterol.

Os óxidos de colesterol mais freqüentemente encontrados em alimentos são o 7-cetocolesterol, 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 5,6 α -epoxicolesterol, 5,6 β -epoxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e colestanoetriol (4,5).

A oxidação do colesterol é considerada um fator de risco à saúde humana (6). Várias pesquisas relatam que os óxidos de colesterol causam efeitos biológicos adversos, especificamente nas funções celulares, o que pode levar ao desenvolvimento de aterosclerose e câncer (7,8) e de doenças degenerativas, como Parkinson e Alzheimer (9,10). Além disso, estes compostos estão associados a mutagenicidade, citotoxicidade, alteração das propriedades das membranas celulares e inibição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase envolvida na síntese do colesterol (11,12,13).

Considerando que o processamento e o armazenamento de alimentos ricos em colesterol e ácidos graxos insaturados podem levar à formação de óxidos de colesterol, os ovos estando dentro deste contexto devem ser investigados. Desta forma, os objetivos deste estudo foram verificar o efeito do processamento térmico e tempo de estocagem na formação de óxidos de colesterol e na alteração da composição de ácidos graxos em ovos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material. Os padrões de colesterol e óxidos de colesterol: colest-5-ene-3 β ,19-diol (19-OH), colest-5-ene-3 β ,20 α -diol (20 α -OH), colest-5-ene-3 β ,22[R]-diol (22(R)-OH), colest-5-ene-3 β ,22[S]-diol (22(S)-OH), colest-5-ene-3 β ,25diol (25-OH), 3 β -hidroxicolest-5-ene-7-one (7-ceto), colest-5-ene-3 β ,7 β -diol (7 β -OH), 5,6- α -epoxi-5 α -colest-3 β -ol (5,6 α -epoxi), 5,6- β -epoxi-5 β -colest-3 β -ol (5,6 β -epoxi) e colest-3 β -5 α -6 β -triol (triol) foram obtidos de Sigma (Miliford, MA, USA). Colest-5-ene-3 β ,24[S]-diol (24(S)-OH) e colest-5-ene-3 β ,7 α -diol (7 α -OH) foram adquiridos de Steraloids (Newport, RI, USA) e o padrão de referência de ovo integral em pó (SRM 1846) de NIST (Gaithersburg, MD, USA). Um total de 37 padrões de éster metílico de ácidos graxos (FAME) do 4:0 ao 24:0 da marca Supelco (Bellefonte, PA, USA) foram usados para identificação. Os padrões internos utilizados para a quantificação foram os ésteres metílicos do ácido tricosanóico (23:0) e do ácido tridecanóico (13:0) da marca Sigma (Miliford, MA, USA) com 99% de pureza e o padrão de referência de ovo integral em pó (SRM 1846) de NIST (Gaithersburg, MD, USA).

Amostras. Dois lotes de ovos comuns foram comprados diretamente da granja no dia da postura para serem analisados no dia seguinte. Os ovos com casca do lote 1 pesaram em média 50,6 g e a gema 16,3 g e do lote 2 pesaram 56,3 g e a gema 16,5 g. Todos os lotes foram constituídos de 30 dúzias de ovos, distribuídas da seguinte forma: 15 dúzias foram armazenadas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro e 15 dúzias foram armazenadas a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 21 dias. As amostras foram analisadas no tempo zero e semanalmente. Em cada tempo (0, 1, 2 e 3) e nos tipos de armazenamento (25°C e 5°C), foram separados 36 ovos que foram divididos em 3 dúzias de ovos. Uma das dúzias de ovos foi analisada na forma crua e as outras duas foram submetidas a dois tipos de tratamentos térmicos, doze ovos foram cozidos durante 5 minutos após a ebulição da água (97°C) e outros doze foram fritos em óleo de soja à temperatura de 190°C , por 4 minutos, em um Master Grill (Britânia, Brasil). Em

ambos os tipos de preparo térmico, assim como, nos ovos crus, as gemas foram separadas e homogeneizadas e as amostras foram analisadas em triplicata.

Extração de Lipídios. Os lipídios foram extraídos de acordo com Folch et al. (14). Alíquotas de 10 ml foram tomadas e os lipídios totais determinados gravimetricamente.

Determinação de Umidade. Alíquotas de $1,0 \pm 0,5$ g foram secas em estufa a 110°C até peso constante, de acordo com metodologia da AOAC (1997) (15).

Determinação de Ácidos Graxos. O extrato lipídico ($25 \pm 0,1$ mg) foi metilado de acordo com Joseph and Ackman (16). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo gasoso (Varian 3400 CX), com detector por ionização em chama, injetor split (1:50), coluna CP-SIL 88 (100 m, 0,25 mm, 0,20 μm) e workstation star. As condições cromatográficas foram de acordo com Mazalli e Bragagnolo (17). Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos padrões com os da amostra e a quantificação foi realizada por padronização interna utilizando os ésteres metílicos do ácido tricosanóico (23:0) e do ácido tridecanóico (13:0) como padrões internos. Os resultados foram calculados em mg/100 g de amostra de acordo com a AOCS (18). O método foi validado utilizando padrão de referência certificado de ovo em pó (SRM 8415, NIST), cujos resultados foram semelhantes ao especificado pelo material de referência.

Determinação Simultânea de Colesterol e Óxidos de Colesterol por CLAE-UV-IR (cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta e índice de refração). As etapas pré-cromatográficas, separação e quantificação do colesterol e dos óxidos 19-OH, 20 α -OH, 22(R)-OH, 24(S)-OH, 22(S)-OH, 25-OH, 26-OH, 7-ceto, 7 β -OH, 7 α -OH, 5,6 α -epoxi, 5,6 β -epoxi e triol foram de acordo com Mazalli et al. (19). Um cromatógrafo líquido da marca

Shimadzu foi utilizado com detectors UV (SPD-10AV_{vp}) e índice de refração (RID-10A) em série. A coluna analítica usada foi Nova Pack CN HP, 300 mm x 3.9 mm x 4 µm (Waters, Millford, MA, USA) à temperatura de 32°C. A quantificação foi realizada por padronização externa e CLAE-APCI-MS foi utilizado para a confirmação do colesterol e dos óxidos de colesterol.

A recuperação do colesterol variou de 92 a 102% e dos óxidos de colesterol de 93 a 96%. Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com Long et al. (20). Os LD encontrados para os óxidos de colesterol variaram de 0,002 a 0,031 µg/g e para o colesterol o LD foi de 0,026 µg/g. Os LQ encontrados para os óxidos de colesterol variaram de 0,002 a 0,079 µg/g e para o colesterol o LQ foi de 0,088 µg/g. O teor de colesterol do material de referência certificado (SRM 1846, NIST) foi de 19,0 ± 0,2 mg/g de gema, sendo semelhante ao valor referido no material de referência certificado.

Análises Estatísticas. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) dos dados obtidos de lipídios totais, umidade, colesterol, óxidos de colesterol e ácidos graxos utilizando o software Statistic 5.5 e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teores de Lipídios Totais e Umidade em Ovos. Na análise dos resultados de lipídios e umidade não houve interação significativa entre os fatores avaliados: preparo, armazenamento e tempo. O teor de lipídios totais foi significativamente menor somente nos ovos que foram fritos. O maior teor de umidade foi nas amostras cruas e o menor nas amostras fritas (**Tabela 1**). Não houve diferença significativa entre as condições de armazenamento tanto para os resultados de lipídios totais como para a umidade.

Tabela 1. Valores médios de lipídios totais (g/100g de gema, base seca) e umidade (g/100 g de gema) em ovos armazenados a 25 e 5°C do tempo zero e mais 3 períodos semanais.

LOTE 1											
LIPÍDIOS						UMIDADE					
	Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
25°C	Cru	31,80	31,65	31,36	31,17	31,50 ^A	50,87	50,86	50,90	50,93	50,89 ^A
	Cozido	31,71	31,90	31,08	31,01	31,43 ^A	47,89	47,72	47,95	47,93	47,87 ^B
	Frito	30,18	28,59	27,59	27,36	28,43 ^B	45,00	45,26	45,52	46,01	45,44 ^C
Média ^a		31,33 ^a	31,36 ^a	31,03 ^a	30,99 ^a	30,45 ^A	47,92 ^a	47,95 ^a	48,12 ^a	48,29 ^a	48,07 ^A
	Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
5°C	Cru	31,80	31,53	31,50	31,09	31,48 ^A	50,87	50,85	50,89	50,95	50,89 ^A
	Cozido	31,71	31,93	30,84	31,31	31,45 ^A	47,89	47,58	47,96	48,00	47,85 ^B
	Frito	30,18	29,42	27,14	27,00	28,44 ^B	45,00	46,59	45,69	45,96	45,81 ^C
Média ^a		31,33 ^a	31,57 ^a	30,94 ^a	31,04 ^a	30,45 ^A	47,92 ^a	48,34 ^a	48,18 ^a	48,30 ^a	48,18 ^A

LOTE 2											
	Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
25°C	Cru	31,73	30,38	32,09	31,40	31,40 ^A	51,00	50,87	50,81	50,92	50,90 ^A
	Cozido	31,97	30,77	30,71	31,10	31,14 ^B	47,99	47,83	47,77	48,00	47,90 ^B
	Frito	30,91	28,11	27,45	26,89	28,34 ^C	46,02	46,51	45,65	45,36	45,88 ^C
Média ^a		31,54 ^a	30,50 ^a	31,20 ^a	30,96 ^a	30,29 ^A	48,33	48,40	48,07	48,09	48,22 ^A
	Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
5°C	Cru	31,73	30,73	31,39	31,11	31,24 ^A	51,00	50,85	50,89	50,95	50,92 ^A
	Cozido	31,97	30,80	30,76	31,32	31,21 ^B	47,99	47,58	47,96	48,00	47,88 ^B
	Frito	30,91	28,84	27,01	26,97	28,43 ^C	46,02	46,29	45,29	45,82	45,85 ^C
Média ^a		31,54 ^a	30,46 ^a	30,83 ^a	30,99 ^a	30,30 ^A	48,33 ^a	48,24 ^a	48,04 ^a	48,25 ^a	48,21 ^A

^aMédias de amostras em duplicata seguidas da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05).

Valores inferiores de lipídios em gemas cruas e semelhantes em gemas cozidas e fritas, assim como valores semelhantes de umidade em gemas cruas estão descritos no USDA (21).

Composição de Ácidos Graxos em Ovos. De um total de 29 ácidos identificados, os principais ácidos graxos determinados nos ovos foram: C16:0, C18:0, C16:1 n7, C18:1 n9, C18:2 n6, C20:4 n6, C18:3 n3 e C22:6 n3. Nos ovos não foram identificados os ácidos graxos C4:0; C6:0; C8:0; C10:0; C11:0; C12:0, C13:0 e C23:0 e os ácidos graxos C21:0, C17:1 n7, C15:1 n9; C22:1 n9, C24:1 n9 e C20:3 n3 foram encontrados em quantidades de traços (menos que 1 mg/100 g). Na análise dos resultados de todos os ácidos graxos não houve interação significativa entre os fatores avaliados. Os tipos de preparo da amostra e o tempo de estocagem modificaram as concentrações de alguns ácidos graxos. Por outro lado, as condições de armazenamento não influenciaram nos resultados dos ácidos graxos.

Para os ácidos graxos saturados (**Tabelas 2 e 3**), observou-se menores teores destes ácidos nos ovos fritos. Considerando que os teores de lipídios nas amostras fritas também foram menores em relação aos crus e cozidos, a perda dos ácidos graxos saturados deve-se principalmente à redução de lipídios.

Os menores valores do C14:0, C15:0, C16:0, C17:0 e C18:0 ocorreram nas amostra fritas. Os C20:0, C22:0 e C24:0 não foram influenciados pelos dois tipos de preparos térmicos. Nos tempos de estocagem, apenas os ácidos graxos C14:0 e C16:0 reduziram até o tempo 1.

Para os ácidos graxos monoinsaturados (**Tabela 4**) os C14:1n9, C16:1n7 e C18:1n9 foram menores nas amostras fritas enquanto que os C17:1 n7 e C20:1 n9 foram menores tanto nas amostras cozidas como nas fritas. Nos tempos de estocagem C14:1n9 C16:1n7 e C18:1n9 reduziram até o tempo 2 e C17:1 n7 e C20:1 n9 até o tempo final.

Tabela 2. Concentração de ácidos graxos saturados (g/100g de gema, base seca) em ovos armazenados a 25 e 5°C do tempo zero e por mais 3 períodos semanais.

ÁCIDOS GRAXOS															
C14:0						C15:0					C16:0				
25°C						25°C					25°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	0,66	0,60	0,58	0,57	0,60 ^A	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09 ^A	5,52	5,40	5,49	5,50	5,48 ^A
Cozido	0,62	0,60	0,64	0,60	0,62 ^A	0,07	0,06	0,06	0,05	0,06 ^B	5,60	5,48	5,00	5,51	5,40 ^A
Frito	0,51	0,40	0,34	0,35	0,40 ^B	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04 ^C	6,18	4,50	4,50	3,88	4,77 ^B
Média ^a	0,60 ^a	0,53 ^{ab}	0,52 ^b	0,51 ^b	0,54 ^A	0,07 ^a	0,06 ^a	0,06 ^a	0,06 ^a	0,07 ^A	5,76 ^a	5,13 ^b	5,00 ^b	4,96 ^b	5,21 ^A
5°C						5°C					5°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	0,66	0,58	0,62	0,61	0,62 ^A	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09 ^A	5,52	5,43	5,55	5,52	5,51 ^A
Cozido	0,62	0,60	0,55	0,53	0,58 ^A	0,07	0,07	0,06	0,05	0,06 ^B	5,60	4,89	5,50	5,58	5,39 ^A
Frito	0,51	0,46	0,38	0,39	0,44 ^B	0,05	0,05	0,04	0,02	0,04 ^C	6,18	4,78	4,00	3,95	4,73 ^B
Média ^a	0,60 ^a	0,55 ^{ab}	0,52 ^b	0,51 ^b	0,54 ^A	0,07 ^a	0,07 ^a	0,06 ^a	0,05 ^a	0,07 ^A	5,76 ^a	5,03 ^b	5,02 ^b	5,02 ^b	5,21 ^A
C17:0						C18:0					C20:0				
25°C						25°C					25°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	0,35	0,28	0,30	0,25	0,30 ^A	1,34	1,40	1,29	1,30	1,33 ^A	0,18	0,16	0,15	0,16	0,16 ^A
Cozido	0,36	0,26	0,22	0,29	0,28 ^A	1,21	1,19	1,28	1,27	1,24 ^{AB}	0,17	0,15	0,13	0,13	0,15 ^A
Frito	0,17	0,17	0,17	0,16	0,17 ^B	1,06	1,04	0,81	0,91	0,96 ^B	0,16	0,09	0,11	0,14	0,13 ^A
Média ^a	0,29 ^a	0,24 ^a	0,23 ^a	0,23 ^a	0,25 ^A	1,20 ^a	1,21 ^a	1,13 ^a	1,16 ^a	1,18 ^A	0,17 ^a	0,13 ^a	0,13 ^a	0,14 ^a	0,14 ^A
5°C						5°C					5°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	0,35	0,27	0,25	0,29	0,29 ^A	1,34	1,17	1,21	1,20	1,23 ^A	0,18	0,16	0,14	0,14	0,16 ^A
Cozido	0,36	0,26	0,24	0,25	0,28 ^A	1,21	1,24	1,22	1,22	1,22 ^{AB}	0,17	0,13	0,15	0,14	0,15 ^A
Frito	0,17	0,17	0,16	0,15	0,16 ^B	1,06	1,07	1,03	0,96	1,03 ^B	0,16	0,10	0,08	0,09	0,11 ^A
Média ^a	0,29 ^a	0,23 ^a	0,22 ^a	0,23 ^a	0,24 ^A	1,20 ^a	1,16 ^a	1,15 ^a	1,13 ^a	1,16 ^A	0,17 ^a	0,13 ^a	0,12 ^a	0,12 ^a	0,14 ^A

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05).

Tabela 3. Concentração de ácidos graxos saturados (g/100g de gema, base seca) em ovos armazenados a 25 e 5 °C do tempo zero e por mais 3 períodos semanais.

ÁCIDOS GRAXOS											
C22:0						C24:0					
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a	
25 °C	Cru	0,12	0,09	0,09	0,09	0,10 ^A	0,026	0,025	0,025	0,024	0,025 ^A
	Cozido	0,11	0,10	0,08	0,09	0,10 ^A	0,025	0,025	0,024	0,024	0,025 ^A
	Frito	0,10	0,09	0,08	0,08	0,09 ^A	0,024	0,024	0,024	0,023	0,024 ^A
Média ^a		0,11 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,09 ^A	0,025 ^a	0,025 ^a	0,024 ^a	0,024 ^a	0,024 ^A
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a	
5 °C	Cru	0,12	0,10	0,09	0,09	0,10 ^A	0,026	0,026	0,026	0,023	0,025 ^A
	Cozido	0,11	0,09	0,09	0,08	0,09 ^A	0,025	0,025	0,024	0,023	0,024 ^A
	Frito	0,10	0,09	0,09	0,08	0,09 ^A	0,024	0,024	0,023	0,023	0,024 ^A
Média ^a		0,11 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,08 ^a	0,09 ^A	0,025 ^a	0,025 ^a	0,024 ^{ab}	0,023 ^b	0,024 ^A

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05).

Tabela 4. Concentração de ácidos graxos monoinsaturados (g/100g de gema, base seca) em ovos, armazenados a 25 e 5°C do tempo zero e por mais 3 períodos semanais.

ÁCIDOS GRAXOS															
C14:1 n9						C16:1 n7					C17:1 n7				
25°C						25°C					25°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	0,10	0,09	0,07	0,06	0,08 ^A	3,04	2,33	2,17	1,49	2,26 ^A	0,11	0,09	0,08	0,06	0,08 ^A
Cozido	0,09	0,09	0,07	0,05	0,08 ^A	2,82	2,64	1,93	1,61	2,25 ^A	0,08	0,08	0,07	0,04	0,07 ^B
Frito	0,07	0,06	0,04	0,04	0,05 ^B	2,21	2,19	1,20	1,71	1,83 ^B	0,08	0,08	0,08	0,04	0,07 ^B
Média ^a	0,09 ^a	0,08 ^a	0,06 ^b	0,05 ^b	0,07 ^A	2,69 ^a	2,39 ^a	1,77 ^b	1,61 ^b	2,11 ^A	0,09 ^a	0,08 ^a	0,07 ^b	0,05 ^c	0,07 ^A
5°C						5°C					5°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	0,10	0,10	0,08	0,06	0,09 ^A	3,04	2,60	2,37	1,56	2,39 ^A	0,11	0,08	0,08	0,07	0,09 ^A
Cozido	0,09	0,09	0,07	0,05	0,08 ^B	2,82	2,40	1,96	1,76	2,23 ^A	0,08	0,09	0,06	0,05	0,07 ^B
Frito	0,07	0,07	0,05	0,04	0,06 ^C	2,21	2,12	1,61	1,46	1,85 ^B	0,08	0,08	0,08	0,03	0,07 ^B
Média ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,07 ^b	0,05 ^b	0,07 ^A	2,69 ^a	2,37 ^a	1,98 ^{bc}	1,59 ^c	2,16 ^A	0,09 ^a	0,08 ^a	0,07 ^b	0,05 ^c	0,07 ^A
C18:1 n9						C20:1 n9									
25°C						25°C					25°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	4,85	3,74	3,55	3,47	3,90 ^A	0,11	0,09	0,08	0,06	0,09 ^A					
Cozido	4,57	3,39	3,05	2,72	3,43 ^{AB}	0,10	0,07	0,07	0,06	0,08 ^{AB}					
Frito	3,35	3,11	2,60	2,11	2,79 ^B	0,09	0,08	0,06	0,05	0,07 ^B					
Média ^a	4,26 ^a	3,41 ^b	3,06 ^{bc}	2,76 ^c	3,37 ^A	0,10 ^a	0,08 ^{bc}	0,07 ^{cd}	0,06 ^d	0,08 ^A					
5°C						5°C					5°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	4,85	4,14	3,63	3,32	3,98 ^A	0,11	0,11	0,09	0,07	0,10 ^A					
Cozido	4,57	3,05	3,06	2,79	3,37 ^{AB}	0,10	0,09	0,07	0,06	0,08 ^B					
Frito	3,35	2,98	2,57	2,26	2,79 ^B	0,09	0,09	0,06	0,05	0,07 ^B					
Média	4,26 ^a	3,39 ^b	3,08 ^{bc}	2,79 ^c	3,38 ^A	0,10 ^a	0,10 ^a	0,08 ^b	0,06 ^c	0,08 ^A					

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05).

Para todos os ácidos graxos poliinsaturados n6 (**Tabela 5**) e ácidos graxos poliinsaturados n3 (**Tabela 6**) os menores teores destes ácidos foram observados em ambos tipos de preparo térmico. Todos os ácidos graxos poliinsaturados n6 e n3 reduziram gradativamente até o final do tempo de estocagem. Para os ácidos C18:1 n9t e C18:2 n6t (**Tabela 6**), não houve diferença entre os valores determinados nos ovos crus, cozidos ou fritos. O C18:1 n9t e C18:2 n6t foram reduzidos até o tempo 1.

Nos resultados da concentração média de ácidos graxos entre as gemas cruas, cozidas e fritas (**Tabela 7**) verificou-se que o preparo térmico dos ovos teve maior influência na redução de saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

Na média geral, o tempo de estocagem contribuiu para a redução de 38% de monoinsaturados e 65% de poliinsaturados. A casca dos ovos, por ser porosa, facilita a entrada de oxigênio dentro dos ovos, ocasionando principalmente a oxidação dos ácidos graxos insaturados. Embora, Galobart e Guardiola (22) sugeriram que a casca do ovo exerce proteção contra a oxidação lipídica.

Na média geral, o cozimento e a fritura pouco influenciaram a redução de ácidos graxos saturados nos ovos. Para os insaturados houve redução de 3% com o cozimento e de 17% com a fritura. Segundo Nahtigal et al. (23) quando os ovos são cozidos e fritos ocorrem perdas significativas nos teores de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

Teores de Colesterol e Óxidos de Colesterol em Ovos. Nos resultados de colesterol não houve interação significativa entre os fatores avaliados e não ocorreram diferenças significativas entre as condições de armazenamento, tipos de preparo e tempo de estocagem (**Tabela 8**).

Bragagnolo e Rodriguez-Amaya (24) também não encontraram diferença significativa no teor de colesterol em ovos crus e cozidos. Resultados semelhantes de colesterol em ovo cru foram obtidos por outros pesquisadores (24,25).

Tabela 5. Concentração de ácidos graxos poliinsaturados n6 (g/100g de gema, base seca) em ovos armazenados a 25 e 5 °C do tempo zero e por mais 3 períodos semanais.

ÁCIDOS GRAXOS															
C18:2 n6						C18:3 n6					C20:2 n6				
25 °C						25 °C					25 °C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	9,34	7,91	5,65	2,32	6,30 ^A	0,016	0,016	0,010	0,006	0,012 ^A	0,048	0,037	0,021	0,013	0,030 ^A
Cozido	9,42	7,93	4,44	2,28	6,02 ^A	0,014	0,013	0,008	0,005	0,009 ^B	0,043	0,031	0,026	0,016	0,029 ^{AB}
Frito	8,70	8,20	5,17	3,02	6,27 ^A	0,011	0,012	0,007	0,005	0,009 ^B	0,038	0,036	0,023	0,015	0,028 ^B
Média ^a	9,15 ^a	8,02 ^b	5,09 ^c	2,54 ^d	6,20 ^A	0,014 ^a	0,014 ^a	0,008 ^b	0,005 ^c	0,010 ^A	0,043 ^a	0,034 ^b	0,023 ^c	0,015 ^d	0,029 ^A
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	9,34	8,08	5,39	3,28	6,52	0,016	0,017	0,015	0,007	0,014 ^A	0,048	0,037	0,030	0,019	0,034 ^A
Cozido	9,42	7,20	3,86	2,48	5,74	0,014	0,014	0,012	0,005	0,011 ^B	0,043	0,034	0,025	0,016	0,030 ^B
Frito	8,70	7,79	5,05	3,37	6,22	0,011	0,012	0,008	0,006	0,009 ^C	0,038	0,037	0,022	0,016	0,028 ^B
Média ^a	9,15 ^a	7,69 ^b	4,77 ^c	3,04 ^d	6,16 ^A	0,014 ^a	0,014 ^a	0,011 ^b	0,006 ^c	0,011 ^A	0,043 ^a	0,036 ^b	0,026 ^c	0,017 ^d	0,030 ^A
C20:3 n6						C20:4 n6									
5 °C						5 °C									
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	0,035	0,025	0,017	0,012	0,022 ^A	0,34	0,29	0,25	0,20	0,27 ^A	0,34	0,29	0,25	0,20	0,27 ^A
Cozido	0,033	0,016	0,015	0,011	0,019 ^B	0,28	0,28	0,18	0,17	0,23 ^B	0,34	0,29	0,25	0,20	0,23 ^B
Frito	0,022	0,018	0,014	0,013	0,017 ^C	0,35	0,25	0,23	0,15	0,24 ^B	0,34	0,29	0,25	0,20	0,24 ^B
Média ^a	0,030 ^a	0,020 ^b	0,015 ^c	0,012 ^d	0,019 ^A	0,33 ^a	0,27 ^b	0,22 ^c	0,18 ^d	0,25 ^A	0,33 ^a	0,27 ^b	0,22 ^c	0,18 ^d	0,25 ^A
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	0,035	0,027	0,016	0,013	0,023 ^A	0,34	0,31	0,24	0,21	0,27 ^A	0,34	0,31	0,24	0,21	0,27 ^A
Cozido	0,033	0,016	0,015	0,011	0,019 ^B	0,28	0,24	0,21	0,19	0,23 ^B	0,34	0,31	0,24	0,21	0,23 ^B
Frito	0,022 ^a	0,018 ^b	0,016 ^c	0,013 ^d	0,018 ^B	0,35 ^a	0,25 ^b	0,20 ^c	0,18 ^c	0,25 ^B	0,35 ^a	0,25 ^b	0,20 ^c	0,18 ^c	0,25 ^B

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05).

Tabela 6. Concentração de ácidos graxos poliinsaturados n3 e ácidos graxos *trans* (g/100g de gema, base seca) em ovos armazenados a 25 e 5°C do tempo zero e por mais 3 períodos semanais.

ÁCIDOS GRAXOS										
C18:3 n3						C22:6 n3				
25°C						25°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	1,25	1,22	1,81	1,48	1,44 ^A	0,085	0,085	0,054	0,035	0,065 ^A
Cozido	1,14	0,74	0,51	0,14	0,63 ^B	0,078	0,056	0,039	0,028	0,050 ^B
Frito	1,10	0,88	0,51	0,28	0,69 ^B	0,010	0,045	0,039	0,021	0,051 ^B
Média ^a	1,16 ^a	0,95 ^b	0,94 ^b	0,63 ^c	0,92 ^A	0,088 ^a	0,062 ^b	0,044 ^c	0,028 ^d	0,055 ^A
5°C						5°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	1,25	1,10	0,44	0,22	0,75 ^A	0,085	0,082	0,070	0,033	0,067 ^A
Cozido	1,14	1,01	0,43	0,19	0,69 ^B	0,078	0,058	0,040	0,031	0,052 ^B
Frito	1,10	0,89	0,50	0,35	0,71 ^B	0,010	0,048	0,050	0,031	0,056 ^B
Média ^a	1,16 ^a	1,00 ^b	0,45 ^c	0,25 ^d	0,72 ^A	0,088 ^a	0,062 ^b	0,052 ^c	0,032 ^d	0,058 ^A
C18:1 n9t						C18:2 n6t ^b				
25°C						25°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média	T0	T1	T2	T3	Média
Cru	0,095	0,082	0,083	0,061	0,080	0,016	0,014	0,011	0,009	0,013
Cozido	0,093	0,063	0,033	0,040	0,057	0,017	0,011	0,010	0,005	0,011
Frito	0,049	0,023	0,025	0,022	0,030	0,013	0,010	0,008	0,006	0,009
Média ^a	0,079 ^a	0,056 ^{ab}	0,047 ^b	0,041 ^b	0,055 ^A	0,016 ^a	0,011 ^{ab}	0,010 ^b	0,007 ^b	0,011 ^A
5°C						5°C				
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	0,095	0,088	0,082	0,061	0,081	0,016	0,015	0,010	0,009	0,013
Cozido	0,093	0,062	0,032	0,021	0,052	0,017	0,011	0,008	0,006	0,011
Frito	0,049	0,025	0,026	0,012	0,028	0,013	0,009	0,008	0,006	0,009
Média ^a	0,079 ^a	0,058 ^{ab}	0,047 ^b	0,031 ^b	0,054 ^A	0,016 ^a	0,012 ^{ab}	0,009 ^b	0,007 ^b	0,011 ^A

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata). Valores seguidos da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si (P> 0,05), ^b (9c, 12t + 9t, 12

Tabela 7. Concentração média de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e ácidos graxos *trans* em gema de ovos analisada no tempo zero (T0) e no último período de estocagem de 21 dias (T3) armazenados a 25 e 5 °C.

		CRU	COZIDO	FRITO
g / 100g		MED ± DP ^a	MED ± DP ^a	MED ± DP ^a
Saturados	T0	8,30 ± 0,38	8,17 ± 0,42	8,25 ± 0,17
	T3	7,97 ± 0,14	7,91 ± 0,11	5,62 ± 0,30
Monoinsat.	T0	8,24 ± 0,98	7,66 ± 0,33	5,80 ± 0,59
	T3	5,11 ± 0,47	4,60 ± 0,01	3,90 ± 0,01
PUFA n6	T0	9,74 ± 0,09	9,79 ± 0,23	9,12 ± 0,65
	T3	3,04 ± 0,41	2,59 ± 0,01	3,39 ± 0,01
PUFA n3	T0	1,34 ± 0,11	1,22 ± 0,34	1,11 ± 0,21
	T3	0,88 ± 0,47	0,19 ± 0,15	0,34 ± 0,39
PUFA	T0	11,08 ± 0,21	11,01 ± 0,11	10,23 ± 0,87
	T3	3,92 ± 0,06	2,78 ± 0,01	3,73 ± 0,38
Ág <i>trans</i>	T0	0,06 ± 0,05	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,02
	T3	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,01
Insaturados	T0	19,32 ± 1,17	18,67 ± 0,44	16,03 ± 1,46
	T3	9,03 ± 0,40	7,38 ± 0,01	7,63 ± 0,37
Relação				
n6/n3	T0	7,27 ± 0,41	8,02 ± 1,71	8,22 ± 0,77
	T3	3,45 ± 0,09	13,63 ± 5,06	9,97 ± 4,36
PUFA/SAT	T0	1,33 ± 0,03	1,35 ± 0,05	1,24 ± 0,08
	T3	0,49 ± 0,02	0,35 ± 0,00	0,66 ± 0,02

^a Médias e desvio padrão de n=6 (2 lotes de amostras analisadas em triplicata)

Os óxidos de colesterol encontrados nos ovos foram: 7-ceto, 7 β -OH, e 7 α -OH (**Tabela 9**). Entre os fatores preparo e tempo houve interação significativa. Os maiores teores dos óxidos 7-ceto e 7 α -OH foram observados nas amostras fritas. O 7 β -OH foi maior tanto nas amostras cozidas, quanto nas fritas, em comparação com as cruas. As condições de armazenamento apenas influenciaram o teor de 7-ceto, que foi maior nas amostras armazenadas à 25 °C.

Nos tempos de armazenamento, em ambos os lotes, tanto nas amostras cruas quanto nas cozidas e fritas os teores de 7-ceto e 7 α -OH aumentaram do

tempo zero até o tempo 1 e depois foram reduzidos. Para o 7 β -OH houve aumento do tempo zero até o tempo 2 e manteve-se constante. Durante a estocagem e o preparo térmico dos ovos observa-se que ocorreu decréscimo no total de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados. Estes ácidos graxos são susceptíveis a oxidação e uma vez oxidados formam radicais livres e peróxidos, os quais desencadeiam a oxidação do colesterol (1,3). Além disso, as altas temperaturas utilizadas no processamento dos ovos, catalisam as reações entre os lipídios e o oxigênio molecular, ocasionando a formação de óxidos (26,27).

Tabela 8. Valores médios de colesterol (mg/100g de gema, base seca) de ovos crus, cozidos e fritos armazenados a 25°C e a 5°C, analisados no tempo zero e semanalmente.

Colesterol (Lote 1)					
25 °C					
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	2481	2481	2481	2481	2481 ^A
Cozido	2387	2385	2387	2387	2387 ^A
Frito	2241	2242	2239	2244	2241 ^B
Média ^a	2369 ^a	2369 ^a	2369 ^a	2371 ^a	2370 ^A
5 °C					
Cru	2481	2480	2481	2480	2481 ^A
Cozido	2387	2386	2385	2386	2386 ^A
Frito	2241	2242	2239	2241	2241 ^B
Média ^a	2369 ^a	2369 ^a	2368 ^a	2369 ^a	2369 ^A
Colesterol (Lote 2)					
25 °C					
Preparo	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Cru	2480	2481	2481	2480	2482 ^A
Cozido	2387	2385	2387	2387	2386 ^A
Frito	2240	2242	2239	2243	2241 ^B
Média ^a	2369 ^a	2369 ^a	2369 ^a	2370 ^a	2370 ^A
5 °C					
Cru	2481	2480	2481	2480	2480 ^A
Cozido	2387	2385	2385	2385	2385 ^A
Frito	2240	2242	2241	2240	2241 ^B
Média ^a	2369 ^a	2369 ^a	2369 ^a	2368 ^a	2369 ^A

^a Médias de amostras em triplicata seguidas da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si a (P> 0,05).

Tabela 9. Valores médios dos óxidos de colesterol ($\mu\text{g/g}$ de gema, base seca) em ovos armazenados a 25 e 5°C do tempo zero e por mais 3 períodos semanais.

LOTE 1															
Preparo	7-ceto					7 β -OH					7 α -OH				
	25°C					25°C					25°C				
	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Frito	20,13 ^{Ab}	35,16 ^{Aa}	4,89 ^{Ac}	0,36 ^{Bd}	15,14 ^A	17,30 ^{Ab}	13,92 ^{Ab}	20,23 ^{Aa}	27,03 ^{Aa}	19,62 ^A	36,33 ^{Ab}	57,06 ^{Aa}	22,88 ^{Cb}	16,05 ^{Ac}	33,08 ^A
Cozido	0,48 ^{Bc}	34,74 ^{Ba}	1,46 ^{Bb}	2,04 ^{Ab}	9,62 ^B	14,61 ^{Ab}	17,47 ^{Aab}	23,17 ^{Aa}	24,92 ^{Aa}	20,04 ^A	20,42 ^{Ba}	14,24 ^{Bb}	13,20 ^{Bb}	5,70 ^{Bc}	17,36 ^B
Cru	0,36 ^{Bb}	0,75 ^{Ca}	0,23 ^{Cb}	Nd ^b	0,33 ^C	3,73 ^{Bb}	13,82 ^{Aa}	12,32 ^{Ba}	14,72 ^{Ba}	11,15 ^B	15,90 ^{Cb}	16,04 ^{Bab}	16,34 ^{Aa}	16,82 ^{Aa}	16,27 ^B
Média ^a	6,91 ^b	23,55 ^a	2,19 ^c	0,80 ^d	8,36 ^A	11,88 ^b	15,07 ^{ab}	18,57 ^a	22,22 ^a	16,94 ^A	24,22 ^a	29,11 ^a	17,47 ^b	12,86 ^b	22,23 ^A
Preparo	5°C					5°C					5°C				
	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Frito	20,13 ^{Aa}	11,07 ^{Bb}	0,53 ^{Bc}	0,31 ^{Bd}	8,02 ^A	17,30 ^{Ab}	16,49 ^{Ab}	24,83 ^{Aa}	29,45 ^{Aa}	22,52 ^A	36,33 ^{Abc}	45,02 ^{Aa}	25,77 ^{Ad}	30,77 ^{Ac}	34,47 ^A
Cozido	0,48 ^{Bc}	19,42 ^{Aa}	0,78 ^{Ab}	0,58 ^{Ab}	5,31 ^B	14,61 ^{Ab}	15,10 ^{Ab}	27,03 ^{Aa}	22,26 ^{Aa}	19,75 ^A	20,42 ^{Ba}	22,88 ^{Ba}	11,50 ^{Bc}	15,50 ^{Bb}	17,58 ^B
Cru	0,36 ^{Bb}	2,10 ^{Ca}	0,86 ^{Ab}	Nd ^b	0,91 ^C	3,73 ^{Ba}	8,42 ^{Ba}	6,00 ^{Ba}	4,92 ^{Ca}	5,77 ^B	15,90 ^{Cb}	8,42 ^{Cc}	24,42 ^{Aa}	14,40 ^{Bb}	15,78 ^B
Média ^a	7,10 ^b	10,86 ^a	0,72 ^c	0,30 ^d	4,75 ^B	11,88 ^b	13,34 ^b	19,29 ^a	18,88 ^a	16,01 ^A	24,22 ^a	25,44 ^a	20,56 ^b	20,22 ^b	22,61 ^A
LOTE 2															
Preparo	25°C					25°C					25°C				
	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Frito	20,11 ^{Ab}	35,09 ^{Aa}	4,90 ^{Ac}	5,17 ^{Bc}	18,81 ^A	16,66 ^{Ab}	18,85 ^{Ab}	25,58 ^{Aa}	29,05 ^{Aa}	22,54 ^A	39,04 ^{Ab}	56,92 ^{Aa}	12,90 ^{Cd}	16,08 ^{Ac}	31,23 ^A
Cozido	0,40 ^{Bc}	34,08 ^{Ba}	1,48 ^{Bb}	2,03 ^{Ab}	9,45 ^B	14,57 ^{Ab}	18,49 ^{Ab}	16,17 ^{Bb}	25,84 ^{Aa}	18,77 ^A	35,85 ^{Aa}	14,34 ^{Bb}	13,03 ^{Bb}	5,66 ^{Cc}	17,22 ^B
Cru	0,36 ^{Bb}	0,73 ^{Ca}	0,23 ^{Cc}	Nd	0,33 ^C	3,68 ^{Bb}	7,80 ^{Ba}	7,32 ^{Ca}	7,89 ^{Ba}	6,67 ^B	15,92 ^{Bb}	16,06 ^{Bab}	16,38 ^{Aa}	16,78 ^{Aa}	16,28 ^B
Média ^a	6,89 ^b	26,63 ^a	2,05 ^c	2,40 ^c	9,53 ^A	11,64 ^b	15,05 ^b	16,36 ^{ab}	20,93 ^a	15,99 ^A	30,27 ^a	29,10 ^a	14,10 ^b	12,84 ^b	21,57 ^A
Preparo	25°C					25°C					25°C				
	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a	T0	T1	T2	T3	Média ^a
Frito	20,11 ^{Aa}	11,05 ^{Bb}	0,55 ^{Bc}	0,30 ^{Bd}	8,00 ^A	16,66 ^{Ab}	20,37 ^{Ab}	36,85 ^{Aa}	42,41 ^{Aa}	29,07 ^A	36,66 ^{Ab}	30,37 ^{Ac}	36,85 ^{Ab}	22,41 ^{Aa}	39,07 ^A
Cozido	0,40 ^{Bd}	19,44 ^{Aa}	0,76 ^{Ab}	0,60 ^{Ac}	5,26 ^B	14,57 ^{Aa}	15,11 ^{Aa}	17,03 ^{Ba}	20,25 ^{Ba}	16,74 ^A	34,57 ^{Aa}	15,11 ^{Bc}	17,03 ^{Bc}	20,25 ^{Bb}	21,75 ^B
Cru	0,36 ^{Bb}	2,09 ^{Ca}	0,84 ^{Ab}	Nd	0,90 ^C	3,68 ^{Bb}	8,44 ^{Ba}	6,02 ^{Ba}	3,88 ^{Bb}	5,51 ^B	3,68 ^{Bc}	8,44 ^{Ca}	6,02 ^{Cb}	2,88 ^{Cc}	5,27 ^C
Média ^a	6,89 ^b	10,87 ^a	0,71 ^c	0,30 ^d	4,72 ^B	11,64 ^b	14,64 ^b	19,97 ^a	22,18 ^a	17,11 ^A	24,97 ^a	17,97 ^b	19,97 ^b	15,18 ^b	22,03 ^A

^a Médias de amostras em triplicata seguidas da mesma letra minúscula (maiúscula) em cada linha (coluna) não diferem entre si ($P > 0,05$). ^b não detectado

Van de Bovenkamp et al. (28) encontraram teores de 7-ceto em gemas de ovos frescos inferiores ao do presente estudo (0,2 µg/g). Por outro lado, em outro estudo, nenhum dos oito óxidos de colesterol comumente encontrados em alimentos foi detectado em ovos frescos (29).

Sarantinos et al. (30) utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa, determinaram valores inferiores de 7β-OH (34 a 59 µg/g de gema) em ovos fritos e cozidos e de 7α-OH (4 a 8 µg/g de gema) em ovos cozidos. No entanto, não detectaram 7-ceto em ovos cozidos e fritos e 7α-OH em ovos fritos, mas encontraram também triol, 4β-OH, 22-ceto e 5,6α-epoxi em ovos fritos e cozidos.

Na literatura não foi encontrado nenhum estudo sobre óxidos de colesterol e colesterol durante a estocagem de ovos *in natura*. No entanto, em amostras de ovo em pó, várias pesquisas verificaram que os óxidos aumentaram durante a estocagem (31,32,33). De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o período de armazenamento de 21 dias dos ovos não modificou os teores de lipídios totais e colesterol, mas reduziu consideravelmente os ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados, com concomitante aumento da concentração dos óxidos 7-ceto, 7α-OH e 7β-OH. Nas condições de armazenamento, apenas o óxido 7-ceto foi maior nos ovos que foram armazenados a 25°C, demonstrando a importância de se armazenar os ovos sob refrigeração para evitar a formação deste óxido. A fritura ocasionou maior redução nos teores de lipídios totais, colesterol e ácidos graxos e elevou as concentrações de óxidos de colesterol nos ovos.

LITERATURA CITADA

- (1) Kim, S.K.; Nawar, W.W. Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids*. **1993**, 10, 917-922.
- (2) Rankin, S.A.; Pike, O.A. Cholesterol autooxidation inhibition varies among several natural antioxidants in a aqueous model system. *J. Food. Sci.* **1993**, 58, 653-655.

- (3) Paniangvait, P.; King, A.J.; Jones, A.D.; German, B.G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.* **1995**, 60, 1159-1174.
- (4) 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 and drug anal.* **1999**, 7, 243-257.
- (5) 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.* **1989**, 52, 109-114.
- (6) Novelli, E.; Zanardi, E.; Ghiretti, G.P.; Campanini, G.; Dazzi, G.; Madarena, G.; Chizzolini, R. Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame milano and mordadella. *Meat Sci.* **1998**, 48, 29-40.
- (7) 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.* **1997**, 61, 573-576.
- (8) Kendall, C.;W.; Koo, M.; Sokoloff, E.; Kesava-Rao, G. Effects of dietary oxidized cholesterol on azoxymethane-induced colonic preoplasia in mice. *Cancer Lett.* **1992**, 66, 241-248.
- (9) Imao, K.; Wang, H.; Komatsu, M.; Hiramatsu, M. Free radical scavenging activity of fermented papaya preparation and its effect on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in iron-induced epileptic foci of rats, *Mol. Biol. Int.* **1998**, 45, 11-23.
- (10) Hino, T.; Kawanish, S.; Yasui, H.; Oka,S.; Sakurai. HHTHQ na antilipid-peroxidative compound: its chemical and biochemical characterizations *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**, 1425, 47-60.
- (11) Guardiola, F.; Codony, R.; Addis, P. B.; Rafecas, M. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxic.* **1996**, 34, 193-211.
- (12) Sevanian, A.; Peterson, A.R. The citotoxy and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxic.* **1986**, 24, 1103-1110.
- (13) Linseisen, J.; Wolfram, G. Origin, metabolism, and adverse health effects of cholesterol oxidation products. *Fett. Lipid.* **1998**, 211-218.

- (14) Folch, J.; Less, M.; Stanley, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* **1957**, 226, 497.
- (15) AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th edn.(Arlington,ed.), AOAC International, Official Method 963. 33. **1997**.
- (16) Josepf, J.D.; Ackman, R.G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study, *J. AOAC Intern.* **1992**, 75, 488-506.
- (17) Mazalli, M.R.; Bragagnolo, N. Estudo comparativo entre métodos e validação do método para determinação de ácidos graxos em ovos. Artigo encaminhado para a revista *Lipids*.
- (18) AOCS. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, 4th, edn. (Firestone, D., ed.), American Oil Chemists' Society Press, Champaign, **1989** Official Method Ce 1b-89.
- (19) Mazalli, M.R.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlim, M.N.; Bragagnolo, N. HPLC Method for Quantification and characterization of cholesterol and its oxidation products in eggs. *Lipids*, submetido.
- (20) Long, G.L.; Winefordner, J.D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* **1983**, 55, 712-724.
- (21) USDA. *Nutrient Database for Standard Reference*. Release 13, Poultry Products. Nutrient Data Laboratory, Agricultural Research Service: Beltsville, MD, **2000**; NDB nº 01133.
- (22) Galobart, J., and Guardiola, F. Formation and content of cholesterol oxidation products in egg and egg products, (Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., and Savage, G.P., eds.), AOCS Press, USA, **2002**, 127-145.
- (23) Nahtigal, B.; Smidovnik, A.; Golc-Wondra, A. Determination of fatty acids in ordinary and omega-enriched eggs, prepared in four different ways: raw, boiled for 3 and 8 minutes and fried, old 3/7 days and after 4 weeks of storage. *Czech. J. Food Sci.* **2000**, 18:138-141.

- (24) Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D. B. Comparison of the Cholesterol Content of Brazilian Chicken and Quail Eggs. *J. Food Comp. Anal.* 2002, 16, 147-153.
- (25) Beyer, R. S.; Jensen, L. S. Cholesterol content of commercially produced eggs in Georgia. *Poult. Sci.* **1989**, 68 1703-1706.
- (26) Tsai, L.S.; Hudson, C.A. Cholesterol oxides in ovo em pó dry egg products: isolation and identification. *J. Food Sci.* **1984**, 49, 1245-1248.
- (27) Morgan, J. N.; Armstrong, D. J. Quantification of cholesterol oxidation in egg yolk powder spray-dried with direct heating. *J. Food Sci.* **1992**, 57, 43-45,
- (28) Van de Bovenkamp, P.; Kosmeijer-Schuil, T.G.; Katan, M.B. Quantification of oxysterols in dutch foods: Egg products and mixed diets, *Lipids*, **1988**, 23, 1079-1085.
- (29) Nourooz-Zadeh, J., and Appelqvist, L. A. Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products, *J. Food Sci.* **1987**, 52, 57-67.
- (30) Sanrantinos, J.; O'Dea, K.; Sinclair, A.J. Cholesterol oxides in Australian foods: Identification and quantification. *Food Australia*, **1993**, 45, 485-490.
- (31) Obara, A.; Obiedzinski, M.; Kolczak, T. The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray and freeze-dried egg powders. *Food chem.* **2006**, 95, 173-179.
- (32) Fontana, A.; Antoniazzi, F; Ciavatta, M. L.; Trivillone, E.; Cimino, G. H-NMR study of cholesterol autoxidation in egg powder and cookies exposed to adverse storage. *J. Food. Sci.* **1993**, 58, 1286-1290.
- (33) 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. Chem.* **1995**, 43, 1127-1131.

CONCLUSÕES GERAIS

Os fatores estudados no planejamento experimental influenciaram os teores de colesterol e óxidos de colesterol. Com o uso da metodologia de superfície de resposta foi possível estabelecer as melhores condições de saponificação e extração da matéria insaponificável. O método proposto mostrou ter alta sensibilidade, precisão, recuperação e ser de fácil aplicação na separação e quantificação de colesterol e óxidos de colesterol em ovos. No entanto, é necessária a confirmação dos óxidos de colesterol, visto que alguns óxidos identificados por HPLC-UV-RI não foram confirmados por HPLC-APCI-MS.

A quantificação dos ácidos graxos por padronização interna de acordo com o método de Joseph and Ackman (1992), mostrou-se mais exata e precisa do que o método da metilação direta de Wang (2000). Embora seja necessária a extração dos lipídios totais, é de fácil execução.

Nas amostras de ovo em pó foram identificados 5 óxidos, os 7-cetocolesterol, 7 β -hidroxicoolesterol, 7 α -hidroxicoolesterol, 5,6 α -epoxicolesterol e 5,6 β -epoxicolesterol, os quais elevaram-se durante o período de estocagem. As altas temperaturas utilizadas no processo de desidratação dos ovos por “spray-dryer” e a presença de óxido nítrico produzido durante o processamento elevaram consideravelmente os teores de óxidos de colesterol e de ácidos graxos *trans* nos ovos.

Nos ovos comuns e nos ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3 foram identificados 3 óxidos, os 7-cetocolesterol, 7 β -hidroxicoolesterol e 7 α -hidroxicoolesterol, onde o processamento térmico, especialmente a fritura aumentou as concentrações destes óxidos e reduziu os teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos nos ovos. O período de estocagem dos ovos comuns e dos ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3 de 21 e 45 dias, respectivamente, não modificou os teores de colesterol e lipídios totais, mas reduziu expressivamente as concentrações de ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados, com concomitante aumento das concentrações dos óxidos

7-cetocolesterol, 7 β -hidroxicoolesterol e 7 α -hidroxicoolesterol nos ovos. Nas condições de armazenamento de 5 e 25 °C, apenas o óxido 7-cetocolesterol foi maior nos ovos que foram armazenados a 25 °C, demonstrando a importância de se armazenar os ovos sob refrigeração para evitar a formação deste óxido.

Considerando que os ovos em pó desidratados são utilizados na formulação de vários produtos alimentícios amplamente consumidos pela população, principalmente a infantil, a presença de elevados teores de óxidos de colesterol e ácidos graxos *trans* torna-se um problema de saúde pública.

Apesar dos ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3 terem apresentado melhor perfil lipídico sob o aspecto nutricional em relação aos ovos comuns e ovo em pó, ainda assim apresentaram óxidos de colesterol. Desta forma, a concentração e o tipo de antioxidante adicionado em rações comerciais de aves, enriquecidas com fonte de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, deve ser reavaliada para garantir a qualidade nutricional dos ovos.