

ELISÂNGELA SERENATO MADALOZZO

"AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO DO COLESTEROL EM SISTEMAS MODELO CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS, MIOGLOBINA E ANTIOXIDANTES NATURAIS E SINTÉTICOS"

CAMPINAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ELISÂNGELA SERENATO MADALOZZO

"AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO DO COLESTEROL EM SISTEMAS MODELO CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS, MIOGLOBINA E ANTIOXIDANTES NATURAIS E SINTÉTICOS"

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências de Alimentos.

Orientador(a): Profa. Dra. Neura Bragagnolo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE

DEFENDIDA PELA ALUNA ELISÂNGELA SERENATO MADALOZZO

E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. NEURA BRAGAGNOLO

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos Claudia Aparecida Romano de Souza – CRB 8/5816

Madalozzo, Elisângela Serenato, 1986-

M26a Avaliação da oxidação do colesterol em sistemas modelo contendo ácidos graxos, mioglobina e antioxidantes naturais e sintéticos / Elisângela Serenato Madalozzo. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Neura Bragagnolo.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácido eicosapentaenoico. 2. Mioglobina. 3. Antioxidantes. 4. Termooxidação. I. Bragagnolo, Neura. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro Idioma: Evaluation of cholesterol oxidation in model systems containing fatty acids, myoglobin and natural and synthetic antioxidants

Palavras-chave em ingles: Eicosapentaenoic acid Myoglobin Antioxidants Thermo-oxidation Área de concentração: Ciência de Alimentos Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos Banca examinadora: Neura Bragagnol [orientador] Gislaine Chrystina Nogueira de Faria Lilian Regina Barros Mariutti Mônica Roberta Mazalli Sueli Regina Baggio Data da defesa: 23-05-2014 Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Banca examinadora

Profa. Dra. Neura Bragagnolo Orientadora

Dra. Gislaine Chrystina Nogueira de Faria Membro titular Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP)

Dra. Lilian Regina Barros Mariutti Membro titular Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP)

> Prof. Dra. Monica Roberta Mazalli Membro titular Universidade de São Paulo (FZEA/USP)

Dra. Sueli Regina Baggio Membro titular Instituto de Tecnologia de Alimentos (CCQA/ITAL)

Dr. Marcelo Antonio Morgano Membro suplente Instituto de Tecnologia de Alimentos (CCQA/ITAL)

Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano Membro suplente Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP)

Prof. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres Membro suplente Universidade de São Paulo (FSP/USP)

RESUMO GERAL

O colesterol é um dos mais importantes esteróis existentes nos tecidos animais, podendo apresentar-se na forma livre ou como ésteres de colesterol. Comporta-se de maneira particular em relação à oxidação por apresentar uma ligação dupla entre o carbono 5 e 6 da estrutura cíclica, originando produtos de oxidação, denominados óxidos de colesterol (COP's), principalmente quando exposto a temperaturas elevadas, iniciadores de radicais, luz, metais ou à combinação destes fatores. Por isso, o objetivo deste trabalho foi constatar o impacto do uso de diferentes antioxidantes (eritorbato de sódio, bixina e ácido cítrico) na degradação térmica do colesterol em sistemas modelo na presença de metais (mioglobina) e de ácidos graxos com diferentes graus de insaturação (ácido oleico, ácido eicosapentaenoico - EPA e ácido palmítico) sob fluxo constante de O₂ (10 mL/min). A ação dos antioxidantes, pró-oxidante e ácidos graxos foi monitorada pela degradação do colesterol e consequente formação de COP's e alteração na composição de ácidos graxos, bem como pela degradação dos antioxidantes adicionados aos sistemas modelo submetidos a temperaturas de 130, 160 e 230°C. Para avaliar a interação entre o colesterol e os diferentes compostos nos sistemas modelo foi realizado um planejamento experimental do tipo Plackett & Burman para cada temperatura estudada. Os resultados demosntraram que o sistema modelo constituído de colesterol, bixina, ácido oleico e mioglobina (ensaio 11) foi o que apresentou a maior degradação do colesterol e maior concentração de óxidos. Já o sistema modelo que apresentou a menor degradação do colesterol foi o 1 que apresenta em sua composição colesterol, eritorbato de sódio, ácido cítrico e mioglobina. Para a temperatura de 230°C os ensaios que apresentaram a menor degradação continham colesterol, eritorbato de sódio, ácido cítrico e mioglobina (ensaio 1) e eritorbato de sódio, bixina e ácido palmítico (ensaio 2). Cinco COP's foram identificados e quantificados nos sistemas (7-ceto, 7α-OH, 7β-OH, 5,6α-epóxido e 5,6βepóxido). O óxido encontrado em maior quantidade nas temperaturas de 130 e 160°C foi o 5,6β-epóxido, já na temperatura de 230°C foi o 7-ceto. Esses resultados demonstram que a maior formação de COP's está diretamente relacionada com a maior degradação do colesterol nas temperaturas estudadas.

vii

Palavras-chave: óxidos de colesterol, mioglobina, ácido eicosapentaenoico, antioxidante, termo-oxidação.

ABSTRACT

Cholesterol is one of the most important sterols in animal tissue in its free form or as esters. This compound presents an unique behavior in relation to oxidation since it has a double bond between carbons 5 and 6 of the cyclic structure, generating oxidation products, the so called cholesterol oxides (COP's), especially when exposed to high temperature, radical initiators, light, metal or a combination of these factors. Therefore, the aim of this study was to study the impact of different antioxidants (sodium erythorbate, citric acid and bixin) on thermal degradation of cholesterol in model systems in the presence of metals (myoglobin) and fatty acids with different degrees of unsaturation (oleic acid, eicosapentaenoic acid - EPA and palmitic acid) at constant O₂ flow (10 ml/min). The effect of antioxidants, pro-oxidant and fatty acids was monitored by the degradation of cholesterol and the consequent formation of COP's, by the changes in the fatty acid composition, as well as by the degradation of the antioxidants added to model systems subjected to 130, 160 and 230°C. To evaluate the interaction between cholesterol and the different compounds present in the model systems a Plackett & Burman experimental design was carried out in each temperature. The model system containing cholesterol, bixin, oleic acid and myoglobin (sample 11) showed the highest degradation of cholesterol and concentration of COP's. The lowest degradation of cholesterol was observed in sample 1, containing cholesterol, sodium erythorbate, citric acid and myoglobin. At 230°C, the samples that showed the lowest degradation contained cholesterol, sodium erythorbate, citric acid and myoglobin (sample 1) and sodium erythorbate, bixin and palmitic acid (sample 2). Five COP's were identified and quantified in the model systems (7-keto, 7α-OH, 7β-OH, 5,6α-epoxide and 5,6β-epoxide). The COP present in the highest content at 130°C and 160°C was 5,6βepoxide, and at 230°C, 7-keto. These results demonstrated that a high formation of COP's is directly related to a high degradation of cholesterol at the studied temperatures.

Keywords: cholesterol oxides, myoglobin, eicosapentaenoic acid, antioxidant, thermooxidation.

ix

ÍNDICE

RES	UMO GERAL	ix
ABS	TRACT	xiii
INTF	RODUÇÃO GERAL	1
САР	ÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	5
1.	Colesterol e óxidos de colesterol	7
2.	Fontes dietéticas e absorção de óxidos de colesterol	9
3.	Influência do processamento e composição na oxidação do colesterol em	
	alimentos	10
4.	Ação dos antioxidantes na oxidação do colesterol	15
5.	Pró-oxidantes e a oxidação do colesterol	18
6.	Formação de óxidos de colesterol em sistemas modelo	21
Refe	rências	25

CAPÍ	TULO II – INTERAÇÃO ENTRE DIFERENTES COMPOSTOS NA	
OXID	AÇÃO DO COLESTEROL E FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE	
COLE	STEROL	39
Resur	no	41
1.	Introdução	42
2.	Materiais e métodos	43
2.1	Reagentes e solventes	43

2.2	Preparo das soluções dos sistemas modelo	44	
2.3	Prepado dos sistemas modelo	45	
2.4	Quantificação do colesterol e óxidos de colesterol	47	
2.5	Determinação de ácidos graxos	49	
2.6	Determinação de ácido cítrico e eritorbato de sódio	50	
2.7	Determinação de bixina	51	
2.8	Análise estatística	51	
3.	Resultados e discussão	52	
3.1	Degradação do colesterol	52	
3.2	Formação de óxidos de colesterol	65	
3.3	Confirmação da identidade dos óxidos de colesterol	85	
4.	Conclusão	89	
Mate	Material Suplementar		
Refer	Referências		

CAPÍTULO III - DEGRADAÇÃO DO COLESTEROL E FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EM SISTEMAS MODELO SUBMETIDOS À TEMPERATURA DE 230°C E FLUXO CONSTANTE DE O₂..... 111 Resumo 113 1. Introdução..... 114 Materiais e métodos..... 2. 116 Reagentes e solventes..... 2.1 116 2.2 Preparo das soluções dos sistemas modelo..... 116

2.3	Preparo dos sistemas modelo	117	
2.4	Quantificação e confirmação do colesterol e óxidos de colesterol	120	
2.5	Determinação de ácidos graxos	121	
2.6	Determinação de ácido cítrico e eritorbato de sódio	121	
2.7	Determinação de bixina	122	
2.8	Análise estatística	123	
3.	Resultados e discussão	123	
3.1	Degradação do colesterol	123	
3.2	Formação de óxidos de colesterol	130	
3.3	Confirmação da identidade dos óxidos de colesterol	138	
4.	Conclusão	143	
Mate	Material suplementar		
Refer	Referências		
CON	CONCLUSÃO GERAL		

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e estar ao meu lado incondicionalmente.

À minha família, pelo amor acima de tudo e pelo incentivo à minha formação, não medindo esforços para que minhas escolhas fossem realizadas.

À Profa. Dra. Neura Bragagnolo pela orientação durante a execução da minha tese de doutorado, o qual contribuiu para meu crescimento profissional.

Aos amigos do Laboratório de Química de Alimentos (FEA – Unicamp), pela convivência, amizade e aprendizado: Adones, Adria, Aline, Ana Augusta, Bruno, Camila, Daniele, Débora, Eliseu, Fabiane, Fernanda, Gilsandro, Hugo, Karla, Kleidson, Lilian, Lizziane, Lucas, Marcella, Mery, Naira, Poliana, Regiane, Renan, Sarah, Rosemar e Walkíria. Aos amigos da FEA Michelle, Georgia, Márcio, Poliane e Larissa e tantos outros, por toda a amizade.

Em especial à Fernanda e à Michelle que foram extremamente especiais, por dividirem não somente a casa, mas também a amizade, o companheirismo, as alegrias e as tristezas, sempre me incentivando. Muito obrigada meninas!!!

Aos membros, titulares e suplentes da banca pelas contribuições, críticas e sugestões.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e ao Departamento de Ciência de Alimentos pela estrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro.

xvii

INTRODUÇÃO GERAL

O colesterol é um composto biológico importante, responsável pela síntese de hormônios sexuais, de vitamina D₃, e de ácidos biliares, bem como pela manutenção da permeabilidade da membrana celular (Chien et al., 2006; Lee et al., 2008).

O colesterol comporta-se de maneira particular em relação à oxidação devido à ligação dupla e ao grupamento hidroxila presentes nas posições 5 e 3, respectivamente, da estrutura cíclica, originando os produtos de oxidação do colesterol ou COP's (Smith, 1987), sendo passível de sofrer oxidação quando exposto a várias condições como, temperaturas elevadas, ar, iniciadores de radicais, luz, metais ou à combinação destes fatores.

A sua estabilidade térmica está associada ao binômio tempo e temperatura, sendo reduzida com o aumento destes parâmetros. Quando o colesterol é aquecido em presença de oxigênio ocorre a sua auto-oxidação, processo pelo qual ocorre principalmente a formação de COP's, cuja relevância toxicológica resulta de seus efeitos potencialmente aterogênicos, citotóxicos e mutagênicos e possivelmente carcinogênicos (Guardiola et al., 1996; Leonarduzzi et al., 2002; Osada, 2002; Garcia-Cruset et al., 2002).

A auto-oxidação do colesterol é um processo de reações em cadeia, baseado na formação de radicais, semelhante à auto-oxidação dos lipídios insaturados. Os hidroperóxidos formados durante a oxidação lipídica dos ácidos graxos podem ser necessários para a iniciação da oxidação do colesterol (Smith, 1987).

Diferentes processos tecnológicos ou mesmo empregados na preparação doméstica dos alimentos, como cozimento em água, em forno elétrico ou convencional

a gás, micro-ondas, grelha, fritura, secagem em *spray dryer*, além do armazenamento à temperatura ambiente, de refrigeração ou congelamento podem interferir diretamente na velocidade de formação dos COP's.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto de diferentes antioxidantes (bixina, ácido cítrico e eritorbato de sódio), ácidos graxos com diferentes graus de instauração (ácido palmítico, ácido oleico е ácido eicosapentaenoico - EPA) e pró-oxidante (mioglobina) na auto-oxidação do colesterol e a formação de COP's. Para tanto, foram desenvolvidos sistemas modelo de acordo com um planejamento experimental Plackett & Burman. Esses sistemas foram submetidos ao aquecimento em diferentes temperaturas (130, 160 e 230°C) sob fluxo constante de O₂. Para atingir os objetivos foram realizadas análises de colesterol, COP's e monitoradas as degradações ocorridas com os antioxidantes, ácidos graxos e pró-oxidante.

Referências

Chien, J. T.; Hsu, D. J.; Chen, B. H. (2006) Kinect model for studying the effect of quercetin on cholesterol oxidation during heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1486-1492.

Garcia-Cruset, S.; Carpenter, K. L. H.; Codony, R.; Guardiola, F. (2002) Cholesterol oxidation products and atherosclerosis. In: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence and biological effects*. Champaign, AOAC Press.

Guardiola, F.; Codony, R.; Addis, P. B.; Rafecas, M.; Boatella, J. (1996) Biological effects of oxysterols: Current status. *Food and Chemical Toxicology*, 34: 193-211.

Lee, H. W.; Chien, J. T.; Chen, B. H. (2008) Inhibition of cholesterol oxidation in marinated foods as affected by antioxidants during heating. *Food Chemistry*, 108: 234-244.

Leonarduzzi, G.; Sottero, B.; Poli, G. (2002) Oxidized products of cholesterol: Dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 700-710.

Osada, K. (2002) Cholesterol oxidation products: Other biological effects. Guardiola, F. In: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurence and biological effects*. Champaign: AOAC Press.

Smith, L. L. (1987) Cholesterol autoxidation 1981-1986. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44: 87-125.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. Colesterol e óxidos de colesterol

O colesterol é um lipídio tetracíclico de crescente importância biológica, descoberto em 1758 e nomeado de "*cholesterine*" por Christian Chevreul, em 1815 (Poirot e Silvente-Poirot, 2012). O colesterol, sintetizado a partir da dieta afeta largamente as propriedades biofísicas das membranas e as funções celulares em uma variedade de vias sintéticas, incluindo a dos ácidos biliares, hormônios e, através de seu precursor 7-dehidrocolesterol, a síntese de vitamina D. A maioria dessas ações são associadas com a oxidação do colesterol ocorrendo por via enzimática ou mecanismos não enzimáticos (Iuliano, 2011).

A molécula de colesterol não é reativa por si só, tendo que passar por mudanças estruturais para adquirir reatividade suficiente para que se oxide. Neste contexto, são formados vários produtos da oxidação, denominados óxidos de colesterol (COP's). Esses produtos são de interesse como mediadores reativos e de alterações estruturais do sistema vascular podendo aumentar a incidência de aterosclerose (Imai et al., 1980; Schroepfer Jr., 2000).

Os COP's são produzidos através de reações enzimáticas que refletem a existência de uma via metabólica, mas também são produzidos através de mecanismos de auto-oxidação não enzimáticos, que são associados com patologias inflamatórias (Schroepfer Jr., 2000). No entanto, é interessante notar que a maioria dos COP's podem ser produzidos através de reações químicas, sendo caracterizados antes mesmo da descoberta das enzimas responsáveis pela sua biossíntese (Smith, 1996).

A oxidação não enzimática dos COP's é mediada, de maneira geral, por espécies reativas pró-oxidantes (Hodis et al., 1991; Hodis et al., 1992). Além das

espécies reativas de oxigênio (ROS) envolvidas na auto-oxidação do colesterol exógeno, em tecidos animais, a mesma pode também ser mediada por radicais derivados da peroxidação lipídica como, peroxila (ROO·) ou alcoxila (RO·) (Smith e Johnson, 1989).

Em mamíferos, a principal via enzimática envolvendo o colesterol é a sua monohidroxilação na síntese de ácidos biliares e de hormônios esteróides, e duas enzimas chave da biossíntese dos ácidos biliares são as responsáveis, a 27-hidroxilase e a 7αhidroxilase (Russell e Setchell, 1992). A enzima 27-hidroxilase desempenha um importante papel na degradação hepática da cadeia lateral de colesterol, durante a formação de ácidos biliares (Björkhem et al., 1994; Björkhem, 1992). Esta enzima está presente não só nos hepatócitos, mas também em vários outros tipos de células, incluindo leucócitos e células endoteliais. A síntese de 7a-hidroxilados no fígado é mediada por duas vias distintas que envolvem 7α-hidroxilase. Os óxidos 7αhidroxicolesterol (7 α -OH) e 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH) podem ser gerados por esta enzima, com a eventual participação da inversão enzimática entre os dois epímeros (Smith, 1996). Por exemplo, no fígado ocorre a conversão enzimática de colesterol em 7-cetocolesterol (7-ceto) e de 7-ceto em 7 β -OH. A contribuição real da via enzimática e não enzimática para a quantidade total de COP's encontrados in vivo permanece incerta, mas o que prevalece é que ambos os caminhos podem ter um impacto biológico considerável (Leonarduzzi et al., 2002).

A susceptibilidade do colesterol à oxidação não enzimática gerou um interesse considerável nos COP's como potenciais marcadores para o estudo não invasivo de estresse oxidativo *in vivo*. O interesse nos COP's decorre da atividade biológica dos

mesmos, o que pode ser útil para elucidar as vias fisiopatológicas de doenças humanas

e para o desenvolvimento de fármacos (luliano, 2011).

A tabela 1 mostra a origem dos COP's no plasma e tecidos.

Tabela 1 – Origem dos COP's no plasma e tecidos

FONTE EXÓGENA		
DIETA:		
- Presente nos alimentos (carnes, ovos, leite, etc.);		
- Formados por auto-oxidação dos alimentos (induzida pelo calor,		
exposição à luz, refrigeração).		
FONTE ENDÓGENA		
VIA ENZIMÁTICA:		
- 7α-hidroxilase;		
- 27-hidroxilase;		
- 7-cetona desidrogenase;		
- 5,6α-epoxidase;		

VIA NÃO ENZIMÁTICA:

- Ataque por espécies reativas de O2;

- Ataque por radicais peroxila e alcoxila da peroxidação lipídica;

- Sistema leucócito/H₂O₂/HOCI.

(Fonte: Leonarduzzi et al., 2002)

2. Fontes dietéticas e absorção de óxidos de colesterol

O colesterol está presente em diversos alimentos como carnes (bovina, suína, aves e peixes), leite e ovos e todos esses alimentos são susceptíveis a oxidação, em especial aqueles que são desidratados, submetido à radiação ou temperaturas elevadas, ou preparados na presença de oxigênio. Sob todas estas condições, os alimentos são expostos a ROS, como oxigênio singlete ($^{1}O_{2}$), peróxido de hidrogênio ($H_{2}O_{2}$), radical hidroxila (HO_{2}) e ozônio (O_{3}). Não só o processamento, mas também o

armazenamento por longos períodos de produtos que não estão sob vácuo, aumentam significativamente a formação de COP's. Os COP's mais abundantes em alimentos processados são o 7-ceto, o 7 α -OH, o 7 β -OH, o 5,6 α -epoxicolesterol (5,6 α -epóxido), o 5,6 β -epoxicolesterol (5,6 β -epóxido) e o colestanotriol (triol). Já o 25-hidroxicolesterol (25-OH), o 19-hidroxicolesterol (19-OH), o 20 α -hidroxicolesterol (20 α -OH), o 3 β -hidroxi-5,6 α -colestanona e a 3 β -hidroxi-5,6 α -dihidroxicolestanona estão presentes em quantidades muito baixas nos alimentos (Leonarduzzi et al., 2002).

Estudos em seres humanos e animais têm demonstrado que os COP's ingeridos através da dieta são absorvidos principalmente no trato intestinal superior e, em seguida, transportados pelo plasma dentro dos quilomícrons. Após a lipólise, pela ação da lipoproteína lipase endotelial, os excessos são rapidamente eliminados pelo fígado. Ainda existe discrepância com relação à taxa de absorção dos COP's em comparação com a de colesterol não oxidado, sendo relatado na literatura que a absorção de COP's pode ser superior, inferior ou semelhante a do colesterol não oxidado (Leonarduzzi et al., 2002).

3. Influência do processamento e composição na oxidação do colesterol em alimentos

Os consumidores modernos exigem alimentos nutritivos com propriedades funcionais. No entanto, a oxidação é uma das principais causas da deterioração de alimentos de origem animal contendo lipídios, através dos seus efeitos negativos na qualidade sensorial e valor nutritivo, podendo também ser responsável pela produção de compostos tóxicos (Ghiretti et al., 1997). A formação de produtos secundários de

oxidação do colesterol em carnes é de grande preocupação, pois estes compostos são conhecidos por serem absorvidos a partir de fontes alimentares (Emanuel et al., 1991).

Vários fatores, como a composição lipídica, as condições de processamento, a presença das substâncias pró-oxidantes, as condições de armazenamento (Leonarduzzi et al., 2002) ou a irradiação (Boselli et al., 2005) podem influenciar a oxidação do colesterol. As práticas nos processamentos de carnes, como cortar e cozinhar rompem as membranas das células, facilitam às interações de ácidos graxos insaturados com pró-oxidantes podendo acelerar a oxidação de lípidios como ácidos graxos e colesterol (Flaczyk et al., 2006).

Os principais tratamentos térmicos empregados em alimentos ricos em colesterol utiliza o binômio tempo x temperatura para garantir que se atinja o objetivo desejado. Dessa forma, as condições dependem da matriz utilizada e também do processamento. De modo geral, quanto menor o tempo de exposição é utilizada uma maior a temperatura. E ao contrário no armazenamento, quanto menor a temperatura maior será o tempo de armazenamento que poderá ser empregado. Quanto maior a temperatura atingida, maior será a degradação e formação de COP's. Porém, se o tempo de aquecimento for elevado poderá ocorrer a degradação não apenas do colesterol, mas também dos produtos da oxidação, dando origem assim a outros COP's e produtos ainda desconhecidos (Park e Addis, 1986). Desta forma, a degradação do colesterol durante o processamento pode levar a formação, além de COP's, de outros produtos de maior peso molecular, como polímeros e outros compostos ainda não identificados (Kim e Nawar, 1993; Hur et al., 2007).

Em temperaturas abaixo do ponto de fusão do colesterol (140°C) podem-se citar alguns processos domésticos que podem ser empregados, como cozimento em água, em grelha ou em micro-ondas, considerando assim, o comportamento do colesterol no seu estado natural em que se encontra nas matrizes alimentícias, sendo portanto susceptível às interações com outros compostos como ácidos graxos, pigmentos naturais, vitaminas, minerais, entre outros que possam compor os alimentos (Guardiola et al., 1995). Acima do ponto de fusão, quando o colesterol deixa de ser sólido, a auto-oxidação ocorre mais rapidamente, podendo ocorrer também a degradação dos produtos dessa reação. Nesta faixa de temperatura, encontram-se ainda alguns outros processos como a secagem em *spray dryer*, a fritura e o uso de forno convencional à gás ou elétrico que podem atingir temperaturas até 250°C e, dependendo do tempo empregado nesses tratamentos térmicos mais intensos, pode ocorrer uma maior oxidação e degradação do colesterol, bem como a degradação dos óxidos formados.

Grande parte dos trabalhos publicados na literatura mensura a oxidação do colesterol como teor total de óxidos, referindo-se a soma dos principais COP's encontrados nos alimentos, sendo eles 7-ceto, 7 α - e 7 β -OH, 25-OH e 5,6 α - e 5,6 β -epóxidos e, de outros não tão comumente encontrados, como o triol (McCluskey et al., 1997). Em geral, o 7-ceto é formado preferencialmente, sendo o óxido de colesterol com maior incidência nos alimentos submetidos a tratamento térmico. Este tem sido utilizado como marcador da oxidação do colesterol (Nouroozzadeh e Appelqvist, 1988; Pie et al., 1990; Rodriguez-Estrada et al., 1997; Galvin et al., 2000). Entretanto, o 7-ceto pode se degradar (Rodriguez-Estrada et al., 1997) e apenas a sua quantificação pode subestimar a oxidação do colesterol.

Condições drásticas de processamento como o emprego de altas temperaturas (acima de 100°C) de aquecimento por períodos de tempo acima de 10 min ou armazenamento por tempo prolongado (acima de 6 meses) a altas temperaturas (geralmente em temperaturas acima de 20°C), são responsáveis pela formação de COP's em leite e derivados como manteiga, queijos, creme de leite, entre outros (Sieber, 2005). Pikul et al. (2013) avaliaram a alteração do colesterol e formação de COP's durante o armazenamento de leite UHT bovino e caprino. Independentemente do tipo de leite e das condições de armazenamento, observou-se um aumento significativo nas quantidades totais de COP's após 6 meses de estocagem. Os resultados demonstraram que a temperatura e o tempo foram os fatores mais importantes para essa formação. Alguns autores observaram que, durante o aquecimento de manteiga há um aumento crescente no teor de COP's em função do aumento do tempo de exposição e da temperatura de aquecimento. Quando aquecida por 30 min em temperatura entre 170-180°C apresentou maior incidência de 7-ceto (Pie et al., 1990; Rose-Sallin et al., 1997) enquanto à temperaturas mais altas (205-210°C, 30 min), a maior incidência foi de 7β -OH (Rose-Sallin et al., 1997).

Produtos preparados à base de carnes como hambúrgueres e almôndegas são bastante susceptíveis à formação de COP's. Larkeson e colaboradores (2000) determinaram teores de colesterol em amostras de almôndegas cruas e pré-fritas e em hambúrgueres pré-fritos (50% de carne bovina + 50% de carne suína) e crus (100% carne bovina). Seis COP's foram encontrados nas amostras, entre eles: 7 α - e 7 β -OH, 7-ceto, 5,6 α - e 5,6 β -epóxidos e triol. A maior incidência de óxidos nas almôndegas pode ser explicada pela alteração na composição de ácidos graxos, já que foram

formuladas com uma mistura de carne suína e bovina (50% de cada), enquanto o hambúrguer foi fabricado com 100% de carne bovina. Durante o armazenamento (-20°C) destes produtos o teor total de COP's aumentou após 1 e 2 semanas de armazenamento, respectivamente. Este estudo mostrou que as carnes preparadas na hora do consumo apresentam menores quantidades de COP's em comparação com carnes armazenadas mesmo que por pequenos períodos de tempo como 1 ou 2 semanas.

Em trabalho desenvolvido com peito de frango grelhado a 220°C por 20 min, Mariutti et al. (2008a) observaram que as amostras apresentaram um teor total de óxidos 60 % maior (27,1 μ g/g) que o encontrado no peito de frango cru, sendo a maior formação de 7-cetocolesterol, correspondendo a 35 % dos óxidos totais e uma pequena redução de 8 % de 22*R*-OH.

Os peixes, de maneira geral, também podem estar sujeitos à formação de COP's. Saldanha (2006) analisando amostras de bacalhau seco e salgado observou a diminuição significativa das concentrações dos ácidos eicopentaenoico (EPA) e DHA (docosaexaenoico) durante o armazenamento em presença de luz. As análises demonstraram também que houve aumento nos níveis de COP's sendo estes influenciados principalmente pela fotoxidação. Em estudo realizado com pescadas e sardinhas congeladas e posteriormente grelhadas a 165°C/4 min, houve um decréscimo acentuado nas concentrações de colesterol e de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, principalmente dos ácidos graxos da família n-3, EPA e DHA com simultânea elevação dos teores de 19-OH, 22*S*-OH, 24*S*-OH, 22*S*-OH, 7-ceto e 25*R*-OH (Saldanha et al., 2008). Assim como os peixes, o camarão

também é bastante susceptível à oxidação. Simon et al. (2012), em trabalho desenvolvido com camarão pitu frito a 160°C por 5 min, verificaram que a quantidade dos óxidos encontrados (7-ceto e triol) permaneceu praticamente inalterada, quando se compara as amostras cruas com as fritas.

Não se sabe exatamente qual parâmetro é o mais impactante na oxidação do colesterol e formação de COP's, se o tempo de exposição, a temperatura ou a combinação de ambos, em função do tipo de transferência de calor que ocorre em cada processo.

4. Ação dos antioxidantes na oxidação do colesterol

Segundo a definição de Halliwell e Guteridge (1999), antioxidante é uma substância que, quando se encontra em baixas concentrações comparadas com as do substrato oxidável, previne ou retarda a reação de oxidação. Os mecanismos através dos quais os antioxidantes, em alimentos, exercem sua ação podem ser divididos em duas possíveis vias: reações de transferência de um átomo de hidrogênio (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT) ou de transferência de um elétron (*Single Electron Transfer*, SET) (Prior et al., 2005). Ainda têm-se os agentes quelantes/seqüestrantes que complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (Bailey, 1996; Labuza & Dugan, 1971).

Ao contrário da reação HAT, na reação SET o antioxidante transfere um elétron para reduzir o composto, incluindo metais, carbonilas e radicais. Os compostos

fenólicos e os carotenoides podem atuar como antioxidante primário, reagindo diretamente com os radicais, e formando um novo radical menos reativo que o radical inicial ou reagir como antioxidante secundário regenerando ou potencializando outros sistemas antioxidantes, como certas enzimas (Gorinstein et al., 2000). Os carotenoides podem ainda capturar radical peroxila mediante transferência de elétrons ou seqüestro de átomos de hidrogênio, estes mecanismos levam à formação de uma grande variedade de radicais carotenoides (Choe & Min, 2006). Em função da posição que o carotenóide ocupa na membrana lipídica (estando orientado para fase aquosa ou para a orgânica), na reação de um mesmo carotenoide com um mesmo radical, podem surgir diferentes produtos (El-Agamey et al., 2004).

Por outro lado, os carotenoides são reconhecidamente eficientes na desativação do oxigênio no estado singlete (${}^{1}O_{2}$) (Di Mascio et al., 1989; Montenegro et al, 2004; Rios et al., 2007). Sua capacidade de desativação depende do número de ligações duplas conjugadas presente na cadeia poliênica do carotenoide, e podem apresentar efeitos sinergísticos com outros antioxidantes como a vitamina E ou C (Stahl & Sies, 2005).

Já os ascorbatos são os agentes redutores capazes de inibir a oxidação de lípidios por inativação de radicais (Decker & Mei, 1996); a adição de ascorbato em alimentos frescos também pode manter a mioglobina no seu estado reduzido (ferroso) (Shivas et al., 1984). O efeito final de ascorbatos na estabilidade oxidativa parece ser dependente da concentração. Baixas concentrações de ascorbato podem gerar um efeito pró-oxidante (Ramanathanm & Das, 1992; St. Angelo et al., 1988), enquanto que altas concentrações de ascorbato parecem ser antioxidante (Shantha, et al., 1994; St.

Angelo et al., 1988). O eritorbato (D-isoascorbato) é um estereoisômero do ácido ascórbico com potencial redox semelhante, sendo comumente adicionado aos alimentos (Lee et al., 2005).

A oxidação do colesterol pode ser minimizada ou retardada pela ação de compostos que reduzem a formação dos radicais ou atuam quelando metais presentes no meio (Maraschiello et al., 1998; Castro et al., 2011).

A adição de antioxidantes sintéticos como o galato de propila, butil-hidroxianizol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) (Morgan e Armstrong, 1987), palmitato de ascorbila (Huber et al. 1995) e antioxidantes naturais como os condimentos (Bragagnolo et al., 2007; Mariutti et al., 2008b; Bragagnolo, 2009; Mariutti, 2009) são utilizados para retardar ou prevenir as reações de oxidação lipídica nos alimentos.

O uso de antioxidantes pode reduzir ou até inibir a formação de COP's no processamento de carnes. Produtos como o eritorbato de sódio foram atribuídos como responsáveis pela conservação de produtos derivados de carne, de frango, de carne processadas termicamente e de peru (Baggio et al., 2005; Baggio e Bragagnolo, 2008).

A capacidade antioxidante de antocianinas e tocóis (tocoferol e tocotrienol) de extratos de farelo de arroz preto foi avaliada utilizando emulsões contendo colesterol ou óleo de peixe. As emulsões foram preparadas com diferentes concentrações dos extratos de antocianinas e de tocóis. Esses sistemas foram aquecidos em banho-maria a 37°C e as amostras foram retiradas para análise em 0, 1, 2, 3, 5 e 7 dias. Os resultados mostraram que as emulsões contendo extratos de antocianinas e tocóis foram capazes de reduzir a formação de COP's quando comparados com emulsões

sem adição de antioxidantes. Em comparação com o extrato de tocóis, o extrato de antocianinas, apresentou uma capacidade relativamente maior da estabilização do colesterol, mas com menor inibição da oxidação dos ácidos graxos (Zhang et al., 2013).

Os antioxidantes naturais como a combinação de sálvia (0,2 % m/m), orégano (0,2 % m/m) e mel (5 ou 10 % m/m) foram capazes de reduzir a oxidação lipídica em coxas e peito de frango cozidos refrigerados e armazenados por 48 e 96 horas a 4°C. Apenas vestígios de 25-OH, 7-ceto, 7 α -OH e 7 β -OH foram encontrados (Sampaio et al., 2012).

5. Pró-oxidantes e a oxidação do colesterol

Pró-oxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que possuem a capacidade de oxidar moléculas-alvo (Cerqueira et al., 2007). Metais de transição reduzidos são pró-oxidante, pois podem catalisar a oxidação de lipídios por redução de hidroperóxidos a radicais alcoxila, resultando, assim, na propagação da reação (Zhou e Elias, 2013). Outros fatores como luz, pressão, presença de O₂ também podem apresentar efeito pró-oxidante.

Diversos trabalhos reportados na literatura mostram que os íons metálicos como Fe⁺², Fe⁺³, Cu⁺¹, Cu⁺², Cd⁺² podem acelerar a oxidação lipídica.

Thanonkaew et al. (2006) analisaram o efeito de diferentes íons metálicos (cloreto de Fe⁺², Cu⁺¹, Cu⁺² e Cd⁺²) em diferentes concentrações (0, 5, 25 ppm) na oxidação lipídica, descoloração e propriedades físico-químicas de peixe (*Sepia pharaonis*) submetidas a vários ciclos de congelamento e descongelamento. A oxidação lipídica, determinada por TBARS, aumentou dependendo da concentração,
do tipo e da valência do íon metálico. Esta foi induzida de forma mais eficaz por Fe⁺² e seu efeito pró-oxidativo mostrou-se dependente da concentração. Cu⁺¹, Cu⁺² e Cd⁺² apresentaram um efeito insignificante na oxidação lipídica. O aumento da oxidação lipídica com adição de ferro foi coincidente com o aumento nos valores b* (amarelo), especialmente com o aumento dos ciclos de congelamento-descongelamento.

Colakoglu (2007) avaliou a cinética de oxidação do óleo de soja contendo 1% (m/m) de monooleína, 1% (m/m) de ácido esteárico e 0,005% (m/m) de cloreto de Fe⁺³ submetida a 55°C sob incidência de luz. As taxas de oxidação foram determinadas pelo consumo de oxigênio e formação de peróxido. O consumo de oxigênio e a formação de peróxidos a 55°C, sob luz foram influenciadas pela adição de monooleína, ácido esteárico e cloreto de Fe⁺³. A monooleína aumentou a taxa de consumo de oxigênio, já o ácido esteárico e o Fe⁺³ diminuíram essa taxa. A eficiência pró-oxidativa observada foi da ordem de cloreto de Fe⁺³ > monooleína ≥ ácido esteárico.

Tokur e Korkmaz (2007) investigaram os efeitos de um sistema de geração de radicais hidroxila (TBARS) induzida por oxidação catalisada por sulfato de ferro (0,5 mM) e peróxido de hidrogênio (1 mM) sobre os lipídios e as proteínas da sardinha, anchova e peixe azul. Os resultados demonstraram que os sistemas utilizando ferro estavam envolvidos na oxidação de lipídios e proteínas em peixes, podendo implicar em alterações funcionais, sensoriais e na qualidade do peixe processado. Parece que a oxidação de proteína, através de um sistema catalisado por ferro, mostrou-se, dependente das espécies de peixes. No entanto, investigações mais detalhadas, com base em testes específicos da espécie, devem ser realizadas para determinar o efeito de sistemas de geração de radicais livres.

A incidência de luz, como lâmpadas fluorescentes (3000 a 6000 K) também é capaz de aumentar a formação de COP's, e esta formação depende do tempo de armazenamento das amostras e da incidência de luz. Boselli et al. (2005) demonstraram que peito de peru a formação de óxidos foi maior quando as mesmas foram expostas a lâmpadas de 6000 K, durante 7 dias, com maior incidência de 7-ceto, correspondendo a um terço da quantidade total de óxidos. Já Cardenia et al. (2011) confirmaram a maior incidência de óxidos em carne suína expostas à luz (lâmpadas fluorescentes de 3800 K, durante 3 dias a 8°C), quando comparadas com amostras armazenadas na ausência de luz.

Alguns autores mostraram que a temperatura juntamente com cloreto de sódio (NaCl) tem uma influência sobre as reações bioquímicas que ocorrem em carnes. Lytras et al. (1999) verificaram que a força iônica na carne pode influenciar a temperatura na qual ocorre a desnaturação da mioglobina. No entanto, até agora, a informação sobre a interação entre a temperatura e o NaCl para a oxidação de lipídios é muito limitada. Jin et al. (2012) investigaram a interação da temperatura e de NaCl sobre a oxidação lipídica em carne de porco. Os resultados deste estudo mostram que a temperatura mostrou um efeito relativamente grande sobre a oxidação. O ponto ótimo determinado neste estudo mostrou que em temperatura de 35°C e nível médio de NaCl (2,77 %) poderia efetivamente acelerar a oxidação lipídica.

6. Formação de óxidos de colesterol em sistemas modelo

Os sistemas modelo de colesterol vêm sendo úteis na elucidação dos mecanismos de oxidação do mesmo, visto que as matrizes alimentícias são complexas, e compostos como antioxidantes, proteínas, ácidos graxos, metais, entre outros, podem causar interferências (Chien et al., 2004; Xu et al., 2005; Chien et al., 2006; Yen et al., 2010; Nogueira, 2011; Barriuso et al., 2012; Ansorena et al., 2013).

São reportados na literatura trabalhos que mostram sistemas-modelo de colesterol, submetidos a diferentes tratamentos, em diferentes temperaturas (80 a 230°C), em condições variadas de iluminação, tempo de aquecimento, tipos de ácidos graxos, presença ou ausência de oxigênio, colesterol puro e seco ou mesmo em misturas com óleos inertes ou comestíveis e ainda em parte da fração lipídica extraída de alimentos (Kim e Nawar, 1991; Chien et al., 2006; Yen et al., 2010; Nogueira, 2011; Barriuso et al., 2012; Ansorena et al., 2013).

Na maioria dos trabalhos em que o colesterol é aquecido puro, soluções do colesterol são preparadas em solvente orgânico (posteriormente evaporado) e então submetidas a aquecimento controlado. Geralmente o colesterol encontra-se em estado sólido, entre temperatura ambiente e 100°C, sendo, portanto, bastante estável (Smith, 1987; Kim e Nawar, 1993). Os autores concluíram que a velocidade de degradação depende da concentração inicial de colesterol no sistema.

Os lipídios oxidados ou em processo de oxidação interagem de uma maneira complexa, e este fato tem deixado muitas dúvidas para a comunidade científica. Alguns estudos mostram as interações que ocorrem entre o colesterol e os ácidos graxos, embora ainda não se possa concluir definitivamente qual composto favorece a

oxidação do outro. Com esse intuito, Kim e Nawar (1991) avaliaram o comportamento do colesterol seco frente a triacilgliceróis (TAG) a 130°C e observaram que o colesterol sozinho oxida-se menos do que na presença dos TAG. De acordo com os autores uma possível explicação seria a de que os TAG se oxidam primeiro, liberando radicais e peróxidos no meio e estes contribuem para a reação de oxidação do colesterol, além disso, os TAG se fundem primeiro, deixando o colesterol numa mistura líquida, favorecendo a oxidação do colesterol mesmo a temperaturas abaixo do seu ponto de fusão.

Em trabalho realizado por Ansorena et al. (2013) foi avaliada a influência do grau de instauração de 4 diferentes triacilgliceróis: triestearina, trioleína, trilinoleína e trilinolenina, sobre a oxidação de colesterol a 180°C. Os resultados mostraram que o colesterol foi degradado mais rapidamente na presença de triacilgliceróis do que quando aquecido sozinho, além disso, quanto mais insaturado o triacilglicerol, mais lenta foi à degradação do colesterol. Foram formados, tanto COP's quanto peróxidos durante o tempo de aquecimento. As concentrações máximas de COP's foram alcançadas em 20 min quando o sistema modelo continha apenas colesterol e em 120 min nos sistemas contendo colesterol + triestearina e colesterol + trioleina. O 7-ceto foi o principal óxido encontrado na maioria dos casos durante o tratamento.

Chien et al. (2006) investigaram a inibição da oxidação de colesterol induzida pelo calor (150°C) na presença de quercetina. Os resultados mostraram que, na ausência de quercetina, a concentração de COP's aumentou com o aumento do tempo de aquecimento. A baixa quantidade (0,002 %) de quercetina adicionada foi eficaz na inibição da formação de COP's durante o período inicial de aquecimento, porém após o

aquecimento prolongado a atividade antioxidante decaiu devido à degradação de quercetina. Quando utilizando modelos de regressão não linear para o estudo cinético desta oxidação, na ausência de quercetina, a epoxidação apresentou a maior constante cinética, seguida pela reação em cadeia de radicais > redução > desidratação > desidrogenação do triol > desidrogenação > degradação térmica > formação de triol. No entanto, na presença de quercetina, as constantes cinéticas para a epoxidação, reação em cadeia de radical, e a degradação térmica foram reduzidas significativamente, demonstrando a eficácia da quercetina como antioxidante.

Yen et al. (2010) desenvolveram uma metodologia utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) para a separação simultânea de colesterol, COP's e dois ácidos linoleicos conjugados (9-*cis*, 11-*trans*-CLA e 10-*trans*,12-*cis*-CLA) em sistemas modelo de colesterol, e avaliaram a estabilidade do sistema durante o aquecimento. Os resultados monstraram que a estabilidade dos níveis de colesterol e do ácido linoleico conjugado foi preservada a 100°C, no entanto, a degradação foi significativa quando elevou-se a temperatura para 150°C.

Nogueira (2011) estudou sistemas modelo contendo colesterol, ácidos graxos (ácido linolênico, esteárico) e antioxidantes (vitamina E, TBHQ e β-caroteno), sob diferentes temperaturas (140, 180 e 220°C). De modo geral, os resultados demonstraram que ambos os ácidos graxos aceleraram a degradação do colesterol. Já em relação aos antioxidantes, os mesmos demonstraram-se dependentes da temperatura; a vitamina E apresentou visível proteção à 140°C, a 180°C apresentou tendência a proteção e à 220°C não influenciou na proteção contra a oxidação; o TBHQ reduziu ligeiramente a oxidação do colesterol a 220°C, não apresentou influência

contra a oxidação a 180°C e a 140°C acelerou a sua oxidação; o β-caroteno foi capaz de reduzir a velocidade de degradação do colesterol a 140°C, no entanto a 180 e 220°C não apresentou diferença quando comparado com o sistema modelo controle (somente colesterol).

Colesterol e fitoesteróis podem ser oxidados sob condições de aquecimento formando produtos de oxidação de esteróis (POP's), conhecidos por seus efeitos nocivos incluindo a aterosclerose, a citotoxicidade e mutagênese (Larsson et al., 2006; O'Callaghan et al., 2010; Roussi et al., 2007). Estudo realizado por Barriuso et al. (2012) avaliaram a degradação do colesterol e esteróis em sistemas modelo contendo colesterol e três esteróis de plantas durante aquecimento por 360 min a 180°C. A formação e posterior degradação de POP's foi analisada por CG-MS. Os resultados revelaram uma susceptibilidade à degradação do esterol de acordo com a seguinte ordem decrescente: campesterol $\approx \beta$ -sitosterol \geq estigmasterol > colesterol. Os POP's tiveram sua concentração aumentada durante os primeiros 5-10 min e em seguida, a sua taxa de degradação foi maior do que a sua velocidade de formação, resultando numa diminuição ao longo do tempo. Os derivados de 7-ceto apresentaram os níveis mais elevados ao longo de todo o processo.

Com o aumento gradual na complexidade dos sistemas modelo, como a incorporação de outros componentes que podem estar presentes nos alimentos, dentre eles o ferro presente na mioglobina, as interações entre ácidos graxos saturados e insaturados, bem como a presença de antioxidantes sintéticos e naturais, podem levar à conclusões que sugiram novas rotas de degradação do colesterol e formação de óxidos.

Referências

Ansorena, D.; Barriuso, B.; Cardenia, V.; Astiasarán, I.; Lercker, G.; Rodriguez-Estrada, M. T. (2013) Thermo-oxidation of cholesterol: effect of the unsaturation degree of the lipid matrix. *Food Chemistry*, 141: 2757-2764.

Baggio, S. R.; Bragagnolo, N. (2006) Fatty acids, cholesterol oxides and cholesterol in brazilian processed chicken products. *Italian Journal of Food Science*, 18: 199-208.

Baggio, S. R.; Bragagnolo, N. (2008) Lipid fraction quality evaluation of brazilian meatbased products. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19: 463-470.

Baggio, S. R.; Miguel, A. M. R.; Bragagnolo, N. (2005) Simultaneous determination of cholesterol oxides, cholesterol and fatty acids in processed turkey meat products. *Food Chemistry*, 89: 475-484.

Bailey, A. E. (1996) *Bailey's Industrial Oil and Fat Products,* 5th ed., vol. 3, John Wiley: New York.

Barriuso, B.; Otaegui-Arrazola, A.; Menéndez-Carreño, M.; Astiasarán, I.; Ansorena, D. (2012) Sterols heating: Degradation and formation of their ring-struture polar oxidation products. *Food Chemistry*, 135: 706-712.

Björkhem, I. (1992) Mechanism of degradation of the steroids side chain in the formation of bile acids. *Journal of Lipid Research*, 33: 455-472.

Björkhem, I.; Andersson, O.; Diczfalusy, U.; Sevastik, B.; Xiu, R. J.; Duan, C.; Lund, E. (1994) Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 91: 8592-8596.

Boselli, E.; Caboni, M. F.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Toschi, T. G.; Daniel, M.; Lercker, G. (2005) Photoxidation of cholesterol and lipids of turkey meat during storage under commercial retail conditions. *Food Chemistry*, 91: 705-713.

Bragagnolo, N. (2009) Cholesterol and cholesterol oxides in meat and meat products In: *Handbook of muscle foods analysis*, Nollet, L. M. L.; Toldrá, F. Boca Raton, CRC Press: 187-219.

Bragagnolo, N.; Danielsen, B.; Skibsted, L. H. (2007) Rosemary as antioxidant in pressure processed chicken during subsequent cooking as evaluated by electron spin resonance spectroscopy. *Innovations on Food Science Emerging Technology*, 8: 24-29.

Cardenia, V.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Cumella, F.; Sardi, L.; Della Casa, G.; Lercker, G. (2011) Oxidative stability of pork meat lipids as related to high-oleic sunflower oil and vitamin E diet supplementation and storage conditions. *Meat Science*, 88: 271-279.

Castro, W. F.; Mariutti, L. R. B.; Bragagnolo, N. (2011) The effects of colorífico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken during frozen storage. *Food Chemistry*, 124: 126-131.

Cerqueira, F. M.; Medeiros, M. H. G.; Augusto, O. (2007) Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, 30: 441-449.

Chien, J. T.; Huang, D. Y.; Chen, B. H. (2004) Kinect studies of cholesterol oxidation as inhibited by stearylamine during heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7132-7138.

Chien, J. T.; Hsu, D. J.; Chen, B. H. (2006) Kinect model for studying the effect of quercetin on cholesterol oxidation during heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1486-1492.

Choe, E.; Min, D.B. (2006). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:1-22.

Colakoglu, A. S. (2007) Oxidation kinetics of soybean oil in the presence of monoolein, stearic acid and iron. *Food Chemistry*, 101: 724-728.

Decker, E. A.; Mei, L. (1996). Antioxidant mechanisms and applications in muscle foods. *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, 49: 64–72.

Di Mascio, P. D.; Kaiser, S.; Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274: 532-538.

Du, M.; Ahn, D. U. (2000) Effects of antioxidants and packaging on lipid and cholesterol oxidation and color changes of irradiated egg yolk powder. *Journal of Food Science*, 65: 625-629.

El-Agamey, A.; Lowe, G. M.; McGarvey, D. J.; Mortensen, A.; Phillip, D. M.; Truscott, T. G.; Young, A. J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430: 37-48.

Emanuel, H. A.; Hassel, C. A.; Addis, P. B.; Bergmann, S. D.; Zavoral, J. H. (1991) Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *Journal of Food Science*, 56: 843-847.

Flaczyk, E.; Rudzińskawąsowicz, E.; Korczak, J.; Amarowicz, R. (2006) Effect of cracklings hydrolysates on oxidative stability of pork meatballs fat. *Food Research International*, 39: 924-931.

Galvin, K.; Lynch, A. M.; Kerry, J. P.; Morrissey, P. A.; Buckley, D. J. (2000) Effect of dietary vitamin e supplementation on cholesterol oxidation in vacuum packaged cooked beef steaks. *Meat Science*, 55: 7-11.

Ghiretti, G. P.; Zanardi, E.; Novelli, E.; Campanini, G.; Dazzi, G.; Madarena, G.; Chizzolini, R. (1997) Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano and mortadella production. *Meat Science*, 47: 167-176.

Gorinstein, S.; Kulasek, G. W.; Bartnikowska, E.; Leontowicz, E.; Zemser, M.; Morawiec, M.; Trakhtenberg, S. (2000) The effects of diets, supplemented with either whole persimmon or phenol-free persimmon, on rats fed cholesterol. *Food Chemistry*, 70: 303-308.

Guardiola, F.; Codony, R.; Miskin, D.; Rafecas, M.; Boatella, J. (1995) Oxysterol formation in egg powder and relationship with other quality parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1903-1907.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. 3ed. New York: Clarendon Press; Oxford: Oxford University Press.

Hodis, H. N.; Crawford, D. W.; Sevanian, A. (1991) Cholesterol feeding increases plasma and aortic tissue cholesterol oxide levels in parallel: further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 89: 117-126.

Hodis, H. N.; Chauhan, A.; Hashimoto, S.; Crawford, D. W.; Sevanian, A. (1992) Probucol reduces plasma and aortic wall oxysterol levels in cholesterol-fed rabbits independently of its plasma cholesterol-lowering effect. *Atherosclerosis*, 96: 125-134.

Huber, K. C.; Pike, O. A.; Huber, C. S. (1995) Antioxidant inhibition of cholesterol oxidation in a spray-dried food system during accelerated storage. *Journal of Food Science*, 60: 909-912.

Hur, S. J.; Park, G. B.; Joo, S. T. (2007) Formation of cholesterol oxidation products (COP's) in animal products. *Food Control*, 18: 939-947.

Imai, H.; Werthessen, N. T.; Subramanyam, V.; Le Quesne, P. W.; Soloway, A. H.; Kanisawa, M. (1980) Angiotoxicity of oxygenated sterols and possible precursors. *Science*, 207: 651-653.

Iuliano, L. (2011) Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164: 457-468.

Jin, G.; He, L.; Zhang, J.; Yu, X.; Wang, J.; Huang, F. (2012) Effect of temperature and NaCI percentage on lipid oxidation in pork muscle and exploration of the controlling method using response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 131: 817-825.

Kim, J. S. (2005) E vitamin fraction in rice bran inhibits autooxidation of cholesterol and linoleic acid in emulsified system during incubation. *Journal of Food Science*, 70: 286-291.

Kim, S. K.; Nawar, W. W. (1991). Oxidative interactions of cholesterol with triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(12): 931-934.

Kim, S. K.; Nawar, W. W. (1993) Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids*, 28: 917-922.

Labuza, T. P.; Dugan, L. R. Jr. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Technology*, 3: 355-405.

Larkeson, B.; Dutta, P. C.; Hansson, I. (2000) Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77: 675-680.

Larsson, D.; Baird, S.; Nyhalah, J.; Yuan, X.; Li, W. (2006) Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects. *Free Radical Biology Medicine*, 41: 902-910.

Lee, S.; Decker, E. A.; Faustman, C.; Mancini, R. A. (2005). The effect of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in *n-3* oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, 70: 683-689.

Leonarduzzi, G.; Sottero, B.; Poli, G. (2002) Oxidized products of cholesterol: Dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 700-710.

Luciano, G.; Pauselli, M.; Servili, M.; Mourvaki, E.; Serra, A.; Monahan, F. J.; Lanza, M.; Priolo, A.; Zinnai, A.; Mele, M. (2013) Dietary olive cake reduces the oxidation of lipids, including cholesterol, in lamb meat enriched in polyunsaturated fatty acids. *Meat Science*, 93: 703-714.

Lytras, G. N.; Geileskey, A.; King, R. D.; Ledward, D. A. (1999) Effect of muscle type, salt and pH on cooked meat haemoprotein formation in lamb and beef. *Meat Science*, 52: 189-194.

Maraschiello, C.; Esteve, E.; Regueiro, J. A. G. (1998) Cholesterol oxidation in meat from chickens fed α -tocopherol- and β -carotene- supplemented diets with different unsaturation grades. *Lipids*, 33: 705-713.

Mariutti, L. R. B. *Efeito da adição de sálvia e alho na oxidação lipídica em carne de frango*. 2009. 204p. Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

Mariutti, L. R. B.; Nogueira, G. C.; Bragagnolo, N. (2008a) Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides extraction in chicken meat

using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9): 2913-2918.

Mariutti, L. R. B.; Orlien, V.; Bragagnolo, N.; Skibsted, L. H. (2008b) Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. *European Food Research and Technology*, 227: 337-344.

McCluskey, S.; Connolly, J. F.; Devery, R.; Obrien, B.; Kelly, J.; Harrington, D.; Stanton, C. (1997) Lipid and cholesterol oxidation in whole milk powder during processing and storage. *Journal of Food Science*, 62: 331-337.

Montenegro, M. A.; Rios, A. de O.; Mercadante, A. Z.; Nazareno, M. A.; Borsarelli, C. D. (2004). Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 367-373.

Morgan, J. N.; Armstrong, D. J. (1987) Formation of cholesterol-5,6-epoxides during spray-drying of egg yolk. *Journal of Food Science*, 52: 1224-1227.

Nogueira, G. C. *Degradação do colesterol submetido ao aquecimento na presença de ácidos graxos e antioxidantes*: estudo em sistemas modelo. 2011. 148p. Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

Nouroozzadeh, J.; Appelqvist, L. A. (1988) Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients - butter and cheese. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 65: 1635-1641.

O'Callaghan, Y.; Foley, D.; O'Connell, N.; McCarthy, F.; Maguire, A.; O'Brien, N. (2010) Cytotoxic and apoptotic effects of the oxidized derivatives of stigmasterol in the U937 human monocytic cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 10793-10798.

Park, S. W.; Addis, P. B. (1986) Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *Journal of Food Science*, 51: 1380-1381.

Pie, J. E.; Spahis, K.; Seillan, C. (1990) Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients - identification and quantification of cholesterol oxides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 973-979.

Pikul, J.; Rudzińska, M.; Teichert, J.; Lasik, A.; Danków, R.; Przybylski, R. (2013) Cholesterol oxidation during storage of UHT-treated bovine and caprine milk. *International Dairy Journal*, 30: 29-32.

Poirot, M.; Silvente-Poirot, S. (2012) Cholesterol-5,6-epoxides: Chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer, *Biochimie*, 95: 622-631.

Polak, T.; Žlender, B.; Lušnic, M.; Gašperlin, L. (2011) Effects of coenzyme Q_{10} , α tocopherol and ascorbic acid on oxidation of cholesterol in chicken liver pâté. *LWT* – *Food Science and Technology*, 44: 1052-1058.

Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

Ramanathanm, L.; Das, N. P. (1992). Studies on the control of lipid oxidation in ground fish by some polyphenolic natural products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40: 17–22.

Rios, A. de O.; Mercadante, A. Z.; Borsarelli, C. D. (2007). Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dyes and Pigments*, 74: 561-565.

Rodriguez-Estrada, M. T.; Penazzi, G.; Caboni, M. F.; Bertacco, G.; Lercker, G. (1997) Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburgers. *Meat Science*, 45: 365-375.

Rose-Sallin, C.; Sieber, R.; Bosset, J. O.; Tabacchi, R. (1997) Effects of storage or heat treatment on oxysterols formation in dairy products. *LWT – Food Science and Technology*, 30: 170-177.

Russell, D. W.; Setchell, K. D. (1992) Bile acid biosynthesis. *Biochemistry*, 31: 4737-4749.

Roussi, S.; Gosse, F.; Aoude Werner, D.; Zhang, X.; Marchioni, E. (2007) Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7 beta-hydroxysitosterol and 7 beta-hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis*, 12: 87-96.

Saldanha, T. *Fatores que influenciam a formação de óxidos de colesterol em produtos marinhos ricos em ácidos graxos poli-insaturados*. 2006. 182p. Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

Sampaio, G. R.; Saldanha, T.; Soares, R. A. M.; Torres, E. A. F. S. (2012) Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. *Food chemistry*, 135: 1383-1390.

Schroepfer Jr., G. J. (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes, *Physiological Reviews*, 80: 361–554.

Shantha, N. C.; Crum, A. D.; Decker, E. A. (1994). Conjugated linoleic acid concentrations in cooked beef containing antioxidants and hydrogen donors. *Journal of Food Lipids*, 2: 57–64.

Shivas, S. D.; Kropf, D. H.; Hunt, M. C.; Kastner, C. L.; Kendall, J. L. A.; Dayton, A. D. (1984). Effects of ascorbic acid on display life of ground beef. *Journal of Food Protection*, 47: 11–15.

Sieber, R. (2005) Oxidized cholesterol in milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 15: 191-206.

Smith, L. L. (1987) Cholesterol autoxidation 1981-1986. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44: 87-125.

Smith, L. L. (1996) Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. *Lipids*, 31: 453-487.

Smith, L. L.; Johnson, B. H. (1989) Biological activities of oxysterols. *Free Radical Biology and Medicine*, 7: 285-332.

Stahl, W.; Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochemical and Biophysical Acta*, 70: 101-107.

St. Angelo, A. J.; Vercellotti, J. R.; Dupuy, H. P.; Spanier, A. M. (1988). Assessment of beef flavor quality: a multidisciplinary approach. *Food Technology*, 42: 133–136.

Thanonkaew, A.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Decker, E. A. (2006) The effect of metal ions on lipid oxidation, colour and physicochemical properties of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) subjected to multiple freeze–thaw cycles. *Food Chemistry*, 95: 591-599.

Tokur, B.; Korkmaz, K. (2007) The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. *Food Chemistry*, 104: 754-760.

Xu, Z. M.; Zhang, T.; Prinyawiwatkul, W.; Godber, J. S. (2005) Capabilities of different cooking oils in prevention of cholesterol oxidation during heating. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 82: 243-248.

Yen, T. Y.; Inbaraj, S. B.; Chien, J. T.; Chen, B. H. (2010) Gas chromatography–mass spectrometry determination of conjugated linoleic acids and cholesterol oxides and their stability in a model system. *Analytical Biochemistry*, 400: 130-138.

Zhang, X.; Shen, Y.; Prinyawiwatkul, W.; King, J. M.; Xu, Z. (2013) Comparison of the activities of hydrophilic anthocyanins and lipophilic tocols in black rice bran against lipid oxidation. *Food Chemistry*, 141: 111-116.

Zhou, L.; Elias, R. J. (2013) Antioxidant and pro-oxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of pH and phenolic concentration, *Food Chemistry*, 138:1503-1509.

CAPÍTULO II

INTERAÇÃO ENTRE DIFERENTES COMPOSTOS NA OXIDAÇÃO DO COLESTEROL E FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL

Artigo em preparação a ser submetido para publicação no periódico Food Chemistry

INTERAÇÃO ENTRE DIFERENTES COMPOSTOS NA OXIDAÇÃO DO COLESTEROL E FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL

Elisângela Serenato Madalozzo, Neura Bragagnolo

Departamento de Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos –

UNICAMP – Campinas, SP, Brasil

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a oxidação do colesterol e a formação de óxidos de colesterol (COP's) em sistemas modelo contendo colesterol e diferentes concentrções de ácidos graxos (ácido oleico, ácido palmítico е ácido eicosapentaenóico - EPA), antioxidantes (eritorbato de sódio, bixina e ácido cítrico) e pró-oxidante (mioglobina), submetidos ao aquecimento a 130 e 160°C, durante 240 e 30 min, respectivamente. O sistema modelo constituído de colesterol, bixina, ácido oleico e mioglobina (ensaio 11) foi o que apresentou a maior degradação do colesterol (97,1 % em ambas temperaturas) e maior concentração de óxidos totais (614,38 µg/mL em 130°C e 588,69 µg/mL em 160°C). Já o sistema modelo que apresentou a menor degradação (30,5 % em 130°C e 45,7 % em 160°C) do colesterol foi o ensaio 1, que apresenta em sua composição colesterol, eritorbato de sódio, ácido cítrico e mioglobina. A concentração total de óxidos para esse sistema foi de 6,13 µg/mL em 130°C e 49,25 μg/mL em 160°C.

Palavras-chave: ácidos graxos, antioxidantes, mioglobina e termo-oxidação.

1. Introdução

O colesterol é a matéria-prima para a síntese de hormônios, sais biliares e vitamina D₃ sendo também o constituinte essencial das membranas celulares. Além disso, é necessário para o crescimento e viabilidade das células (Chien, Hsu & Chen, 2006; Lee, Chien & Chen, 2008). O mesmo comporta-se de maneira particular em relação à oxidação devido a ligação dupla e ao grupamento hidroxila presentes nas posições 5 e 3, respectivamente, da estrutura cíclica, originando os produtos de oxidação do colesterol ou COP's (Echarte, Zulet & Astiasarán, 2001).

A oxidação do colesterol é favorecida quando este composto é exposto a várias condições como, temperaturas elevadas, ar, iniciadores de radicais, luz, metais como, Fe, Cu e Zn, armazenamento por longos períodos ou à combinação destes fatores (Boselli, Cardenia & Rodriguez-Estrada 2012; Cardenia, Rodriguez-Estrada, Baldacci, Savioli & Lercker, 2012; Mazalli & Bragagnolo, 2007; Saldanha & Bragagnolo, 2008). No entanto, a oxidação do colesterol pode ser interrompida ou retardada pela ação de compostos que reduzem a formação dos radicais ou atuam quelando metais presentes no meio (Maraschiello, Esteve & Regueiro, 1998; Castro, Mariutti & Bragagnolo, 2011). A matriz alimentícia e sua composição química são fatores-chave na oxidação do colesterol.

A fim de evitar interferências da matriz alimentícia e identificar a influência de diferentes compostos no processo de oxidação, sistemas modelo são comumente usados para que uma melhor compreensão dos fatores que regem este assunto possa ser obtida e um melhor controle de certas condições de processamento de alimentos possa ser consequentemente proposto. Os COP's são relacionados com o possível

desenvolvimento de aterosclerose, mutagênese, doenças neuro-degenerativas e outros efeitos nocivos para a saúde humana (Guardiola et al., 1996; Leonarduzzi et al., 2002; Osada, 2002; Garcia-Cruset et al., 2002). Desta forma, a sua formação deve ser minimizada e os fatores responsáveis devem ser estudados em detalhe (Otaegui-Arrazola, Menéndez-Carreño, Ansorena & Astiasarán, 2010).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do uso de diferentes antioxidantes (bixina, eritorbato de sódio e ácido cítrico), pró-oxidante (mioglobina) e de ácidos graxos com diferentes graus de insaturação (ácido palmítico, ácido oleico e EPA) na degradação térmica do colesterol em sistemas modelo, sob fluxo constante de O₂. A ação dos antioxidantes e do pró-oxidante foi monitorada pela formação de COP's e pela alteração na composição de ácidos graxos, bem como pela degradação dos antioxidantes adicionados aos sistemas modelo submetidos à temperaturas de 130 e 160°C.

2. Materiais e métodos

2.1 Reagentes e solventes

Os padrões de óxidos de colesterol 20α-hidroxicolesterol (20α-OH) (\geq 98 %), 22*R*-hidroxicolesterol (22*R*-OH) (\geq 98 %), 22*S*-hidroxicolesterol (22*S*-OH) (\geq 98 %), 25hidroxicolesterol (25-OH) (\geq 98 %), 5,6α-epoxicolesterol (5,6α-epóxido) (\geq 80 %), 5,6βepoxicolesterol (5,6β-epóxido) (\geq 80 %), 7-cetocolesterol (7-ceto) (\geq 90 %), 7αhidroxicolesterol (7α-OH) (\geq 95 %), 7β-hidroxicolesterol (7β-OH) (\geq 95 %) e colestanotriol (triol) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) ou Steraloids (Newport, RI, EUA).Os padrões de colesterol, eritorbato de sódio, ácido palmítico, ácido oleico, EPA, mioglobina, o complexo trifluoreto de boro em metanol 13-15 % (BF₃), a mistura de padrões contendo ésteres metílicos dos ácidos graxos de 4:0 a 24:0 e o éster metílico do ácido tricosanóico (99 % CG) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Já o padrão de ácido cítrico foi adquirido da Qhemis (99,5 % de pureza) (Jundiaí, SP, Brasil).

Os solventes grau cromatográfico (HPLC) utilizados foram metanol e isopropanol obtidos da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), hexano adquirido da Panreac (Barcelona, Catalunha, Espanha) e diclorometano proveniente da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, EUA).

Os reagentes grau P.A. metanol, iso-octano, hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de sódio (NaCl) e ácido fosfórico foram obtidos da marca Synth (Diadema, SP, Brasil).

2.2 Preparo das soluções dos sistemas modelo

As soluções usadas no preparo dos sistemas modelo foram preparadas com concentrações conhecidas, de acordo com o planejamento experimental (Plackett & Burman) apresentado na Tabela 1. A solução de colesterol foi preparada na concentração de 10 mg/mL, para tanto, pesou-se 100 mg do padrão em balão volumétrico de 10 mL e aferiu-se o volume com isopropanol. Para o prepado das soluções de antioxidantes foram pesados 2 mg de cada antioxidante em balões volumétrico de 5mL e o volume foi aferido com metanol. Esta concentração corresponde ao nível +1 do planejamento experimental. Para o nível 0, a solução foi preparada pesando-se 1 mg de cada antioxidante em balões volumétricos de 5 mL e

na concentração de 150 mg em 5 mL, em balão volumétrico de 5 mL, e para o nível 0 na concentração de 75 mg em 5 mL, sendo solubilizados em hexano. A mioglobina foi preparada na concentração de 4 mg em de 5 mL, para o nível +1, e 2 mg em 5 mL para o nível 0, sendo solubilizado em água MilliQ.

Todas as soluções foram preparadas separadamente e após esta etapa procedeu-se o preparo dos tubos dos sistemas modelo também de acordo com o planejamento experimental. Desta forma, pipetou-se 100 μ L de colesterol, 100 μ L de antioxidantes, 100 μ L de ácidos graxos e 50 μ L de mioglobina, para que os sistemas apresentassem a concentração desejada, de acordo com a Tabela 2.

2.3 Preparo dos sistemas modelo

Os sistemas modelo foram preparados utilizando um planejamento experimental Plackett & Burman (1946), com sete variáveis de entrada (eritorbato de sódio, ácido palmítico, ácido oleico, EPA, mioglobina e ácido cítrico) em dois níveis e três pontos centrais, totalizando 15 ensaios (Tabelas 1 e 2). As soluções das variáveis de cada ensaio foram adicionadas em tubos de ensaio de 15 mL e homogeneizadas em vortex por 1 min. Em seguida, os solventes foram evaporados sob fluxo de N₂ e os tubos foram imediatamente levados para o bloco de aquecimento (Figura 1) (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Para cada ensaio do planejamento foram preparados 21 tubos, quantidade suficiente para se obter 7 pontos, em triplicata. O ensaio 12 constituído apenas de colesterol corresponde ao controle. Os sistemas modelo foram aquecidos nas temperaturas de 130 e 160°C, sob fluxo constante de O₂ (10 mL/min). Os tubos foram retirados nos tempos de 0, 15, 60, 90, 120, 210 e 240 min na temperatura de

130°C e nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 30 min na temperatura de 160°C. Após cada tempo de aquecimento os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo. Os tempos de aquecimento do sistema modelo foram fixados de acordo com estudos preliminares (dados não apresentados). A Tabela 2 mostra a concentração das variáveis em dois níveis.

Após o aquecimento e resfriamento foi adicionado a cada tubo 1 mL de fase móvel e alíquotas convenientes foram tomadas para as análises de colesterol e COP's e de acordo com o sistema modelo, para as análises de ácidos graxos, e/ou antioxidantes e/ou pró-oxidante. Como resposta avaliou-se a degradação do colesterol e a formação de COP's.



Figura 1 – Equipamento usado para aquecimento (Dryblock) dos sistemas modelo

Ensaios	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1
12*	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0

 Tabela 1– Matriz codificada do planejamento Plackett & Burman

*Controle (contém somente colesterol)

Tabela 2 – Concentração das variáveis do planejamento	Plackett & Burman	e seus respectivos nív	eis
codificados	;		

councauos							
Variáveis	-1	0	1				
Eritorbato de sódio (mg/mL)(x1)	0	0,02	0,04				
Bixina (mg/mL) (x2)	0	0,02	0,04				
Ácido cítrico (mg/mL) (x3)	0	0,02	0,04				
Ácido palmítico (mg/mL) (x4)	0	1,5	3				
Ácido eicosapentaenoico (mg/mL) (x5)	0	1,5	3				
Ácido oleico (mg/mL) (x6)	0	1,5	3				
Mioglobina (mg/mL) (x7)	0	0,02	0,04				

2.4 Quantificação do colesterol e óxidos de colesterol

Após o tratamento térmico e resfriamento, foram adicionaodos 1 mL de fase móvel aos tubos contendo os sistemas modelo, sendo filtrado e uma alíquota foi injetada diretamente no cromatógrafo líquido, modelo LC10 (Shimadzu, Quioto, Japão) dotado de sistema isocrático de bombas (LC 10AT VP), degaseificador a He (DGU 2A), detectores UV (LC10AV VP) a 210 nm e índice de refração (RID 10A) conectados em série, forno (CTO 10AS VP) a 32°C, injetor manual Rheodyne (20 µL), interface cromatógrafo-computador (SCL 10VP) e software Class VP (versão 5.05). Para a separação dos compostos foi empregada a coluna CN (Waters, Millford, MS, EUA), 30 cm x 5 mm x 4 µm de diâmetro de partícula, com fase móvel hexano + isopropanol (97:3) e vazão 1 mL/min (Saldanha, Sawaya, Eberlin & Bragagnolo, 2006). Para a investigação da presença de triol foi realizada outra corrida cromatográfica nas mesmas condições alterando-se apenas a proporção (90:10) da fase móvel porém este óxido não foi encontrado em nenhuma amostra.

Os picos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões de colesterol e COP's: 20 α -OH, 22*R*-OH, 22*S*-OH, 25-OH, 5,6 α - e 5,6 β - epóxido, 7-ceto e 7 α - e 7 β -OH. As curvas analíticas foram construídas com 7 pontos de concentração variando de 0,08 a 4 mg/mL para o colesterol e com 6 pontos de concentração variando de 0,5 a 100 µg/mL para os COP's (20 α -OH: LD = 0,06 µg/mL e LQ = 0,19 µg/mL; 22*R*-OH: LD = 0,53 µg/mL e LQ = 1,62 µg/mL; 22*S*-OH: LD = 0,42 µg/mL e LQ = 1,28 µg/mL; 25-OH: LD = 0,53 µg/mL e LQ = 1,60 µg/mL; 5,6 α -epóxido: LD = 2,67 µg/mL e LQ = 8,08 µg/mL; 5,6 β -epóxido: LD = 4,99 µg/mL e LQ = 15,12 µg/mL; 7-ceto: LD = 0,33 µg/mL e LQ = 1,01 µg/mL; 7 α -OH: LD = 0,98 µg/mL e LQ = 2,98 µg/mL; 7 β -OH: LD = 0,46 µg/mL e LQ = 1,40 µg/mL).

A confirmação da identidade dos COP's foi feita por espectrometria de massas utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (Shimadzu, modelo LC-20AD) acoplado ao espectrômetro de massas com analisador

íon-trap (MSⁿ) (modelo Esquire 4000, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O espectrômetro de massas operou com ionização a pressão atmosférica (APCI) como fonte de ionização no modo positivo. As condições de temperatura e voltagem foram as mesmas utilizadas por Mariutti, Nogueira & Bragagnolo (2008).

2.5 Determinação de ácidos graxos

Para a determinação dos ácidos graxos foi retirada uma alíquota (200 μL) dos sistemas modelo, inicialmente diluídos com a fase móvel para a quantificação de colesterol e COP's, o solvente foi evaporado sob fluxo de N₂ e a amostra foi saponificada e esterificada a temperatura de ebulição utilizando 1,5 mL de NaOH em metanol 2 % (m/v) por 5 min e 2 mL de BF₃ em metanol por 30 min. Após 30 min os tubos foram resfriados e adicionou-se 5 mL de NaCl saturado, 1 mL de iso-octano e agitou-se em vortex por 30 s. Após a separação de fases, a fase superior foi recolhida e adicionou-se mais 1 mL de iso-octano e agitou-se por mais 30 s em vortex. Novamente a parte superior foi recolhida em tubos de ensaio onde já continha o padrão interno (30μL), sendo o solvente evaporado sob fluxo de N₂. As amostras foram ressuspendidas com 1 mL de hexano (grau HPLC) e filtradas, da qual retirou-se 2 μL para injeção no cromatógrafo através da técnica de *hot needle* por 5 s (Joseph & Ackman, 1992).

Para a identificação e quantificação dos ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo gasoso, modelo GC2010 (Shimadzu, Quioto, Japão) equipado com injetor split (1/50) a 250°C, coluna CP-SIL 88 (Chromopack, 100 m x 0,25 mm x 0,20 μm); detector de ionização de chama a 260°C e workstation (GCSolution, Shimadzu, Quioto,

Japão). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com velocidade linear de 40 cm/s e o gás *make up*, nitrogênio a 30 mL/min. A temperatura do forno do cromatógrafo foi programada com início a 120°C permanecendo por 8 min, aumentando para 160°C a 20°C/min, aumentando para 195°C a 3°C/min e permanecendo por 10 min, a 3°C/min a temperatura foi aumentada até 210°C, subiu até 220°C a 35°C/min permanecendo por 3 min, aumentando para 240°C com rampa de 20°C/min e permanecendo por 5 min, totalizando 46 min de corrida (Sancho, Bragagnolo, Costa, Mariutti & De Lima, 2011).

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção da mistura de padrões de metil ésteres dos ácidos graxos de 4:0 ao 24:0 com os tempos de retenção de metil ésteres de ácidos graxos da amostra. A quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando-se o éster metílico do ácido graxo tricosanóico, sendo os ácidos graxos calculados em mg/mL de amostra (AOCS, 1997).

2.6 Determinação de ácido cítrico e eritorbato de sódio

Para a quantificação de ácido cítrico e eritorbato de sódio foi utilizada uma alíquota reservada da diluição inicial (200 μ L). O solvente foi evaporado e o volume foi ressuspendido em fase móvel e injetado no cromatógrafo líquido. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Quioto, Japão), dotado de sistema de bombas em gradiente (LC-10AD), degaseificador a He (DGU 2A), detector de arranjo de diodos (SPD-M10A), forno (CTO-10A), injetor automático (SIL-10A) com amostrador de 20 μ L, interface cromatógrafo-computador (CBM-10A) e software (CLASS-LC10). A coluna analítica utilizada foi C₁₈ (Vydac, Hesperia, CA, EUA) 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m de diâmetro de partícula, mantida à temperatura de 30°C. As análises

foram realizadas em modo isocrático com vazão de 1 mL/min de fase móvel com detecção em 205 e 265 nm, para ácido cítrico e eritorbato de sódio, respectivamente. A fase móvel utilizada consistiu de uma solução 3 mM de ácido fosfórico em água (Uckoo, Jayaprakasha, Nelson & Patil, 2011).

A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção dos padrões com os tempos de retenção dos compostos das amostras. Para a quantificação as curvas analíticas foram construídas com 7 pontos de concentração variando de 0,02 a 0,5 mg/mL para o ácido cítrico (LD = 0,052 mg/mL e LQ = 0,158 mg/mL) e com 6 pontos de concentração variando de 0,001 a 0,1 mg/mL para o eritorbato de sódio (LD = 0,008 mg/mL e LQ = 0,026 mg/mL).

2.7 Determinação de bixina

Da diluição para a quantificação dos COP's, foram reservados 200 µL do extrato, cujo solvente foi completamente evaporado sob fluxo de N₂ e diluído em diclorometano. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro Agilent (modelo 8453, Palo Alto, EUA) e a concentração de bixina foi calculada em mg/g utilizando o coeficiente de absorção de 2826 a 470 nm (FAO/WHO, 1982; Lara, 1984). Todo o processo foi realizado ao abrigo de luz.

2.8 Análise estatística

O planejamento estatístico Plackett & Burman e a análise estatística dos dados foram realizados utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

3. Resultados e discussão

3.1 Degradação do colesterol

As tabelas 3 e 4 apresentam a concentração de colesterol ao longo do tempo de exposição dos sistemas modelo sob as temperaturas de 130 e 160°C, respectivamente e fluxo de O₂ constantes. Observa-se que, as concentrações finais de colesterol sob tratamento térmico a 130°C durante o período de 240 min variaram de 0,73 a 0,03 mg/mL correspondendo a 31 e 97,2 % de degradação do colesterol inicial. Quando o colesterol foi aquecido a temperatura de 160°C durante um período de 30 min as concentrações de colesterol variaram de 0,57 a 0,03 mg/mL, com degradação de 45,8 e 97,2 %. Esses dados mostram que, quanto maior a temperatura empregada, maior será a degradação do colesterol em menor tempo.

Ensaios	Tempo (min)								
	0	15	60	90	120	210	240		
1	1,05±0	1,04±0,03	0,95±0	0,9±0,01	0,86±0,02	0,82±0,04	0,73±0,06		
2	0,98±0	0,96±0,03	0,80±0,02	0,62±0,06	0,55±0,03	0,51±0	0,44±0,01		
3	1,05±0	0,35±0,03	0,04±0	0,03±0	0,03±0	0,04±0	0,04±0		
4	1,03±0	1,00±0,02	0,89±0,02	0,79±0,01	0,50±0,05	0,07±0,01	0,07±0		
5	0,97±0	0,58±0,02	0,33±0,02	0,27±0,02	0,21±0,03	0,12±0	0,13±0,01		
6	0,96±0	0,55±0,02	0,28±0,01	0,20±0,01	0,14±0,01	0,11±0,03	0,09±0,01		
7	1,02±0	0,97±0,01	0,57±0,03	0,18±0,02	0,07±0,01	0,04±0	0,04±0		
8	1,05±0	0,39±0,03	0,19±0,01	0,10±0,02	0,06±0,01	0,06±0,01	0,05±0		
9	1,06±0	0,43±0,05	0,17±0,01	0,14±0,03	0,08±0,01	0,05±0	0,05±0,01		
10	1,00±0	0,60±0,02	0,33±0,02	0,28±0,01	0,23±0	0,15±0,01	0,15±0,02		
11	1,05±0	0,37±0,04	0,05±0,01	0,04±0	0,03±0	0,03±0	0,03±0		
12**	1,11±0	0,95±0,04	0,34±0,02	0,22±0,04	0,25±0,01	0,2±0,03	0,12±0		
13	1,01±0	0,44±0,02	0,23±0	0,20±0	0,18±0,01	0,15±0	0,17±0,02		
14	1,02±0	0,46±0	0,24±0,01	0,19±0	0,17±0,01	0,16±0	0,17±0,02		
15	1,02±0	0,45±0,02	0,24±0	0,20±0	0,18±0,01	0,16±0	0,17±0,02		

Tabela 3 – Concentração de colesterol (mg/mL)* em diferentes sistemas modelo aquecidos a 130°Cdurante 240 min sob fluxo de O2 constante

*Média ± desvio padrão das triplicatas

**Controle (contém somente colesterol)

Ensaios numerados de acordo com a tabela 1

F	Tempo (min)								
Ensalos	0	2	4	6	8	10	30		
1	1,05±0	1,02±0,02	0,98±0	0,96±0	0,89±0,03	0,89±0,05	0,57±0,09		
2	1,00±0	1,00±0,01	0,97±0,02	0,96±0,05	0,84±0,03	0,77±0,01	0,41±0,03		
3	1,05±0	0,68±0,07	0,38±0,01	0,35±0,02	0,32±0,01	0,27±0	0,05±0,01		
4	1,03±0	1,01±0,01	1,03±0,03	0,97±0,05	0,93±0,04	0,81±0,02	0,14±0,02		
5	0,97±0	0,78±0,06	0,58±0,08	0,49±0,10	0,46±0,05	0,42±0,01	0,25±0,02		
6	0,96±0	0,80±0,02	0,63±0,06	0,51±0,05	0,50±0,03	0,38±0,02	0,21±0,04		
7	1,02±0	0,95±0,02	0,93±0,04	0,79±0,02	0,61±0,03	0,36±0,04	0,05±0		
8	1,05±0	0,67±0,08	0,49±0	0,33±0,05	0,31±0,04	0,30±0,01	0,09±0,02		
9	1,06±0	0,79±0,03	0,55±0,04	0,45±0,07	0,39±0,03	0,30±0,07	0,18±0,01		
10	1,00±0	0,68±0,02	0,54±0,01	0,43±0,03	0,38±0,01	0,35±0,03	0,19±0,02		
11	1,05±0	0,77±0,02	0,34±0,05	0,16±0,02	0,11±0,01	0,08±0,01	0,03±0		
12**	1,08±0	1,02±0,03	0,87±0,02	0,64±0,03	0,55±0,03	0,45±0,05	0,20±0,03		
13	1,01±0	0,77±0,02	0,53±0,01	0,40±0,02	0,35±0,01	0,30±0	0,18±0,01		
14	1,01±0	0,76±0,02	0,54±0,01	0,39±0,01	0,35±0	0,31±0	0,18±0,01		
15	1,01±0	0,77±0,02	0,54±0,01	0,40±0,02	0,35±0,01	0,31±0	0,18±0,01		

Tabela 4 – Concentração de colesterol (mg/mL)* em diferentes sistemas modelo aquecidos a 160°Cdurante 30 min sob fluxo de O2 constante

*Média \pm desvio padrão de triplicatas

**Controle (contém somente colesterol)

Ensaios numerados de acordo com a tabela 1

Baseando-se nos dados apresentados nas Tabelas 3 e 4 e na Figura 2, pode-se observar que a degradação do colesterol foi dependente da temperatura e da composição de cada sistema modelo.

Os ensaios que apresentaram, no final dos tempos de aquecimento, uma concentração maior de colesterol são os ensaios 1 e 2, com um percentual de degradação do colesterol de 31 e 55 % (temperatura de 130°C) e 45,8 e 59 % (temperatura de 160°C), respectivamente. Já os ensaios que apresentaram maior degradação do colesterol foram, para a temperatura de 130°C, os ensaios 3 e 11 com 96,2 e 97,1 % de degradação ao final de 240 min e na temperatura de 160°C foi o ensaio 11 também com 97,1 % de degradação ao final de 30 min de aquecimento.

Comparando esses ensaios (1, 2, 3 e 11), que apresentam as maiores e as menores concentrações finais de colesterol, com o ensaio controle (12) pode-se verificar que o ensaio controle apresentou uma degradação intermediária, ou seja, degradou mais que os ensaio 1 e 2 e menos que os ensaios 3 e 11. Os ensaios 1 e 2 apresentam em sua composição e eritorbato de sódio, antioxidante redutor, eficiente na inibição da oxidação lipídica, podendo agir também mantendo a mioglobina no seu estado reduzido (ferroso) (Shivas, Kropf, Kastner, Kendall & Dayton, 1984), evitando que a mesma aja como pró-oxidante. Já os ensaios 3 e 11 apresentam, em comum, em sua composição a bixina e ambos apresentam também ácidos graxos insaturados (ensaio 3 – EPA e ensaio 11 – ácido oleico), que podem ter contribuído para a degradação do colesterol, acelerando a formação de peróxidos e radicais.

Outro ensaio que apresentou um comportamento bastante distinto dos demais em ambas as temperatura foi o 4 que em 130°C até os 120 min de aquecimento apresentou ainda uma concentração de 0,5 mg/mL de colesterol, e após esse tempo sofreu uma queda brusca na concentração passando no tempo seguinte, 210 min, a uma concentração de apenas 0,07 mg/mL e permanecendo com a mesma até o tempo final de aquecimento. Já em 160°C, este ensaio apresentou uma perda de somente 21,3 % do colesterol inicial até 10 min de aquecimento e após este tempo sofreu uma queda acentuada na concentração, apresentando 86,4 % de degradação do colesterol no tempo final, 30 min. Outros dois ensaios também se destacam dos demais, são eles, 7 e 12 (controle) em ambas temperaturas. Em 130°C os dois ensaios apresentam uma degradação mais lenta do colesterol até os 60 min de aquecimento, após esse tempo a degradação já está mais próxima dos demais ensaios. Já em 160°C o ensaio 7
apresenta uma degradação lenta até os 8 min de aquecimento e o ensaio 12 permanece com esse comportamento até 10 min. Após esses tempos ambos já apresentam uma degradação mais acelerada como nos demais ensaios. Os outros ensaios não citados acima apresentaram um comportamento bastante semelhante entre si em ambas as temperaturas. Em 130°C houve uma degradação bastante acentuada até os 60 min de aquecimento com perda média de 71,3 % da concentração inicial de colesterol. Após esse tempo a degradação foi menos acentuada com perda média no final de 240 min de 88,8 %. Na temperatura de 160°C, os demais ensaios apresentaram uma degradação acentuada do colesterol em 6 min e no tempo final, 30 min, com percentual de perda média de 53,8 e 84,4 %, respectivamente.



Figura 2 – Degradação térmica do colesterol em sistemas modelo secos em função do tempo x temperatura a 130°C (A) e 160°C (B). Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle, constituído somente de colesterol

Analisando os efeitos das variáveis (Tabelas 5 e 6) sobre a degradação térmica do colesterol, podemos observar que as variáveis que apresentaram efeito significativo (p < 0,10) foram diferenciadas ao longo do tempo de exposição dos sistemas modelo. Variáveis que apresentam efeito positivo podem proteger o colesterol da degradação, já o contrário acontece com as variáveis que apresentam efeito negativo, ou seja, podem acelerar a degradação do colesterol. Esses resultados somente são válidos nas faixas de concentração estudadas neste trabalho. Em faixas de concentração distintas podem ocorrer comportamentos distintos dos observados.

Para a temperatura de 130°C (Tabela 5) verifica-se que, nas condições de concentração estudadas, aumentando as concentrações de eritorbato de sódio e ácido palmítico (nível +1) há uma maior proteção contra a degradação do colesterol. Fato este que pode ser observado a partir de 60 min de aquecimento para o eritorbato de sódio e somente nesse tempo para o ácido palmítico. Já o EPA (todo o tempo de aquecimento), a bixina (90 e 120 min) e o ácido oleico (a partir de 120 min), nas condições de concentração estudadas, mesmo diminuindo as concentrações (nível 0) destas variáveis nos sistemas há evidências do aumento da degradação do colesterol.

A bixina provavelmente não se mostrou protetora na degradação do colesterol, pois, a partir de 15 min a mesma já havia se degradado, provavelmente devido ao longo tempo de exposição à temperatura e presença de O₂. Já os ácidos graxos, oleico e EPA, apresentaram degradação média em torno de 70% e 95% (material suplementar Figuras 10 e 11), respectivamente, ao longo do tempo de aquecimento, o que explicaria a influencia negativa na degradação do colesterol, ou seja, esses ácidos graxos por apresentarem em sua estrutura ligações duplas podem ter desencadeado a

formação de radicais e peróxidos, induzindo a oxidação do colesterol. O eritorbato de sódio apresenta um forte efeito antioxidante, prevenindo o desenvolvimento da oxidação lipídica. Já o ácido palmítico, por não apresentar, em sua estrutura, ligações duplas, pode retardar a formação de radicais que desencadeiam a oxidação.

Essas observações explicam o comportamento diferenciado dos ensaios 1, 2 e 4 frente a degradação do colesterol, pois todos apresentam em sua composição o eritorbato de sódio, que protegeu o colesterol da degradação. Fato este que pode ser observado na Figura 1 onde, ao final do tempo de exposição à temperatura de 130°C, os ensaios 1 e 2 foram os que apresentaram maior concentração de colesterol e o ensaio 4 foi o que apresentou uma lenta degradação do colesterol até o tempo de 120 min. O ensaio 2, além de eritorbato de sódio, apresenta em sua composição o ácido palmítico que, embora demonstrou ter com efeito significativo em somente um dos tempos de exposição, apresenta também um efeito protetor sobre a degradação do colesterol. O ensaio 4 também apresentou uma degradação lenta ao longo do tempo de exposição, porém, diferente, dos ensaios 1 e 2, pois, a partir de 120 min já começou a apresentar um decaimento mais acentuado da concentração de colesterol. Este fato pode ser atribuído à presença de ácido oleico em sua composição, pois, como verificado na análise dos efeitos, este constituinte apresentou, a partir de 120 min de aquecimento, um efeito negativo sobre a degradação, ou seja, nas condições estudadas, menores concentrações destes constituintes já se mostravam significativas na aceleração da oxidação.

Para a temperatura de 160°C (Tabela 6), a análise dos efeitos mostra que o EPA apresentou efeito negativo na degradação do colesterol desde o início da exposição,

permanecendo com o mesmo comportamento até o tempo de 10 min de exposição, mostrando que mesmo concentrações pequenas deste constituinte já são suficientes para degradar significativamente o colesterol. No tempo final de 30 min esta variável já não apresentou efeito significativo devido ao fato de toda a concentração inicial de EPA já ter degradado (material suplementar Figuras 10 e 11), em função de apresentar em sua estrutura 5 ligações duplas, podendo assim, sofrer oxidação lipídica e formar radicais livres que podem ter induzido a oxidação do colesterol. Em 10 min de exposição pode-se verificar também que pequenas quantidades de bixina tem efeito negativo sobre a degradação do colesterol, bem como o ácido oleico, porém, este apresentou tal efeito após 30 min de exposição. Provavelmente, o ácido oleico apresentou efeito negativo, degradando o colesterol, somente no tempo de 30 min devido ao fato de que, até o tempo de 10 min de oxidação o EPA ainda estava presente no sistema, e por possuir maior número de insaturações é mais susceptível à oxidação. Após esse tempo, ou seja, em 30 min o ácido oleico (material suplementar Figuras 10 e 11) ainda estava presente no sistema, sendo, portanto um indutor da formação de radicais que podem desencadear a oxidação do colesterol.

Quanto maior a quantidade de eritorbato de sódio, maior o efeito protetor sobre a degradação do colesterol. Na Tabela 6 podemos observar que tal variável apresentou efeito significativo a partir de 4 min de aquecimento, permanecendo com o mesmo comportamento até o tempo final de 30 min. As mesmas conclusões feitas para a temperatura de 130°C podem ser reportadas à temperatura de 160°C para os ensaios 1, 2 e 4.

As variáveis que não apresentaram efeitos significativos foram o ácido cítrico e a mioglobina. O ácido cítrico não apresentou efeito significativo devido ao fato de que, logo no início do aquecimento, em ambas as temperaturas, já não foi possível detectar tal constituinte nos sistemas. E ao contrário do esperado, a mioglobina não apresentou um efeito significativo sobre a degradação do colesterol, ou seja, o ferro presente em sua estrutura não se mostrou pró-oxidante.

Pode-se supor que este fato tenha ocorrido devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados nos ensaios, pois o metal (ferro) presente na mioglobina tem a capacidade de se complexar com ácidos carboxílicos. A complexação do metal bloqueia os orbitais impedindo a transferência de elétrons podendo reduzir o potencial redox, o que pode diminuir as taxas de oxidação (Schaich, Shahidi, Zhong & Eskin, 2013).

Maiores concentrações de ferro e de mioglobina estão associados a maiores taxas de oxidação lipídica. Além da contribuição pró-oxidante da mioglobina no processo de oxidação e geração da metamioglobina, a dissociação tanto da mioglobina heme quanto do ferro heme também contribuem para o mecanismo pelo qual a mioglobina aumenta a oxidação lipídica (Faustman, Sun, Mancini & Suman, 2010).

Monahan, Crackel, Gray, Buckley & Morrissey (1993) utilizaram um sistema modelo para estudar os efeitos da hemoglobina, mioglobina e FeSO₄ na oxidação lipídica. De acordo com os autores, os maiores valores de TBARS foram obtidos para o tratamento com hemoglobina, seguido dos tratamentos mioglobina > FeSO₄ > controle (carne suína). Faustman, Chan, Schaefer & Havens (1998) propuseram que a vitamina E (α -tocoferol) mantém a mioglobina na forma oxigenada (oximioglobina), inibindo a

oxidação lipídica. Karami, Alimon, Sazili & Goh (2011) afirmaram que o mecanismo exato pelo qual a vitamina E manteve a mioglobina na forma oxigenada não é completamente compreendido.

Já os ascorbatos e seus isômeros, como eritorbato, também são agentes redutores capazes de inibir a oxidação de lípidios por inativação de radicais (Decker & Mei, 1996); a adição de ascorbato em alimentos frescos também pode manter a mioglobina no seu estado reduzido (ferroso) (Shivas, Kropf, Kastner, Kendall & Dayton, 1984).

Outro motivo pelo qual essa variável possa não ter sido efetivamente significativa é porque pode não ter ocorrido a oxidação de Fe⁺² para Fe⁺³, sendo este último um efetivo pró-oxidante. Segundo Schaich et al. (2013) metais oxidados são iniciadores diretos fortes, formando radicais através da abstração de elétrons das ligações duplas. Em contraste, os metais na forma reduzida tendem a ser iniciadores indiretos; reagem preferencialmente com o oxigênio para formar complexos ou espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem, então, iniciar a oxidação dos lipídios presentes no meio.

Não existe ainda um consenso sobre o papel do grau de insaturação dos ácidos graxos na oxidação do colesterol. De acordo com alguns autores, outros fatores podem ser fortemente determinantes no comportamento oxidativo, tais como a temperatura e o tempo de aquecimento sendo o efeito dos ácidos graxos sobre a oxidação do colesterol mais dificilmente relacionado com o seu grau de insaturação (Xu, Sun, Liang, Yang & Chen, 2011).

Estudos recentes realizados em carne de cavalo e ovos concluíram que o maior grau de instauração da matriz lipídica promove a oxidação do colesterol (Boselli, Rodriguez-Estrada, Ferioli, Caboni & Lercker, 2010; Pignoli, Rodriguez-Estrada, Mandrioli, Barbanti, Rizzi & Lercker, 2009) devido à geração de um ambiente próoxidante com a presença de radicais livres e hidroperóxidos (Ohshima, 2002). Em trabalho anterior desenvolvido por Kim & Nawar (1991), os autores afirmam que durante o aquecimento, a presença de ácidos graxos insaturados promove oxidação do colesterol mais prontamente do que a presença de ácidos graxos saturados, concordando assim com os resultados encontrados neste trabalho.

A maioria dos estudos que tratam da oxidação do colesterol foi realizada com alimentos (Boselli et al., 2012; Cardenia, Rodriguez-Estrada, Boselli & Lercker, 2013; Orczewska-Dudek, Bederska Lojewska, Pieszka & Pietras, 2012; Lehtonen, Lampi, Riuttamäki & Piironen, 2012), de modo que há interferência de outros componentes da amostra. Dessa forma, os sistemas modelo são reconhecidos como um bom meio para se obter informações precisas sobre o comportamento dos esteróis submetidos ao aquecimento (Barriuso, Otaegui-Arrazola, Menéndez-Carreño, Astiasarán & Ansorena et al., 2012; Chien, Hsu, Inbaraj & Chen, 2010).

Estudando sistemas modelo foto-oxidados contendo ésteres metílicos de ácidos graxos e colesterol, Hu & Chen (2002) observaram que a presença de estearato resultou em uma maior perda de colesterol do que a presença de linoleato e docosa-hexaenoato. No entanto, Nogueira (2011) verificou através de um estudo com sistemas modelo contendo colesterol e ácido linolênico ou esteárico nas temperaturas de 140 e 180°C, que ambos os ácidos graxos aceleraram a degradação do colesterol, e

aumentaram a formação de óxidos. Entretanto quando comparados com o sistema modelo que continha somente colesterol, a formação total de COP's foi menor. Também em trabalho com sistemas modelo Ansorena, Barriuso, Cardenia, Astiasarán, Lercker & Rodriguez-Estrada (2013) avaliaram a influência do grau de insaturação de diferentes triacilgliceróis (triestearina, trioleína, trilinoleína e trilinolenina) sobre a oxidação de colesterol a 180°C. Os autores concluíram que o colesterol, quando aquecido sozinho degradou mais rapidamente do que em presença dos triacilgliceróis.

	15 min					60 min 90 min								12	20 min			21	10 min		240 min			
Variáveis	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Efei to	Erro padrão	t(7)	p-valor	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	0,64	0,05	12,12	<0,0001	0,38	0,04	10,52	<0,0001	0,29	0,03	10,02	<0,0001	0,24	0,03	8,58	<0,0001	0,18	3 0,04	4,24	0,0038	0,16	0,04	4,46	0,0029
1	0,21	0,12	1,80	0,1142	0,37	0,08	4,62	0,0024	0,39	0,06	6,04	0,0005	0,33	0,06	5,34	0,0011	0,23	8 0,09	2,42	0,0463	0,22	0,08	2,62	0,0343
2	-0,11	0,12	-0,90	0,4005	-0,13	0,08	-1,66	0,1399	-0,18	0,06	-2,80	0,0265	-0,16	0,06	-2,57	0,0368	-0,08	8 0,09	-0,89	0,4038	-0,07	0,08	-0,85	0,4248
3	0,07	0,12	0,58	0,5785	0,15	0,08	1,87	0,1033	0,11	0,06	1,62	0,1494	0,05	0,06	0,84	0,4286	0,01	0,09	0,14	0,8910	0,02	0,08	0,24	0,8156
4	0,08	0,12	0,67	0,5257	0,16	0,08	2,00	0,0859	0,07	0,06	1,11	0,3056	-0,01	0,06	-0,19	0,8549	-0,08	8 0,09	-0,89	0,4038	-0,06	0,08	-0,73	0,4912
5	-0,40	0,12	-3,40	0,0115	-0,38	0,08	-4,70	0,0022	-0,29	0,06	-4,45	0,0030	-0,25	0,06	-4,09	0,0046	-0,1	9 0,09	-2,03	0,0825	-0,16	0,08	-1,90	0,0997
6	-0,06	0,12	-0,50	0,6343	-0,06	0,08	-0,75	0,4782	-0,09	0,06	-1,31	0,2313	-0,15	0,06	-2,47	0,0431	-0,2	2 0,09	-2,31	0,0542	-0,18	0,08	-2,14	0,0698
7	-0,05	0,12	-0,41	0,6927	-0,02	0,08	-0,21	0,8411	-0,04	0,06	-0,59	0,5730	-0,02	0,06	-0,24	0,8143	0,04	l 0,09	0,43	0,6826	0,05	0,08	0,61	0,5641

Tabela 5 – Efeito das variáveis na degradação térmica do colesterol em sistemas modelo secos aquecidos a 130°C

Significância = p < 0,10

1 = eritrobato de sódio, 2 = bixina, 3 = ácido cítrico, 4 = ácido palmítico, 5 = EPA, 6 = ácido oleico e 7 = mioglobina

	Tabela 6 –	Efeito das	variáveis na	degradação	térmica do	colesterol en	n sistemas	modelo secos	aquecidos a	160°C
--	------------	------------	--------------	------------	------------	---------------	------------	--------------	-------------	-------

	2 min				4 min				6 min					8 min				10 min				30 min			
Variáveis	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor																					
Média	0,83	0,02	41,48	<0,0001	0,66	0,04	16,82	<0,0001	0,55	0,04	12,78	<0,0001	0,49	0,03	14,13	<0,0001	0,42	0,03	15,06	<0,0001	0,19	0,03	6,99	0,0002	
1	0,07	0,04	1,52	0,1712	0,20	0,09	2,22	0,0616	0,27	0,10	2,78	0,0274	0,29	0,08	3,68	0,0079	0,32	0,06	5,14	0,0013	0,20	0,06	3,14	0,0163	
2	-0,04	0,04	-0,78	0,4604	-0,11	0,09	-1,20	0,2703	-0,09	0,10	-0,90	0,3968	-0,10	0,08	-1,31	0,2306	-0,13	0,06	-2,07	0,0768	-0,06	0,06	-0,99	0,3532	
3	0,02	0,04	0,33	0,7477	0,10	0,09	1,12	0,2993	0,13	0,10	1,35	0,2179	0,14	0,08	1,79	0,1172	0,10	0,06	1,59	0,1561	-0,03	0,06	-0,40	0,6989	
4	0,04	0,04	0,86	0,4207	0,14	0,09	1,54	0,1677	0,16	0,10	1,63	0,1468	0,13	0,08	1,70	0,1328	0,08	0,06	1,32	0,2284	-0,02	0,06	-0,35	0,7371	
5	-0,23	0,04	-5,09	0,0014	-0,33	0,09	-3,70	0,0076	-0,32	0,10	-3,33	0,0126	-0,26	0,08	-3,38	0,0118	-0,23	0,06	-3,74	0,0072	-0,07	0,06	-1,16	0,2858	
6	-0,03	0,04	-0,63	0,5473	-0,04	0,09	-0,47	0,6493	-0,07	0,10	-0,73	0,4897	-0,08	0,08	-0,97	0,3650	-0,13	0,06	-2,07	0,0768	-0,13	0,06	-2,07	0,0773	
7	-0,07	0,04	-1,60	0,1538	-0,10	0,09	-1,08	0,3147	-0,12	0,10	-1,25	0,2516	-0,13	0,08	-1,66	0,1414	-0,11	0,06	-1,70	0,1335	0,00	0,06	-0,03	0,9793	

Significância = p < 0,10 1 = eritrobato de sódio, 2 = bixina, 3 = ácido cítrico, 4 = ácido palmítico, 5 = EPA, 6 = ácido oleico e 7 = mioglobina

3.2 Formação de óxidos de colesterol

A oxidação do colesterol foi avaliada pela extensão da formação de óxidos de colesterol observada em cada sistema modelo para cada temperatura de aquecimento. Como podemos observar na Figura 3A, durante o aquecimento ocorreu a formação de 5 óxidos de colesterol (Figura 3B), os quais foram: 7-ceto, 7β-OH, 7α-OH, 5,6α-epóxido e 5,6β-epóxido, tanto a 130 quanto a 160°C (Figuras 4 a 8 e material suplementar Tabelas 9 a 18).





Figura 3 – Cromatograma obtido por HPLC (UV 210 nm e RID) do sistema modelo contendo colesterol puro submetido a 160 °C sob fluxo constante de 10 mL/min de O₂ em 0 min (A) e após 10 min (B - UV e C - RID) de aquecimento

*7β-OOH e 7α-OOH identificados por Nogueira, Costa, Crotti & Bragagnolo, 2010.

A Figura 4 mostra a formação de 7-ceto. Pode-se observar que houve maior formação deste óxido nos ensaios 2, 4, 7, 11 e 12, nas duas temperaturas estudadas.

Na temperatura de 130°C (Figura 4A), os ensaios 2 e 4 apresentaram formação de 7-ceto acima de 140 µg/mL no final do aquecimento com concentrações de 141,82 e 147,26 µg/mL, respectivamente. No ensaio 7 houve a formação de 151,18 µg/mL no tempo de 120 min e após esse tempo houve um decréscimo na concentração de 7-ceto. Já o ensaio 11 apresentou maior concentração de 7-ceto após 60 min de aquecimento com valor de 217,81 µg/mL. O ensaio 12 apresentou um teor praticamente constante após 90 min de aquecimento, com maior formação no tempo de 120 min com concentração de 200,74 µg/mL. Outro ensaio que apresentou um comportamento diferenciado na temperatura de 130°C foi o 3. Como pode-se observar pela Figura 4A, após 15 min de oxidação ele apresenta uma concentração de 41,56 µg/mL de 7-ceto, decaindo para 6,61 µg/mL no tempo seguinte, 60 min e continuando com uma queda na concentração, atingindo 2,06 µg/mL ao final de 240 min.

Para a temperatura de 160°C (Figura 4B) os ensaios 2, 4, 7 e 12 apresentaram as maiores concentrações no final do aquecimento (30 min) com valores de 120,27; 149,37; 113,22 e 167,66 µg/mL, respectivamente. No entanto, o ensaio 11 apresentou uma concentração de 217,39 µg/mL de 7-ceto em 6 min de aquecimento e após este tempo houve decréscimo na quantidade para 115,5 µg/mL em 30 min de aquecimento. Os outros ensaios apresentaram formação de 7-ceto abaixo de 60 µg/mL após 30 min de aquecimento.



Figura 4 – Formação de 7-ceto nos sistemas modelo secos a 130 (A) e 160°C (B). Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle, constituído somente de colesterol

A Figura 5 apresenta os resultados encontrados para a formação de 7α-OH. Para a temperatura de 130°C (Figura 5A) o ensaio 2 apresentou um máximo de formação deste óxido em 120 min de aquecimento com concentração de 35,38 µg/mL, mantendo esta quantidade praticamente constante até o tempo final de aquecimento. O ensaio 4 também apresentou uma maior formação de 7α-OH em 120 min de aquecimento com concentração de 25,61 µg/mL, porém, diferentemente do ensaio 2 onde a concentração permaneceu constante até o final do experimento, neste ensaio houve decréscimo para 10,59 µg/mL no final do experimento. Já o ensaio 7 apresentou maior formação em 90 min com concentração de 28,72 µg/mL, após este tempo houve grande decréscimo nesta concentração passando para 2,06 µg/mL em 240 min de aquecimento. Assim como no ensaio 7, o ensaio 12 também apresentou maior de formação de 7 α -OH em 90 min de aquecimento com concentração de 40,35 μ g/mL, porém neste, houve menor decréscimo na concentração final atingindo 21,4 µg/mL. Diferentemente dos ensaios citados acima, o ensaio 11 apresentou maior formação de 7α-OH em 15 min de aquecimento com concentração de 69,15 µg/mL e após 60 min houve um decréscimo drástico nesta concentração, chegando a 1,98 µg/mL em 240 min. Os ensaios 1 e 3 também apresentaram um comportamento diferenciado em relação a formação de 7α-OH. O ensaio 3 apresentou formação somente no tempo de 15 min, com teor de 11,82 µg/mL e após 60 min este óxido já não foi mais detectado e o ensaio 1 apresentou formação a partir de 90 min com valor de 0,5 µg/mL o qual foi aumentando até o final do aquecimento, mas chegando a apenas ao teor 1,34 µg/mL. Para esta temperatura, todos os outros ensaios apresentaram concentrações abaixo de 22 μ g/mL de 7 α -OH aos 15 min e depois foram decrescendo.

Na temperatura de 160°C (Figura 5B), o ensaio 2 apresentou maior formação de 7 α -OH em 30 min de aquecimento (34,89 µg/mL), assim como ocorreu no ensaio 4 que apresentou uma concentração de 6,13 µg/mL até 10 min de aquecimento e em 30 min esta concentração passou para 18,63 µg/mL. Os ensaio 7 e 12 apresentaram um pico de concentração em 10 min com valores de 26,98 e 40,94 µg/mL, respectivamente. Já o ensaio 11 apresentou a maior formação de 7 α -OH quando comparado com os outros ensaios, com pico de concentração em 4 min de aquecimento (60,93 µg/mL), apresentando um alto decréscimo após este tempo, com concentração final de 4,93 µg/mL.

Nesta temperatura, todos os outros ensaios apresentaram concentrações abaixo de 20 μ g/mL de 7 α -OH.



Figura 5 – Formação de 7α-OH nos sistemas modelo secos a 130 (A) e 160°C (B). Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle, constituído somente de colesterol

A Figura 6 apresenta a formação de 7β-OH ao longo do aquecimento para as temperaturas de 130 e 160°C. Na temperatura de 130°C (Figura 6A), o ensaio 2 apresentou maior formação deste óxido a partir de 120 min de aquecimento com concentração de 32,72 µg/mL com pequeno aumento (36,37 µg/mL) até o final do tempo de aquecimento (240 min). Já o ensaio 4 teve um pico de formação em 120 min de aquecimento com concentração de 30,04 µg/mL. Os ensaios 5, 6, 8, 9 e 10 apresentaram um comportamento semelhante com maior formação de 7β-OH em 15 min de aquecimento, com concentração de 22,48; 27,11; 19,17; 24,2 e 25,82 µg/mL, respectivamente, tendo um decréscimo na concentração após 120 min. O ensaio 7 apresentou pico de formação em 60 min (32,43 µg/mL) tendo um decréscimo drástico em 210 min, com concentração de 2,18 µg/mL. Os ensaios 3 e 11 foram os que apresentaram o comportamento mais diferenciado, com pico de formação em 15 min de aquecimento (18,88 e 60,67 µg/mL, respectivamente). Após este tempo, já apresentaram um decréscimo na concentração para 0,73 e 9,22 µg/mL, respectivamente, em 60 min de aquecimento. Outro ensaio que apresentou um comportamento diferenciado do restante foi o ensaio 12, que apresentou maior formação em 90 min de aquecimento, com concentração de 37,73 µg/mL, apresentando pequeno decréscimo até o final do experimento. Outros 3 ensaios apresentaram um comportamento diferenciado (ensaios 13, 14 e 15) que também apresentaram pico de formação de 7β-OH em 15 min, com média de concentração de 28 µg/mL. O ensaio 1 foi que apresentou a menor concentração iniciando a formação apenas em 90 min (0,63 µg/mL) e chegando aos 240 min com concentração de 1,49 $\mu g/mL.$

Para a temperatura de 160°C (Figura 6B) houve maior homogeneidade na formação deste óxido em todos os ensaios, com destaque para os ensaios 11 e 12. O ensaio 11 apresentou a maior formação em 4 min de aquecimento com concentração de 57,99 μ g/mL e o 12 em 10 min de aquecimento com concentração de 45,32 μ g/mL. Já os ensaios 1 e 4 apresentaram uma concentração de 7 β -OH baixa até o tempo de 10 min de aquecimento e já no tempo seguinte, 30 min, essa concentração aumentou em 16,18 e 12,34 μ g/mL nos ensaios 1 e 4, respectivamente. Outro ensaio que também apresentou um comportamento semelhante foi o 2, que do tempo de 10 min para o seguinte, 30 min, teve um aumento de 17,61 μ g/mL deste óxido. Os ensaios 7 e 8 ao contrário dos citados anteriormente (1, 2 e 4) apresentaram altas concentrações de 7 β -OH entre os tempos de 8 e 10 min (34,29 μ g/mL em 10 min no ensaio 7 e 40,54 μ g/mL em 8 min no ensaio 8), concentração esta que decaiu no tempo de 30 min para 9,65 e 1,30 μ g/mL, respectivamente. Todos os outros ensaios apresentaram concentrações inferiores a 41 μ g/mL.



Figura 6 – Formação de 7β-OH nos sistemas modelo secos a 130 (A) e 160°C (B). Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle, constituído somente de colesterol

A Figura 7 mostra a formação de 5,6α-epóxido nos ensaios submetidos às temperaturas de 130 e 160°C. Com exceção dos ensaios 1 e 2, todos os outros apresentaram concentrações deste óxido acima de 26 µg/mL, com destaque para o ensaio 7, que em 130°C (Figura 7A) apresentou um pico de formação em 90 min de aquecimento com concentração de 102,49 µg/mL e na temperatura de 160°C apresentou maior concentração em 10 min de aquecimento (81,33 µg/mL). Outros ensaios que apresentaram concentrações elevadas de 5,6α-epóxido na temperatura de 130°C foram os ensaios 11, 13, 14 e 15, com concentrações de 85,55; 78,33; 78,67 e 78,50 µg/mL, respectivamente, em 15 min de aquecimento. Após este tempo, houve decréscimo, até atingir 8,63; 16,24; 16,58 e 16,41 µg/mL, respectivamente, em 240 min. Outro ensaio que apresentou comportamento diferenciado na temperatura de 130°C foi o ensaio 3. O mesmo apresentou uma formação de 5,6α-epóxido de 54,77 µg/mL em 15 min de aquecimento e após esse tempo o teor deste óxido caiu para 0 µg/mL. Já na temperatura de 160°C (Figura 7B), os ensaios 11, 13, 14 e 15 também apresentaram concentrações máximas sendo 91,75, 73,91, 73,22 e 73,57 µg/mL, respectivamente, porém no tempo de 6 min. Em ambas temperaturas, o ensaio 1 não formou este óxido. No ensaio 4 o 5,6α-epóxido começou a se formar a partir de 90 e 6 min a 130 e 160°C, respectivamente, aumentando até o final cujas concentrações finais foram maiores que nos demais ensaios.



Figura 7 – Formação de 5,6α-epóxido nos sistemas modelo secos a 130 (A) e 160°C (B). Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle, constituído somente de colesterol

A Figura 8 mostra a formação de 5,6β-epóxido nos ensaios. Como ocorrido para o óxido 5,6α-epóxido, o ensaio 1 não formou este óxido em ambas temperaturas. Todos os outros ensaios apresentaram concentrações acima de 20 µg/mL, com destaque para os ensaios 11, 13, 14 e 15 na temperatura de 130°C (Figura 8A), que apresentaram maior formação deste óxido em 15 min de aquecimento, com concentrações de 209,44, 153,64, 158,7 e 156,17 µg/mL, respectivamente e na temperatura de 160°C (Figura 8B), com concentrações de 196,32; 137,76; 142,82 e 140,29 µg/mL, respectivamente. O ensaio 7, na temperatura de 130°C também apresentou concentração de 5,6β-epóxido acima de 150 µg/mL porém, em 90 min de aquecimento, a qual decaiu para 26,42 µg/mL no tempo de 240 min. O mesmo comportamento do ensaio 3 ocorrido na formação de 5,6a-epóxido, pode ser observado para o 5,6β-epóxido, com concentração de 83,27 μg/mL em 15 min de aquecimento, decaindo para 0 µg/mL após esse tempo. Outro ensaio com comportamento semelhante à formação de 5,6a-epóxido, foi o ensaio 12 (controle), tanto em 130°C quanto em 160°C. Até o tempo de 15 min de aquecimento a 130°C este óxido não foi encontrado e já no tempo seguinte a concentração de 5,6β-epóxido foi de 125,4 μg/mL, atingindo o máximo de concentração em 90 min com 131,93 µg/mL. Na temperatura de 160°C (Figura 8B) este óxido foi formado, no tempo de 4 min na concentração de 35,82 μ g/mL, chegando ao máximo em 10 min com 116,37 μ g/mL.

Na temperatura de 160°C, o ensaio 7 apresentou concentração de 149,4 µg/mL em 10 min, decaindo para 49,87 µg/mL no tempo final do experimento. Os ensaios 2 e 4 também se destacam dos demais, com concentrações iniciais de 5,6β-epóxido baixas em ambas as temperaturas, aumentando proporcionalmente com o aumento do tempo

de aquecimento, destacando-se dos demais, principalmente nos tempos finais com concentrações acima de 80 μg/mL. Os demais ensaios apresentam um comportamento semelhante, com aumento da concentração deste óxido à medida que aumenta o tempo de aquecimento, atingindo um máximo de concentração. Após atingir esse máximo já ocorre a degradação do 5,6β-epóxido. Em 130°C, pode-se perceber que na maioria dos ensaios a concentração máxima é atingida já no primeiro tempo de aquecimento (15 min), diferente de 160°C, onde o máximo de concentração é atingido em 4 ou 6 min de aquecimento.



Figura 8 – Formação de 5,6β-epóxido nos sistemas modelo secos a 130 (A) e 160°C (B). Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle, constituído somente de colesterol

Analisando as Figuras de 4 a 8, que apresentam a formação individual de cada óxido, pode-se observar que o principal óxido formado em ambas as temperaturas foi o 5,6 β -epóxido, seguido do 7-ceto > 5,6 α -epóxido > 7 β -OH > 7 α -OH, verificação feita pela soma das maiores concentrações para cada óxido de cada um dos ensaios.

O mecanismo de formação dos epóxidos é complexo. Eles não são formados apenas pela reação do colesterol com o oxigênio triplete (${}^{3}O_{2}$) e singlete (${}^{1}O_{2}$), mas por diferentes espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o peróxido de hidrogênio ($H_{2}O_{2}$), radicais hidroxilas (OH•), peroxilas (ROO•), alcoxilas (RO•) e ozônio (O_{3}) (Gumulka, Pyrek & Smith, 1982; Guardiola, Codony, Addis, Rafecas & Boatella, 1996). Outro mecanismo que poderia explicar a maior formação de 5,6β-epóxido é a presença de 7-hidroperoxicolesterol (7-OOH) por uma reação bimolecular (Smith, 1987).

A Figura 9 (material suplementar Tabelas 19 e 20) apresenta a formação total de COP's em cada ensaio para cada tempo de exposição ao aquecimento. Podemos observar que as concentrações de óxidos para a temperatura de 130°C (Figura 9A) variaram de 0 a 614,38 µg/mL, respectivamente, sendo a concentração máxima encontrada no ensaio 11 no tempo de 15 min de aquecimento, concentração esta que decaiu para 125,38 µg/mL no tempo final de aquecimento, 240 min. Já para a temperatura de 160°C (Figura 9B) as concentrações variaram de 0 a 588,69 µg/mL. A máxima concentração de óxidos foi observada também para o ensaio 11 no tempo de 6 min (588,69 µg/mL), apresentando ao final do tempo de aquecimento (30 min) uma concentração de 173,2 µg/mL. Observando a Figura 2, podemos perceber que o ensaio que apresentou a menor concentração final de colesterol foi também o ensaio 11.

O ensaio 1 que apresentou uma menor degradação do colesterol (31 e 46 % em 130 e 160°C, respectivamente) ao longo do aquecimento foi o que apresentou a menor formação de óxidos durante este período, com concentrações abaixo de 7 µg/mL na temperatura de 130°C e de 50 µg/mL na temperatura de 160°C. As baixas concentrações de COP's neste ensaio se devem a presença de eritorbato de sódio em sua composição, visto que este apresenta um acentuado efeito antioxidante, impedindo assim a oxidação do colesterol e consequentemente a formação de óxidos.

Já o ensaio 2 que também teve uma degradação do colesterol abaixo de 60 %, apresentou altas concentrações de óxidos nos tempos finais de exposição. Tais concentrações foram de 319,69 µg/mL em 130°C e 303,22 µg/mL em 160°C. O ensaio 4 também apresentou baixa concentração de COP's até os 90 min de aquecimento para a temperatura de 130°C, atingindo no tempo final (30 min) concentração de 295,37 µg/mL. Na temperatura de 160°C este mesmo ensaio apresentou o mesmo comportamento, baixa concentração de COP's até 10 min de aquecimento, aumentando para 365,22 µg/mL no tempo final, 30 min. Ambos os ensaios 2 e 4 apresentam em sua composição o eritorbato de sódio, já citado anteriormente com um efetivo antioxidante, retardando a oxidação do colesterol e consequentemente a formação de óxidos.

Um comportamento diferenciado pode ser observado no ensaio 3 para a temperatura de 130°C. O mesmo apresenta uma concentração elevada de óxidos (210,3 µg/mL) em 15 min de aquecimento, concentração esta que decai drasticamente no tempo seguinte, 60 min, atingindo um teor de apenas 7,34 µg/mL. Este fato se deve a rápida degradação do colesterol, observada na Figura 2, onde após 15 min de

aquecimento a concentração de colesterol obtida foi somente 0,35 mg/mL decaindo para 0,04 mg/mL já no tempo seguinte, 60 min.

O ensaio 12 (controle) foi outro ensaio que também apresentou um comportamento diferenciado dos demais ao longo do aquecimento para as duas temperaturas estudadas. Em 130°C a concentração máxima de COP's foi atingida em 90 min de aquecimento (463,63 µg/mL), concentração esta que sofreu uma queda no tempo final de aquecimento (240 min) para 341,35 µg/mL, mesmo assim foi a maior dentre todos os ensaios no tempo final. Na temperatura de 130°C o tempo de aquecimento foi bastante prolongando, demonstrando que, a taxa de degradação dos COP's foi maior que a taxa de formação dos mesmos. Já em 160°C a concentração de óxidos só aumentou durante todo o tempo de aquecimento, variando de 6,97 a 414,06 µg/mL, nos tempos de 2 e 30 min, respectivamente. Provavelmente, este tempo de aquecimento não foi suficiente para que ocorresse a degradação dos óxidos com consequente formação de outros produtos. Tal fato se deve a temperatura e ao tempo que o colesterol foi aquecido. O binômio tempo x temperatura contribui efetivamente na formação de óxidos e consequente degradação dos mesmos, ou seja, a taxa de degradação dos COP's foi maior que sua taxa de formação, pois se o tempo de aquecimento for elevado poderá ocorrer a degradação não apenas do colesterol, mas também dos produtos da oxidação, dando origem assim a outros COP's e produtos de maior peso molecular, como polímeros e outros compostos ainda desconhecidos (Park & Addis, 1986; Kim & Nawar, 1993; Hur, Park & Joo et al., 2007). Ansorena et al. (2013) em trabalho desenvolvido com sistemas modelo de colesterol adicionados de diferentes triacilgliceróis (TAG) demonstraram que o colesterol sozinho apresentou uma

maior formação de óxidos no estágio inicial da oxidação (20 min) a 180°C, quando comparado com a formação inicial de COP's nos sistemas que continham TAG.

Os demais ensaios, para ambas as temperaturas, apresentaram comportamento semelhante, com concentrações máximas atingidas nos tempos médios de aquecimento. Após esses tempos houve queda na concentração de COP's provavelmente devido a degradação dos mesmos para formação de outros compostos.



Figura 9 – Formação total de COP's nos sistemas modelo secos a 130 (A) e 160°C (B). Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle, constituído somente de colesterol

3.3 Confirmação da identidade dos óxidos de colesterol

Foram identificados e confirmados 5 óxidos: 7-ceto, 7 α -OH, 7 β -OH, 5,6 α - e β epóxidos (Figura 3B), todos oriundos da oxidação do anel B.

Dois hidroperóxidos também foram identificados por espectrometria de massas, o 7α-OOH e o 7β-OOH. Para os hidroperóxidos os tempos de retenção e os espectros de massas foram comparados aos encontrados por Nogueira, Costa, Crotti & Bragagnolo, 2010.

A Figura 10 apresenta os espectros de massas dos óxidos de colesterol identificados a partir do cromatograma apresentado na Figura 3B. Os mesmos foram comparados com os espectros de massas de cada um dos padrões de óxidos de colesterol (Mariutti et al., 2008; Nogueira et al., 2011).



7-cetocolesterol

5,6α-epóxido



5,6β-epóxido



7β-ООН



7α-**Ο**ΟΗ



7β-ΟΗ



Figura 10 - Espectros de massas (MS e MS/MS) obtidos dos óxidos de colesterol

4. Conclusão

Quanto maior o tempo de aquecimento, maior foi a degradação do colesterol, com perda de 97 % do colesterol inicial nas temperaturas de 130 e 160°C. As variáveis que contribuíram significativamente nesse processo foram o EPA, bixina e ácido oleico que, ao longo do aquecimento, aceleraram a degradação do colesterol. Por outro lado, as variáveis que apresentaram efeito protetor sobre a degradação do colesterol foram o eritorbato de sódio e o ácido palmítico, em 130°C e o eritorbato de sódio na temperatura de 160°C.

Quanto à formação de COP's, pode-se concluir que, o 5,6β-epóxido foi o óxido formado em maior quantidade em ambas temperaturas. A concentração total de COP's em ambas temperaturas foram semelhantes.

Em resumo, pode-se sugerir que a presença de ácidos graxos insaturados contribuiu para a degradação do colesterol, enquanto que, o antioxidante eritorbato de sódio retardou a oxidação, assim como o ácido palmítico (saturado). Por outro lado, o Fe presente na mioglobina não apresentou efeito pró-oxidante, assim como o ácido cítrico não apresentou efeito protetor sobre a degradação do colesterol, pois já havia se degradado.
Material suplementar

Tabela 7 – Formação de 7-ceto (μ g/mL)*durante aquecimento dos sistemas a 130°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
15	0,00 ± 0	3,77 ± 0,30	41,56 ± 4,98	$3,07\pm0,03$	32,71 ± 1,02	34,99 ± 2,66	4,33 ± 0,78	46,78 ± 6,57	43,65 ± 4,59	32,46 ± 1,99	189,57 ± 19,57	11,53 ± 2,09	49,86 ± 2,54	51,42 ±2,18	50,64 ± 2,33
60	0,00 ± 0	24,63 ±2,47	6,61 ± 0,86	6,90 ± 1,27	41,73 ± 3,36	52,74 ± 3,34	57,97 ± 4,57	47,46 ± 1,10	63,74 ± 2,81	47,38 ± 1,57	217,81 ± 11,96	144,83 ± 22,97	66,48 ± 1,59	68,04 ± 1,64	67,26 ± 2,39
90	$3,79\pm0,14$	86,31 ± 5,30	3,07 ± 0,29	7,21 ± 1,40	39,92 ± 2,19	52,89 ± 0,71	145,55 ± 5,43	31,99 ± 1,35	57,86 ± 6,38	43,42 ± 1,41	173,63 ± 1,34	193,00 ± 11,57	61,72 ± 0,86	61,32 ± 0,21	61,52 ± 0,96
120	$1,19\pm0,17$	95,65 ± 13,38	2,54 ± 0,19	59,40 ± 13,41	33,48 ± 4,04	39,65 ± 2,90	151,18 ± 7,38	31,34 ± 0,97	22,64 ± 4,25	39,75 ± 1,97	144,03 ± 10,13	200,74 ± 36,02	58,80 ± 1,52	$59,58 \pm 0,75$	59,19 ± 1,72
210	$2,98\pm0,65$	122,42 ± 10,58	2,09 ± 0,16	165,38 ± 12,98	23,37 ± 2,90	23,19 ± 1,47	107,81 ± 3,78	19,26 ± 3,43	23,09 ± 2,12	30,73 ± 0,75	104,48 ± 3,88	191,90 ± 29,12	50,62 ± 1,36	51,41 ± 0,64	51,02 ± 0,89
240	$3{,}30\pm0{,}02$	141,82 ± 13,53	2,06 ± 0,34	147,26 ± 2,72	21,97 ± 1,02	24,47 ± 3,96	105,68 ± 5,00	15,88 ± 1,28	18,59 ± 2,45	29,05 ± 2,02	102,41 ± 13,72	161,29 ± 10,22	42,74 ± 6,88	38,83 ± 0,11	40,79 ± 6,15

Tabela 8 – Formação de 7-ceto $(\mu g/mL)^*$ durante aquecimento dos sistemas a 160°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	$0,00\pm0$	0,00 ± 0	$0,00\pm0$	$0,00\pm0$	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
2	0,00 ± 0	$1,59 \pm 0,35$	$30,85\pm3,00$	0,71 ± 0,11	22,72 ± 3,37	12,23 ± 1,77	$3,66 \pm 0,51$	27,28 ± 2,94	15,82 ± 1,58	27,86 ± 2,63	63,20 ± 3,31	1,80 ± 0,16	15,91 ± 2,40	17,08 ±3,44	16,50 ± 2,50
4	0,59 ±0,03	1,47 ±0,21	46,26 ± 8,28	1,49 ± 0,21	40,71 ± 8,56	25,10 ± 3,70	$6{,}34\pm0{,}41$	43,96 ± 4,68	41,48 ± 5,95	41,12 ± 0,88	174,47 ± 18,28	15,01 ± 1,26	43,80 ± 1,40	44,97 ± 0,69	44,39 ± 1,30
6	1,87 ± 0,19	$3{,}90\pm0{,}94$	34,74 ± 2,53	5,98 ± 1,20	37,61 ± 2,62	38,19 ± 5,90	18,62 ± 3,04	55,70 ± 2,24	56,76 ± 13,56	44,86 ± 3,17	217,39 ± 1,13	50,30 ± 6,15	59,17 ± 1,62	59,56 ± 1,75	59,37 ± 1,32
8	$0,\!98\pm0,\!06$	$13,74 \pm 0,79$	$32,70\pm3,08$	3,39 ± 0,71	36,71 ± 3,02	36,12 ± 2,73	42,89 ± 3,35	58,14 ± 2,32	61,66 ± 7,22	46,12 ± 5,86	210,61 ± 3,68	$66,02 \pm 7,46$	$64,15\pm0,76$	63,76 ± 0,33	63,69 ± 0,86
10	0,61 ± 0,08	29,71 ± 3,07	19,21 ± 0,56	9,76 ± 1,40	38,16 ± 1,74	38,6 ± 1,87	82,03 ± 5,66	50,09 ± 4,18	65,28 ± 10,95	42,13 ± 4,75	200,88 ± 4,77	103,75 ± 14,57	65,63 ± 2,56	64,07 ± 0,35	64,85 ± 2,56
30	18,74 ± 3,59	120,27 ± 8,06	5,38 ± 0,35	149,37 ± 9,51	$34,75\pm0,70$	46,02 ± 3,72	113,22 ± 4,95	23,63 ± 2,06	44,97 ± 1,82	32,26 ± 2,66	115,5 ± 9,04	167,66 ± 7,39	55,05 ± 1,41	55,83 ± 0,22	55,44 ± 1,33

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 9 – Formação de 7 β -OH (μ g/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 130°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
15	0,00 ± 0	1,96 ± 0,20	18,88 ± 0,94	1,70 ± 0,03	22,48 ± 1,18	27,11 ± 2,10	3,46 ± 0,23	19,17 ± 1,24	24,20 ± 2,21	$25,\!82\pm2,\!96$	$60,67\pm0,37$	6,44 ± 1,03	$28,\!2\pm0,\!40$	27,97 ± 0,40	28,09 ± 0,23
60	0,00 ± 0	$14{,}25\pm0{,}80$	0,73 ± 0	2,45 ± 0,15	20,10 ± 0,61	19,14 ± 1,43	32,43 ± 0,71	10,28 ± 0,48	11,02 ± 1,07	19,80 ± 1,05	9,22 ± 2,57	33,32 ± 3,44	19,42 ± 0,31	19,48 ± 0,31	19,45 ± 0,81
90	0,63 ± 0,01	27,13 ± 4,48	0,00 ± 0	4,58 ± 0,83	14,29 ± 1,15	12,35 ± 1,39	27,62 ± 2,89	3,56 ± 0,19	7,20 ± 1,39	15,15 ± 0,40	3,14 ± 0,24	37,73 ± 2,75	15,67 ± 0,32	15,56 ± 0,32	15,62 ± 0,83
120	$0,58\pm0,06$	$32,72\pm4,96$	0,00 ± 0	30,04 ± 3,51	9,92 ± 1,30	6,21 ± 0,85	11,27 ± 1,02	1,15 ± 0,14	1,38 ± 0,33	11,36 ± 0,15	3,10 ± 0,93	34,88 ± 2,31	$12,\!49\pm0,\!35$	$12,32\pm0,35$	12,41 ± 0,35
210	$0,88\pm0,14$	35,03 ± 1,82	0,00 ± 0	13,12 ± 1,91	4,13 ± 0,30	2,64 ± 0,58	2,18 ± 0,33	1,28 ± 0,04	0,78 ± 0,16	$5,42 \pm 0,75$	1,92 ± 0,43	27,12 ± 3,87	8,40 ± 0,99	7,83 ± 0,99	8,12 ± 0,73
240	$1,\!49\pm0,\!16$	36,37 ± 2,64	0,00 ± 0	9,11 ± 1,50	3,91 ± 0,15	2,18 ± 0,34	2,35 ± 0,27	0,00 ± 0	0,58 ± 0,06	4,80 ± 0,78	2,02 ± 0,87	28,08 ± 2,33	8,93 ± 1,00	9,50 ± 1,00	9,22 ± 0,95

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 10 – Formação de 7 β -OH (μ g/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 160°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
2	0,00 ± 0	0,00 ± 0	18,24 ± 1,34	0,00 ± 0	16,19 ± 2,72	14,51 ± 1,15	$3,43 \pm 0,36$	16,70 ± 0,88	14,91 ± 2,76	25,02 ± 3,61	44,45 ± 1,25	2,42 ± 0,03	16,36 ± 2,07	16,92 ± 2,87	16,64 ± 2,10
4	0,00 ± 0	0,89 ± 0,15	20,50 ± 3,25	1,10 ± 0,23	27,74 ± 3,99	24,62 ± 3,54	6,66 ± 0,81	20,91 ± 3,14	24,09 ± 2,06	31,79 ± 3,06	57,99 ± 3,12	14,36 ± 0,70	31,97 ± 0,72	32,53 ± 0,79	32,25 ± 0,53
6	0,75 ± 0,16	4,34 ± 0,31	16,11 ± 2,76	3,25 ± 0,36	26,19 ± 0,85	31,11 ± 2,24	16,80 ± 2,18	16,32 ± 0,51	22,38 ± 2,44	28,95 ± 3,33	40,81 ± 2,28	31,89 ± 2,27	32,90 ± 0,84	33,46 ± 0,84	33,18 ± 0,44
8	0,98 ± 0,10	10,81 ± 0,48	16,12 ± 0,87	2,67 ± 0,54	23,21 ± 2,37	27,75 ± 1,09	29,54 ± 2,35	40,54 ± 4,36	21,77 ± 0,65	23,67 ± 3,57	29,77 ± 3,03	35,81 ± 2,52	31,62 ± 0,94	32,19 ± 0,84	31,91 ± 0,75
10	0,70 ± 0,17	19,42 ± 1,56	4,04 ± 0,61	8,22 ± 0,60	22,30 ± 1,75	24,34 ± 1,15	34,29 ± 0,32	28,34 ± 22,06	18,15 ± 2,62	22,65 ± 2,44	17,77 ± 2,00	45,32 ± 2,48	28,73 ± 1,04	28,17 ± 1,33	28,45 ± 2,07
30	16,88 ± 2,15	37,03 ± 3,29	0,91 ± 0,03	20,56 ± 3,58	11,74 ± 1,34	12,42 ± 1,11	9,65 ± 1,10	1,30 ± 0,31	5,85 ± 0,51	8,01 ± 1,69	3,13 ± 0,62	41,48 ± 7,95	12,11 ± 1,60	11,55 ± 1,30	11,83 ± 1,30

Tabela 11 – Formação de 7α -OH (μ g/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 130°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
15	0,00 ± 0	2,00 ± 0,17	11,82 ± 0,55	1,50 ± 0,11	15,94 ± 1,38	17,35 ± 1,28	2,88 ± 0,42	14,86 ± 1,08	16,94 ± 2,07	20,26 ± 2,67	69,15 ± 1,06	$5{,}99\pm0{,}89$	20,96 ± 0,28	21,03 ± 0,28	21,00 ± 0,42
60	0,00 ± 0	12,67 ± 0,67	0,00 ± 0	2,18 ± 0,07	9,84 ± 0,66	8,63 ± 0,19	25,17 ± 0,94	6,03 ± 1,02	6,75 ± 0,14	9,32 ± 0,32	15,58 ± 4,49	35,82 ± 3,69	9,48 ± 0,57	9,55 ± 0,50	9,52 ± 0,78
90	0,00 ±0	24,93 ± 4,55	0,00 ± 0	4,17 ± 0,66	5,57 ± 0,49	5,47 ± 0,86	28,72 ± 3,22	3,11 ± 0,22	4,54 ± 0,35	6,95 ± 0,39	7,56 ± 0,62	40,35 ± 2,79	7,31 ± 0,30	7,24 ± 0,30	7,28 ± 0,60
120	0,00 ± 0	35,38 ± 6,58	0,00 ± 0	25,61 ± 3,33	4,25 ± 0,64	2,10 ± 0,03	12,76 ± 1,68	1,99 ± 0,12	1,60 ± 0,32	4,79 ± 0,26	4,50 ± 0,31	32,81 ± 1,19	5,70 ± 0,17	5,77 ± 0,17	5,74 ± 0,28
210	0,87 ± 0	33,83 ± 2,31	0,00 ± 0	13,36 ± 3,12	2,00 ± 0,21	0,00 ± 0	2,31 ± 0,52	1,09 ± 0,06	1,21 ± 0,20	2,76 ± 0,09	1,01 ± 1,24	24,90 ± 0,99	4,08 ± 0,44	4,37 ± 0,43	4,23 ± 0,29
240	1,34 ± 0,10	34,76 ± 0,93	0,00 ± 0	10,59 ± 0,87	1,94 ± 0,43	0,00 ± 0	2,06 ± 0,45	0,00 ± 0	0,95 ± 0,20	2,54 ± 0,10	1,98 ± 1,05	21,40 ± 4,29	4,56 ± 0,17	4,70 ± 0,23	4,63 ± 0,20

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 12 – Formação de 7α -OH (μ g/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 160°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
2	0,51 ± 0,08	0,00 ± 0	12,00 ± 1,63	0,00 ± 0	12,95 ± 1,71	13,97 ± 2,81	2,43 ± 0,35	12,56 ± 1,38	13,38 ± 1,84	19,20 ± 3,39	42,17 ± 1,19	2,75 ± 0,15	14,63 ± 2,87	13,19 ± 2,07	13,91 ± 2,73
4	$0,75\pm0,03$	0,55 ± 0,01	8,83 ± 1,15	$0,75\pm0,03$	16,66 ± 1,88	15,71 ± 0,39	4,63 ± 1,08	7,84 ± 10,42	16,63 ± 2,24	18,99 ± 3,60	60,93 ± 3,17	12,66 ± 2,25	21,52 ± 0,43	$20{,}80\pm0{,}34$	21,16 ± 0,85
6	0,00 ± 0	3,80 ± 0,23	5,40 ± 0,80	1,64 ± 0,33	12,88 ± 1,27	16,43 ± 3,68	11,14 ± 1,63	5,16 ± 0,10	15,36 ± 1,41	13,74 ± 3,16	46,49 ± 2,00	27,01 ± 2,17	18,50 ± 0,88	18,07 ± 0,88	18,29 ± 0,58
8	0,80 ± 0,10	9,53 ± 0,01	$6{,}88\pm0{,}52$	1,83 ± 0,40	11,02 ± 2,26	13,50 ± 2,91	20,48 ± 1,45	0,00 ± 0	$12,\!89\pm0,\!49$	11,14 ± 2,05	$35{,}56\pm3{,}78$	31,42 ± 2,57	$15,58 \pm 0,68$	14,86 ± 0,98	$15,22 \pm 0,59$
10	0,60 ± 0,11	16,24 ± 1,21	2,40 ± 0,23	6,13 ± 0,65	8,38 ± 0,60	13,17 ± 1,00	26,98 ± 1,06	5,68 ± 0	9,54 ± 2,09	8,26 ± 0,64	20,61 ± 1,23	40,94 ± 2,67	12,10 ± 0,32	12,17 ± 0,57	12,14 ± 0,43
30	13,63 ± 2,07	$34{,}89\pm2{,}98$	0,00 ± 0	18,63 ± 4,23	5,17 ± 0,41	6,18 ± 0,68	3,61 ± 0,86	2,31 ± 0,23	4,07 ± 0,37	3,82 ± 0,60	4,93 ± 1,23	34,94 ± 5,17	5,74 ± 0,51	5,88 ± 0,83	5,81 ± 0,72

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 13 – Formação de 5,6 α -epóxido (μ g/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 130°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
15	0,00 ± 0	0,00 ± 0	54,77 ± 7,19	0,00 ± 0	51,61 ± 2,52	60,20 ± 3,41	0,00 ± 0	72,54 ± 8,01	67,30 ± 4,74	47,88 ± 2,71	85,55 ± 6,45	0,00 ± 0	78,33 ± 0,84	78,67 ± 0,84	78,50 ± 0,74
60	0,00 ± 0	7,57 ± 0,38	0,00 ± 0	0,00 ± 0	34,73 ± 5,02	49,60 ± 3,90	67,04 ± 2,55	42,12 ± 5,01	49,16 ± 7,36	38,91 ± 1,75	59,01 ± 2,46	53,80 ± 7,55	52,76 ± 1,55	53,11 ± 1,43	52,94 ± 2,47
90	0,00 ± 0	18,49 ± 0,94	0,00 ± 0	$5,\!35\pm0,\!35$	25,33 ± 0,25	37,56 ± 0,52	102,49 ± 1,63	21,76 ± 1,14	36,94 ± 1,71	28,11 ± 1,67	38,02 ± 1,55	60,62 ± 7,43	40,07 ± 0,61	40,41 ± 0,61	40,24 ± 0,75
120	0,00 ± 0	25,57 ± 3,21	0,00 ± 0	57,59 ± 14,18	15,62 ± 2,98	24,52 ± 2,05	80,70 ± 4,58	12,73 ± 0,02	14,98 ± 2,64	20,42 ± 1,78	26,65 ± 1,67	54,28 ± 4,51	30,28 ± 1,38	30,96 ± 1,48	30,62 ± 1,53
210	0,00 ± 0	23,14 ± 2,05	0,00 ± 0	48,12 ± 9,68	7,98 ± 0,89	10,44 ± 1,38	38,22 ± 2,50	0,00 ± 0	7,29 ± 1,53	8,90 ± 0,30	11,50 ± 0,63	34,81 ± 2,32	17,30 ± 0,86	16,95 ± 0,75	17,13 ± 0,44
240	0,00 ± 0	22,07 ± 4,20	0,00 ± 0	46,76 ± 1,89	7,75 ± 1,01	8,50 ± 0,31	31,16 ± 3,16	0,00 ± 0	0,00 ± 0	7,45 ± 0,51	8,63 ± 1,48	33,39 ± 3,91	16,24 ± 0,82	16,58 ± 0,53	16,41 ± 0,79

Tabela 14 – Formação de 5,6α-epóxido (μg/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 160°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	$0,00\pm0$	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
2	0,00 ± 0	0,00 ± 0	49,63 ± 4,01	0,00 ± 0	$33,79\pm6,60$	34,08 ± 5,66	0,00 ± 0	55,76 ± 2,65	40,12 ± 7,06	44,67 ± 3,30	32,19 ± 1,05	0,00 ± 0	39,14 ± 6,15	42,57 ± 6,15	40,86 ± 5,15
4	0,00 ± 0	0,00 ± 0	55,43 ± 1,18	0,00 ± 0	61,21 ± 9,89	49,88 ± 6,34	7,51 ± 1,48	70,61 ± 3,32	60,58 ± 10,13	52,16 ± 0,83	80,39 ± 5,97	9,35 ± 1,51	68,97 ± 4,01	70,00 ± 3,98	69,49 ± 3,89
6	0,00 ± 0	0,00 ± 0	37,26 ± 8,82	2,04 ± 0,48	52,55 ± 8,05	63,69 ± 13,56	28,13 ± 5,33	$69,55 \pm 3,43$	$60,90 \pm 6,07$	50,97 ± 1,99	91,75 ± 3,55	36,20 ± 3,47	73,91 ± 1,02	73,22 ± 1,02	73,57 ± 3,02
8	0,00 ± 0	6,39 ± 1,44	36,62 ± 4,85	2,95 ± 0,71	47,53 ± 7,51	53,46 ± 0,91	56,00 ± 3,51	65,17 ± 4,79	66,58 ± 4,28	48,09 ± 5,16	82,96 ± 5,17	42,09 ± 3,87	71,62 ± 2,14	70,93 ± 2,50	71,28 ± 2,30
10	0,00 ± 0	10,38 ± 1,46	16,09 ± 0,83	12,73 ± 1,53	43,72 ± 1,74	50,33 ± 1,35	81,33 ± 4,53	52,32 ± 11,70	56,55 ± 11,20	43,67 ± 1,86	69,02 ± 2,54	56,43 ± 7,03	65,35 ± 0,83	65,01 ± 0,73	65,18 ± 0,54
30	0,00 ± 0	28,60 ± 1,60	11,23 ± 0,03	66,81 ± 7,29	23,23 ± 1,27	34,07 ± 7,28	50,57 ± 2,61	12,18 ± 2,85	28,31 ± 1,46	20,37 ± 2,99	22,66 ± 2,24	58,68 ± 4,55	33,36 ± 7,71	29,59 ± 7,43	31,48 ± 6,45
															-

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 15 – Formação de 5,6β-epóxido (µg/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 130°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	$0,00\pm0$	$0,00\pm0$	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	$0,00\pm0$	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
15	0,00 ± 0	0,00 ± 0	83,27 ± 17,77	$3,14\pm0,32$	99,67 ± 5,58	112,94 ± 2,70	8,34 ± 0,01	130,07 ± 9,98	126,02 ± 8,72	93,51 ± 6,29	209,44 ± 12,00	0,00 ± 0	153,64 ± 6,58	158,7 ± 6,58	156,17 ± 5,28
60	0,00 ± 0	25,19 ± 0,57	$0,00\pm0$	$0,00 \pm 0$	$62,83\pm6,63$	74,66 ± 6,13	114,82 ± 4,11	60,77 ± 3,34	67,20 ± 12,28	68,02 ± 1,46	100,81 ± 11,65	125,40 ± 13,06	83,65 ± 3,36	82,13 ± 3,21	82,89 ± 5,23
90	0,00 ± 0	57,99 ± 2,88	$0,00\pm0$	$0,00 \pm 0$	45,40 ± 2,72	53,17 ± 1,75	154,39 ± 6,77	23,16 ± 3,97	40,60 ± 3,88	47,64 ± 3,24	$54,92\pm0,85$	131,93 ± 7,33	58,71 ± 0,50	58,21 ± 0,50	58,46 ± 0,80
120	0,00 ± 0	79,84 ± 17,01	$0,00\pm0$	103,79 ± 11,59	28,91 ± 2,51	29,69 ± 3,61	105,78 ± 14,39	0,00 ± 0	11,47 ± 0,48	35,96 ± 1,77	$34{,}72\pm4{,}56$	107,08 ± 10,40	43,22 ± 0,37	43,72 ± 0,87	43,47 ± 0,53
210	0,00 ± 0	84,62 ± 8,12	$0,00\pm0$	81,49 ± 10,00	13,15 ± 2,77	10,48 ± 1,36	$30,\!95\pm4,\!73$	0,00 ± 0	$0,00 \pm 0$	16,62 ± 0,94	12,65 ± 1,22	78,73 ± 2,21	24,5 ± 1,14	25,01 ± 2,15	24,75 ± 1,43
240	0,00 ± 0	69,67 ± 2,83	$0,00\pm0$	$68,65 \pm 20,36$	12,70 ± 1,81	7,86 ± 1,43	$26,\!42\pm3,\!14$	0,00 ± 0	0,00 ± 0	15,35 ± 2,16	10,34 ± 2,70	67,19 ± 11,69	$25,92\pm3,68$	27,94 ± 3,95	26,93 ± 4,00

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 16 – Formação de 5,6 β -epóxido (μ g/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 160°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
2	0,00 ± 0	0,00 ± 0	92,84 ± 14,16	0,00 ± 0	83,80 ± 8,91	57,30 ± 13,91	0,00 ± 0	119,32 ± 23,35	79,47 ± 16,76	91,39 ± 5,25	100,35 ± 4,99	$0,00\pm0$	84,66 ± 12,79	89,73 ± 12,75	87,20 ± 11,56
4	0,00 ± 0	0,00 ± 0	89,00 ± 13,69	0,00 ± 0	105,26 ± 11,51	90,10 ± 7,77	17,12 ± 2,32	107,82 ± 5,97	106,22 ± 15,81	99,55 ± 2,80	196,32 ± 13,42	35,82 ± 4,07	136,65 ± 8,27	131,58 ± 8,35	134,12 ± 7,33
6	0,00 ± 0	0,00 ± 0	47,33 ± 10,59	5,17 ± 0,87	84,93 ± 2,26	93,67 ± 4,73	56,71 ± 9,05	86,62 ± 10,90	95,81 ± 9,24	88,35 ± 5,61	192,25 ± 4,80	76,27 ± 5,30	137,76 ± 5,12	142,82 ± 5,12	140,29 ± 6,15
8	0,00 ± 0	20,78 ± 5,12	50,81 ± 3,49	7,03 ± 1,12	76,09 ± 9,14	79,68 ± 1,14	113,02 ± 8,22	76,95 ± 13,97	87,10 ± 9,82	$78,79\pm6,95$	163,48 ± 3,28	86,48 ± 10,18	129,09 ± 4,38	132,13 ± 3,48	130,61 ± 4,50
10	0,00 ± 0	37,71 ± 4,59	45,67 ± 2,27	28,31 ± 1,56	66,84 ± 8,60	$74,12\pm0,79$	149,40 ± 2,87	65,60 ± 6,41	83,12 ± 5,13	71,12 ± 4,87	129,76 ± 6,31	116,37 ± 11,69	102,78 ± 0,17	102,27 ± 0,16	102,53 ± 0,11
30	0,00 ± 0	82,43 ± 4,06	0,00 ± 0	109,85 ± 16,34	31,56 ± 1,90	39,26 ± 5,32	49,87 ± 5,68	11,73 ± 0,63	23,67 ± 1,19	26,20 ± 3,00	26,98 ± 6,51	111,30 ± 4,96	40,59 ± 3,34	41,60 ± 2,53	41,10 ± 2,89

Tabela 17 – Formação total de COP's $(\mu g/mL)^*$ durante aquecimento a 130°C

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,00	7,73	210,30	9,41	222,41	252,59	19,01	283,42	278,11	219,93	614,38	23,96	330,99	337,79	334,39
60	0,00	84,31	7,34	11,53	169,23	204,77	297,43	166,66	197,87	183,43	402,43	393,17	231,79	232,31	232,05
90	4,92	214,85	3,07	21,31	130,51	161,44	458,77	83,58	147,14	141,27	277,27	463,63	183,48	182,74	183,11
120	1,77	269,16	2,54	276,43	92,18	102,17	361,69	47,21	52,07	112,28	213,00	429,79	150,49	152,35	151,42
210	4,73	284,04	2,09	308,47	50,63	46,75	181,47	21,63	32,37	64,43	131,56	341,35	104,90	105,57	105,24
240	6,13	319,69	2,06	295,37	48,27	43,01	167,67	16,26	20,12	59,19	125,38	327,46	98,39	97,55	97,98

*Somatória das médias de todos os COP's

Tabela 18 –	Formação total de CO	P's (ua/mL)* d	urante aquecimento a	a 160°C
	i onnação total do OO	ι ο (μg/ini⊏) α	aranto aquoonnonto t	100 0

Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	1,00	1,59	203,56	1,20	169,45	132,09	9,52	231,62	163,70	208,14	282,36	6,97	170,70	179,49	175,10
4	1,34	2,91	220,02	3,34	251,58	205,41	42,26	251,14	249,00	243,61	570,10	87,20	302,91	299,88	301,40
6	2,62	12,04	140,84	18,08	214,16	243,09	131,40	233,35	251,21	226,87	588,69	221,67	322,24	327,13	324,69
8	2,76	61,25	143,13	17,87	194,56	210,51	261,93	240,80	240,00	207,81	522,38	261,82	312,06	313,87	312,70
10	1,91	113,46	87,41	65,15	179,40	200,56	374,03	202,03	242,64	187,83	438,04	362,81	274,59	271,69	273,14
30	49,25	303,22	17,52	365,22	106,45	137,95	226,92	51,15	106,87	90,66	173,20	414,06	146,85	144,45	145,65

*Somatória das médias de todos os COP's



Figura 10 – Degradação dos ácidos graxos (16:0, 18:1n9, 20:5n3) nos ensaios dos sistemas modelo aquecidos a 130°C, segundo planejamento experimental





Figura 11 – Degradação dos ácidos graxos (16:0, 18:1n9, 20:5n3) nos ensaios dos sistemas modelo aquecidos a 160°C, segundo planejamento experimental









Referências

Ansorena, D., Barriuso, B., Cardenia, V., Astiasarán, I., Lercker, G. & Rodriguez-Estrada, M. T. (2013). Thermo-oxidation of cholesterol: effect of the unsaturation degree of the lipid matrix. *Food Chemistry*, 141, 2757-2764.

AOCS. (1997) Official Method Ce 1b-89. In Firestone, D. (Ed). *Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society* (5th ed.). Champaign: American Oil Chemists' Society Press.

Barriuso, B., Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Astiasarán, I. & Ansorena, D. (2012). Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. *Food Chemistry*, 135, 706-712.

Boselli, E., Cardenia, V. & Rodriguez-Estrada, M. T. (2012). Cholesterol photosensitized oxidation in muscle foods. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 644-655.

Boselli, E., Rodriguez-Estrada, M. T., Ferioli, F., Caboni, M. & Lercker, G. (2010). Cholesterol photosensitized oxidation of horse meat slices stored under different packaging films. *Meat Science*, 85, 500-505. Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., Baldacci, E., Savioli, S. & Lercker, G. (2012) Analysis of cholesterol oxidation products by fast gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 35, 424-430.

Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., Boselli, E. & Lercker, G. (2013).Cholesterol photosensitized oxidation in food and biological systems. *Biochimie*, 95, 473-481.

Castro, W. F., Mariutti, L. R. B. & Bragagnolo, N. (2011). The effects of colorífico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken during frozen storage. *Food Chemistry*, 124, 126-131.

Chien, J. T., Hsu, D. J. & Chen, B. H. (2006). Kinect model for studying the effect of quercetin on cholesterol oxidation during heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1486-1492.

Chien, J., Hsu, D., Inbaraj, B. & Chen, B. (2010). Integral kinetic model for studying quercetin degradation and oxidation as affected by cholesterol during heating. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 2805-2820.

Decker, E. A.; Mei, L. (1996). Antioxidant mechanisms and applications in muscle foods. *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, 49: 64–72.

Echarte, M., Zulet, M. A. & Astiasarán, I. (2001). Oxidation process affecting fatty acids and cholesterol in fried and roasted salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5662-5667.

FAO/WHO (1982). Food and Nutrition Paper (Vol. 25). Rome: FAO.

Faustman, C., Chan, W. K. M., Schaefer, D. M. & Havens, A. (1998). Beef colour up date. The role of vitamin E. *Journal of Animal Science*, 76, 1019-1026.

Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R. & Suman, S. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86, 86-94.

Guardiola, F., Codony, R., Addis, P. B., Rafecas, M. & Boatella, J. (1996). Biological effects of oxysterols: Current status. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 193-211.

Gumulka, J., Pyrek, J. S. & Smith, L. L. (1982). Interception of direct oxygen species in aqueous media by cholesterol: formation of cholesterol epoxides and secosterols. *Lipids*, 17, 197-205.

Hur, S. J. Park, G. B. & Joo, S. T. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COP's) in animal products. *Food Control*, 18, 939-947.

Joseph, J. D. & Ackman, R. G. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.

Karami, M., Alimon, A. R., Sazili, A. Q., & Goh, Y. M. (2011). Effects of dietary antioxidants on the quality, fatty acid profile, and lipid oxidation of longissimus muscle in Kacang goat with aging time. *Meat Science*, 88, 102-108.

Kim, S. & Nawar, W. (1991). Oxidative interactions of cholesterol with triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 68, 931-934.

Kim, S. K. & Nawar, W. W. (1993). Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids*, 28, 917-922.

Lara, W. H. (Ed.) (1984). Monografias de Corantes Naturais para Fins Alimentícios. *Padrões de Identidade e Qualidade*, São Paulo, p. 22-29.

Lee, H. W., Chien, J. T. & Chen, B. H. (2008). Inhibition of cholesterol oxidation in marinated foods as affected by antioxidants during heating. *Food Chemistry*, 108, 234-244.

Lehtonen, M., Lampi, A. M., Riuttamäki, M. A. & Piironen, V. (2012). Oxidation reactions of steryl esters in a saturated lipid matrix. *Food Chemistry*, 134, 2030-2039.

Maraschiello, C., Esteve, E. & Regueiro, J. A. G. (1998). Cholesterol oxidation in meat from chickens fed α -tocopherol- and β -carotene- supplemented diets with different unsaturation grades. *Lipids*, 33, 705-713.

Mariutti, L. R. B., Nogueira, G. C. & Bragagnolo, N. (2008).Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides extraction in chicken meat using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2913-2918.

Mazalli, M. & Bragagnolo, N. (2007). Effect of storage on cholesterol oxide formation and fatty acid alterations in egg powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2743-2748.

Monahan, F. J., Crackel, R. L., Gray, J. I., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (1993). Catalysis of lipid oxidation in muscle model systems by haem and inorganic iron. *Meat Science*, 34, 95–106.

Nogueira, G. C. *Degradação do colesterol submetido ao aquecimento na presença de ácidos graxos e antioxidantes*: estudo em sistemas modelo. 2011. 148p. Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

Nogueira, G. C.; Costa, B. Z.; Crotti, A. E. M.; Bragagnolo, N. (2010). Synthesis of 7-Hydroperoxycholesterol and Its Separation, Identification, and Quantification in Cholesterol Heated Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10226-10230.

Ohshima, T. (2002) Formation and content of cholesterol oxidation products in seafood and seafood products. In Codony, R.; Savage, G. P.; Dutta, P. C.; Guardiola, F. (Eds.), *Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis occurrence and biological effects* (pp. 187-203). Champaign, IL, USA: AOCS Press.

Orczewska-Dudek, S., Bederska Lojewska, D., Pieszka, M. & Pietras, M. (2012).Cholesterol and lipid peroxides in animal products and health implications – A review. *Annals of Animal Science*, 12, 25-52.

Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D. & Astiasarán, I. (2010). Oxysterols: A world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3289-3303.

Park, S. W. & Addis, P. B. (1986). Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *Journal of Food Science*, 51, 1380-1381.

Pignoli, G., Rodriguez-Estrada, M. T., Mandrioli, M., Barbanti, L., Rizzi, L. & Lercker, G. (2009). Effects of different rearing and feeding systems on lipid oxidation and

antioxidant capacity of freeze-dried egg yolks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11517-11527.

Plackett, R. L. & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika Trust*, 33, 305-325.

Salanha, T., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. & Bragagnolo, N. (2006). HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV and APCI-MS detectors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4107-4113.

Saldanha, T. & Bragagnolo, N. (2008). Relation between types of packaging, frozen storage and grilling on cholesterol and fatty acids oxidation in atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). *Food Chemistry*, 106, 619-627.

Sancho, R. A. S., Bragagnolo, N., Costa, G. G., Mariutti, L. R. B. & De Lima, F.A. (2011).Effect of annatto seed and coriander leaves as natural antioxidants in fish meatballs during frozen storage. *Journal of Food Science*, 76, 838-845.

Schaich, K. M., Shahidi, F., Zhong, Y. & Eskin, N. A. M. (2013). Lipid oxidation. In: *Biochesmistry of foods* (pp. 420-469) Elsevier Inc.

Shivas, S. D.; Kropf, D. H.; Hunt, M. C.; Kastner, C. L.; Kendall, J. L. A.; Dayton, A. D. (1984). Effects of ascorbic acid on display life of ground beef. *Journal of Food Protection*, 47: 11–15.

Smith, L. L. (1987). Cholesterol autoxidation 1981-1986. *Chemistry and Physics of Lipids*, *44*, 87-125.

Uckoo, R. M., Jayaprakasha, G. K., Nelson, S. D. & Patil, B. S. (2011). Rapid simultaneous determination of amines and organic acids in citrus using high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 83, 948-954.

Xu, G. H., Sun, J. L., Liang, Y. T., Yang, C. & Chen, Z. Y. (2011). Interaction of fatty acids with oxidation of cholesterol and beta-sitosterol. *Food Chemistry*, 124, 162-170.

CAPÍTULO III

DEGRADAÇÃO DO COLESTEROL E FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EM SISTEMAS MODELO SUBMETIDOS À TEMPERATURA DE 230°C E FLUXO CONSTANTE DE O₂

(Artigo em preparação a ser submetido para publicação no periódico *LWT – Food*

Science and Technology)

DEGRADAÇÃO DO COLESTEROL E FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EM SISTEMAS MODELO SUBMETIDOS À TEMPERATURA DE 230°C E FLUXO CONSTANTE DE O2

Elisângela Serenato Madalozzo, Neura Bragagnolo Departamento de Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP – Campinas, SP, Brasil

Resumo

Visando avaliar a oxidação do colesterol e a formação de óxidos de colesterol (COP's) foram preparados sistemas modelo contendo colesterol com diferentes concentrações de ácidos graxos (ácido palmítico, ácido oleico e ácido eicosapentaenóico - EPA), antioxidantes (eritorbato de sódio, bixina e ácido cítrico) e pró-oxidante (mioglobina). Estes sistemas foram submetidos ao aquecimento a 230°C sob fluxo constante de O₂ durante 300 s. A degradação do colesterol no tempo final de aquecimento variou de 89 a 96 % do colesterol inicial sendo dependente da composição de cada ensaio. O ensaio que apresentou a maior degradação foi o que continha em sua composição colesterol, bixina, ácido oleico e mioglobina. Por outro lado, os ensaios que apresentaram a menor degradação continham colesterol, eritorbato de sódio, ácido cítrico e mioglobina (ensaio 1) e eritorbato de sódio, bixina e ácido palmítico (ensaio 2). A concentração máxima de COP's obtida foi de 464 µg/mL no ensaio 11 no tempo de 50 segundos de aquecimento.

Palavras-chave: oxidação de colesterol, mioglobina, planejamento experimental, eritorbato de sódio, EPA, COP's.

1. Introdução

A oxidação lipídica é uma das principais transformações que pode afetar significativamente a qualidade global dos alimentos. Pode ocorrer de acordo com diferentes mecanismos de reação (auto-oxidação, termo-oxidação, foto-oxidação e oxidação enzimática) e pode ser influenciada por diversos fatores (grau de insaturação dos ácidos graxos, temperatura, luz, atividade de água, presença de metais, fotossensibilizadores, pró-oxidantes e antioxidantes) (Frankel, 2005).

A reação de oxidação em produtos que contém colesterol é iniciada nas membranas celulares altamente susceptíveis, as quais contém uma quantidade relativamente grande de ácidos graxos poli-insaturados (Wood et al., 2004). No entanto, a membrana celular contêm também outras moléculas lipossolúveis insaturadas, tais como o colesterol, que também é propenso à oxidação. Uma ampla gama de óxidos de colesterol (COP's) podem ser gerados tanto por via química como enzimática (Smith, 1991; Lercker & Rodriguez-Estrada, 2000). COP's têm sido amplamente estudados em vários alimentos (Bragagnolo, 2009; Hur et al., 2007), uma vez que eles são relacionados ao desenvolvimento de várias doenças crônico-degenerativas e alterações da funcionalidade das células (Otaegui-Arrazola et al., 2010; Schroepfer Jr, 2000). Embora estejam normalmente presentes em baixas quantidades em alimentos crus, suas concentrações tendem a aumentar drasticamente

após a exposição ao calor, luz, metais e oxigênio, bem como nos alimentos altamente processados (Kerry et al., 2002; Otaegui-Arrazola et al., 2010).

Os principais tratamentos térmicos empregados em alimentos utilizam o binômio tempo x temperatura para garantir que seu emprego atinja o objetivo desejado. Dessa forma, as condições empregadas dependem da matriz utilizada e também das condições. De modo geral, quanto menor o tempo de exposição maior a temperatura empregada. Já no armazenamento, quanto menor a temperatura maior será o tempo de armazenamento que poderá ser empregado. Os processos tecnológicos para a produção de alimentos como a secagem em *spray dryer*, a fritura e o uso de forno convencional a gás ou elétrico podem atingir temperaturas de até 250°C e dependendo do tempo empregado, pode ocorrer a oxidação e degradação do colesterol, com formação de COP's. Em temperaturas acima de 175°C a oxidação do colesterol é extremamente rápida (Vicente et al., 2012).Uma alternativa eficaz para reduzir a formação de COP's seria a adição de substâncias naturais ou sintéticas, com características antioxidantes (Valenzuela et al., 2003; Lee et al., 2008).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes ácidos graxos com diferentes graus de insaturação (ácido oleico, EPA e ácido palmítico), antioxidantes (bixina, eritorbato de sódio e ácido cítrico) e de pró-oxidante (mioglobina) na degradação do colesterol em sistemas modelo submetidos a temperaturas de 230°C e fluxo constante de O₂, durante 300 s. Os sistemas modelo foram avaliados quanto a degradação do colesterol e a formação de COP's bem como pela alteração na composição de ácidos graxos e pela degradação dos antioxidantes quando adicionados aos sistemas modelo.

2. Materiais e métodos

2.1 Reagentes e solventes

Os padrões de óxidos de colesterol 20α-hidroxicolesterol (20α-OH) (\geq 98 %), 22*R*-hidroxicolesterol (22*R*-OH) (\geq 98 %), 22*S*-hidroxicolesterol (22*S*-OH) (\geq 98 %), 25hidroxicolesterol (25-OH) (\geq 98 %), 5,6α-epoxicolesterol (5,6α-epóxido) (\geq 80 %), 5,6βepoxicolesterol (5,6β-epóxido) (\geq 80 %), 7-cetocolesterol (7-ceto) (\geq 90 %), 7αhidroxicolesterol (7α-OH) (\geq 95 %), 7β-hidroxicolesterol (7β-OH) (\geq 95 %) e colestanotriol (triol) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) ou Steraloids (Newport, RI, EUA).Os padrões de colesterol, eritorbato de sódio, ácido palmítico, ácido oleico, EPA, mioglobina, o complexo trifluoreto de boro em metanol 13-15 % (BF₃), a mistura de padrões contendo ésteres metílicos dos ácidos graxos de 4:0 a 24:0 e o éster metílico do ácido tricosanóico (99 % CG) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Já o padrão de ácido cítrico foi adquirido da Qhemis (99,5 % de pureza) (Jundiaí, SP, Brasil).

Os solventes grau cromatográfico (HPLC) utilizados foram metanol e isopropanol obtidos da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), hexano adquirido da Panreac (Barcelona, Catalunha, Espanha) e diclorometano proveniente da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, EUA). Os reagentes grau P.A. metanol, iso-octano, hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de sódio (NaCl) e ácido fosfórico foram obtidos da marca Synth (Diadema, SP, Brasil).

2.2 Preparo das soluções dos sistemas modelo

As soluções usadas no preparo dos sistemas modelo foram preparadas com concentrações conhecidas, de acordo com o planejamento experimental (Plackett &

Burman) apresentado na Tabela 1. A solução de colesterol foi preparada na concentração de 10 mg/mL, para tanto, pesou-se 100 mg do padrão em balão volumétrico de 10 mL e aferiu-se o volume com isopropanol. Para o prepado das soluções de antioxidantes foram pesados 2 mg de cada antioxidante em balões volumétrico de 5mL e o volume foi aferido com metanol. Esta concentração corresponde ao nível +1 do planejamento experimental. Para o nível 0, a solução foi preparada pesando-se 1 mg de cada antioxidante em balões volumétricos de 5 mL e aferindo o volume com metanol. Os ácidos graxos, para o nível +1, foram preparados na concentração de 150 mg em 5 mL, em balão volumétrico de 5 mL, e para o nível 0 na concentração de 75 mg em 5 mL, sendo solubilizados em hexano. A mioglobina foi preparada na concentração de 4 mg em de 5 mL, para o nível +1, e 2 mg em 5 mL para o nível 0, sendo solubilizado em água MilliQ.

Todas as soluções foram preparadas separadamente e após esta etapa procedeu-se o preparo dos tubos dos sistemas modelo também de acordo com o planejamento experimental. Desta forma, pipetou-se 100 μ L de colesterol, 100 μ L de antioxidantes, 100 μ L de ácidos graxos e 50 μ L de mioglobina, para que os sistemas apresentassem a concentração desejada, de acordo com a Tabela 2.

2.3 Preparo dos sistemas modelo

Os sistemas modelo foram preparados utilizando um planejamento experimental Plackett & Burman (1946), com sete variáveis de entrada (eritorbato de sódio, ácido palmítico, ácido oleico, EPA, mioglobina, ácido cítrico) em dois níveis e três pontos centrais, totalizando 15 ensaios, de acordo com as Tabelas 1 e 2. As soluções das

variáveis de cada ensaio foram adicionadas em tubos de ensaio de 15 mL e homogeneizadas em vortex por 1 min. Em seguida, os solventes foram evaporados sob fluxo de N₂ e os tubos foram imediatamente levados para o bloco de aquecimento (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Para cada ensaio do planejamento foram preparados 21 tubos, quantidade suficiente para se obter 7 pontos, em triplicata. O ensaio 12 constituído apenas de colesterol corresponde ao controle. Os sistemas modelo foram aquecidos na temperatura de 230°C, sob fluxo constante de O₂ (10 mL/min). Os tubos foram retirados nos tempos de 0, 10, 25, 50, 90, 120 e 300 s. Após cada tempo de aquecimento os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo. Os tempos de aquecimento do sistema modelo foram fixados de acordo com estudos preliminares (dados não apresentados). A Tabela 2 mostra a concentração das variáveis em dois níveis.

Após o aquecimento e resfriamento foi adicionado a cada tubo 1 mL de fase móvel e alíquotas convenientes foram tomadas para as análises de colesterol e COP's e de acordo com o sistema modelo, para as análises de ácidos graxos, e/ou antioxidantes e/ou pró-oxidante. Como resposta avaliou-se a degradação do colesterol e a formação de COP's.

Ensaios	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1
12*	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 1 - Matriz codificada do planejamento Plackett & Burman

*Controle (contém somente colesterol)

Tabela 2 – Concer	ntração das variáveis (do planejamento	Plackett & Burman	e seus respectivos níveis
	3			

Variáveis	-1	0	1	Solvente de solubilização
Eritorbato de sódio (mg/mL)(x1)	0	0,02	0,04	Metanol
Bixina (mg/mL) (x2)	0	0,02	0,04	Metanol
Ácido cítrico (mg/mL) (x3)	0	0,02	0,04	Metanol
Ácido palmítico (mg/mL) (x4)	0	1,5	3	Hexano
EPA (mg/mL) (x5)	0	1,5	3	Hexano
Ácido oleico (mg/mL) (x6)	0	1,5	3	Hexano
Mioglobina de cavalo (mg/mL) (x7)	0	0,02	0,04	Água

codificados

2.4 Quantificação e confirmação do colesterol e óxidos de colesterol

Os tubos contendo os sistemas modelo foram diluídos em 1 mL de fase móvel, filtrados (Millipore 0,45 µm) e alíquotas foram separadas para as análises de ácidos graxos e antioxidantes.

Uma alíquota de 100 µL foi injetada no cromatógrafo líquido com detector UV e RID, modelo LC10 (Shimadzu, Quioto, Japão). Os compostos foram separados utilizando uma Coluna CN (Waters, Millford, MS, USA), 30 cm x 5 mm x 4 µm de diâmetro de partícula, com fase móvel constituída de hexano + isopropanol (97:3) na vazão 1 mL/min e temperatura da coluna 32°C (Saldanha et al., 2006). Para a investigação da presença de triol foi realizada outra corrida cromatográfica nas mesmas condições alterando-se apenas a proporção (90:10) da fase móvel, porém este óxido não foi encontrado em nenhum ensaio.

Os picos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões de colesterol e COP's: 20 α -OH, 22*R*-OH, 22*S*-OH, 25-OH, 5,6 α - e 5,6 β - epóxido, 7-ceto, 7 α - e 7 β -OH. A quantificação foi feita através das curvas analíticas que foram construídas com concentrações variando de 0,08 a 4 mg/mL para o colesterol e de 0,5 a 100 µg/mL para os COP's (20 α -OH: LD = 0,06 µg/mL e LQ = 0,19 µg/mL; 22*R*-OH: LD = 0,53 µg/mL e LQ = 1,62 µg/mL; 22*S*-OH: LD = 0,42 µg/mL e LQ = 1,28 µg/mL; 25-OH: LD = 0,53 µg/mL e LQ = 1,60 µg/mL; 5,6 α -epóxido: LD = 2,67 µg/mL e LQ = 8,08 µg/mL; 5,6 β -epóxido: LD = 4,99 µg/mL e LQ = 15,12 µg/mL; 7-ceto: LD = 0,33 µg/mL e LQ = 1,01 µg/mL; 7 α -OH: LD = 0,98 µg/mL e LQ = 2,98 µg/mL; 7 β -OH: LD = 0,46 µg/mL e LQ = 1,40 µg/mL).

A confirmação da identidade foi feita por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas segundo descrito por Mariutti et al. (2008).

2.5 Determinação de ácidos graxos

Uma alíquota (200 μL) do sistema modelo foi retirada, saponificada e esterificada de acordo com o método descrito por Joseph & Ackman (1992). As amostras foram ressuspendidas com 1 mL de hexano (grau HPLC) da qual retirou-se 2 μL para injeção no cromatógrafo gasoso através da técnica de *hot needle* por 5 s.

Para a quantificação dos ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo gasoso, modelo GC2010 (Shimadzu, Quioto, Japão) com coluna capilar de sílica fundida (100 m comprimento, 0,25 mm d.i., 0,20 mm espessura de fase estacionária) (CP-SIL 88, Chromopack, Middleburg, Holanda) de acordo com método descrito por Sancho et al. (2011).

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos padrões de metil ésteres dos ácidos graxos de 4:0 ao 24:0 com os tempos de retenção de metil ésteres de ácidos graxos da amostra. A quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando o éster metílico do ácido graxo tricosanóico, sendo os ácidos graxos calculados em mg/mL de amostra (AOCS, 1997).

2.6 Determinação de ácido cítrico e eritorbato de sódio

Foi retirada uma alíquota de 200 µL do sistema modelo inicial e o solvente foi evaporado. Após a amostra foi ressuspendida no mesmo volume de fase móvel para a determinação de ácido cítrico e eritorbato de sódio simultaneamente. Foi utilizado um

cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (Shimadzu, Quioto, Japão). A coluna analítica utilizada foi uma C₁₈ (Vydac, Hesperia, CA, EUA) 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m de diâmetro de partícula, mantida à temperatura de 30°C. As análises foram realizadas em modo isocrático com vazão de 1mL/min de fase móvel com detecção em 205 e 265 nm, para ácido cítrico e eritorbato de sódio, respectivamente. A fase móvel utilizada consistiu de uma solução 3 mM de ácido fosfórico em água (Uckoo et al. 2011).

A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção dos padrões com os tempos de retenção dos compostos das amostras. Para a quantificação as curvas analíticas foram construídas com 7 pontos de concentração variando de 20 a 50 μ g/mL para o ácido cítrico (LD = 0,052 mg/mL e LQ = 0,158 mg/mL) e com 6 pontos de concentração variando de 0,001 a 0,1 mg/mL para o eritorbato de sódio (LD = 0,008 mg/mL e LQ = 0,026 mg/mL).

2.7 Determinação de bixina

Do sistema modelo inicial foram reservados 200 µL do extrato, cujo solvente foi completamente evaporado sob fluxo de N₂ e diluído no mesmo volume de diclorometano. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro Agilent (modelo 8453, Palo Alto, EUA) e a concentração de bixina foi calculada em mg/g utilizando o coeficiente de absorção de 2826 a 470 nm (FAO/WHO, 1982; Lara, 1984). Todo o processo foi realizado ao abrigo de luz.

2.8 Análise estatística

O planejamento estatístico e a análise estatística dos dados foram realizados utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

3. Resultados e discussão

3.1 Degradação do colesterol

A concentração final de colesterol foi dependente da composição de cada ensaio, variando de 0,13 a 0,04 mg/mL ao final de 300 s de aquecimento. Essas concentrações correspondem a uma degradação de 88,7 (ensaio 2) e 96 % (ensaio 11) do colesterol inicial adicionado aos sistemas, como pode ser observado na Tabela 3.

	Tempo (seg)											
Ensaios	0	10	25	50	90	120	300					
1	1,09±0	1,04±0,02	0,99±0,06	0,85±0,06	0,31±0	0,28±0,01	0,13±0,01					
2	1,15±0	1,04±0,01	1,00±0,02	0,92±0,01	0,60±0,06	0,42±0,04	0,13±0,02					
3	1,16±0	0,94±0,06	0,64±0,09	0,38±0,04	0,21±0,01	0,08±0,01	0,06±0					
4	1,05±0	1,01±0,02	1,00±0	0,86±0,03	0,39±0,03	0,23±0,03	0,07±0,01					
5	0,90±0	0,79±0,03	0,67±0,12	0,46±0,02	0,18±0,03	0,13±0,01	0,06±0					
6	1,02±0	0,96±0,04	0,83±0,06	0,61±0,03	0,34±0,05	0,24±0,03	0,08±0,01					
7	0,96±0	0,89±0,02	0,74±0,08	0,42±0,02	0,16±0,03	0,08±0,01	0,05±0					
8	0,92±0	0,89±0,01	0,61±0,04	0,36±0,03	0,14±0,03	0,07±0	0,05±0					
9	0,99±0	0,92±0,02	0,86±0,03	0,41±0,01	0,42±0,05	0,26±0,04	0,08±0,01					
10	0,96±0	0,98±0,06	0,86±0,06	0,47±0,16	0,35±0,11	0,16±0,02	0,07±0,01					
11	1,00±0	1,03±0,02	0,84±0,04	0,32±0,02	0,09±0	0,07±0	0,04±0					
12**	1,10±0,03	1,06±0,01	0,9±0,08	0,65±0,09	0,41±0	0,31±0,02	0,12±0,02					
13	0,94±0	0,88±0,04	0,74±0,03	0,49±0,0	0,20±0,01	0,09±0,01	0,06±0,01					
14	1,03±0	0,99±0,05	0,77±0,06	0,44±0,02	0,20±0,03	0,12±0,02	0,06±0,01					
15	0,94±0	0,88±0,04	0,74±0,03	0,49±0,0	0,20±0,01	0,09±0,01	0,06±0,01					

Tabela 3 – Concentração de colesterol (mg/mL)* em diferentes sistemas modelo aquecidos a 230°C sobfluxo de O2 constante durante 300 s

*Média \pm desvio padrão das triplicatas

**Controle (contém somente colesterol)

Ensaios numerados de acordo com a tabela 1

Avaliando os resultados apresentados na Tabela 3 e na Figura 1 pode-se observar que, os ensaios que apresentaram as maiores concentrações finais de colesterol foram os ensaios 1, 2 e 12, com percentual médio de degradação de 88,7 %.

Nos ensaios 1 e 2 até os 50 s de aquecimento foi observada uma concentração média de 0,88 mg/mL de colesterol, concentração esta que decaiu para 0,31 e 0,6 mg/mL aos 90 s, nos ensaios 1 e 2, respectivamente, queda superior a 45 % do colesterol inicial. O ensaio 4 também apresentou um comportamento semelhante aos ensaios 1 e 2 no início do aquecimento, sendo que até 50 s a porcentagem de colesterol presente no sistema era de 81,9 % e já no tempo seguinte, 90 s, esse percentual caiu para 37,1 %.

Esses ensaios apresentam em sua composição o eritorbato de sódio, antioxidante bastante eficiente na proteção contra a oxidação lipídica. Os ascorbatos e seus isômeros, como eritorbato, são agentes redutores capazes de inibir a oxidação de lípidios por inativação de radicais (Decker & Mei, 1996); a adição de ascorbato em alimentos frescos também pode manter a mioglobina no seu estado reduzido (ferroso) (Shivas, Kropf, Kastner, Kendall & Dayton, 1984). Fato este observado por diversos autores, que relatam que o eritorbato de sódio foi responsável pela conservação de produtos derivados de carne, de frango, de carne processadas termicamente e de peru contra a oxidação lipídica e formação de COP's (Baggio et al., 2005; Baggio & Bragagnolo, 2006; Selani et al., 2011; Karpińska-Tymoszczyk, 2013). Porém, a alta temperatura afetou significativamente a oxidação do colesterol, tanto que ao final do tempo de aquecimento a concentração de colesterol em ambos os ensaios foi de somente 0,13 mg/mL, ainda superior às encontradas para outros ensaios.

Já o ensaio 12 (controle) não apresenta nenhuma das variáveis estudadas em sua composição além do colesterol, demonstrando assim, que o colesterol sozinho oxida, sob altas temperaturas, com a velocidade menor quando comparado com outros ensaios que contém em sua composição principalmente ácidos graxos insaturados.

Os demais ensaios apresentaram um comportamento bastante semelhante com degradação média de 93,7 % do colesterol inicialmente adicionado aos ensaios. Esses resultados evidenciam que a temperatura e o tempo de aquecimento foram fatores determinantes na oxidação do colesterol.



Figura 1 – Degradação do colesterol em sistema modelo seco em função do tempo x temperatura a 230°C. Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle constituído somente de colesterol

Avaliando o efeito das variáveis (Tabela 4) sobre a degradação do colesterol, observa-se que, as variáveis que apresentaram efeito significativo (p < 0,10) foram diferenciadas ao longo dos tempos de aquecimento. Nas condições de concentração estudadas aumentando-se a quantidade de eritorbato de sódio (nível +1), maior pode ser a proteção contra a degradação do colesterol. Fato este que pode ser observado entre 25 e 120 s de aquecimento. Já o EPA, a bixina, o ácido palmítico, a mioglobina e o ácido oleico apresentaram um comportamento inverso ao encontrado para o eritorbato, ou seja, nas condições de concentração estudadas neste trabalho, guando se diminui as quantidades (nível 0) destes constituintes nos sistemas provavelmente a degradação do colesterol pode aumentar. Entre o tempo inicial (10 s) e 50 s, os três ácidos graxos adicionados se mostraram significativos, contribuindo na oxidação do colesterol (material suplementar Figura 6). Diversos trabalhos citados na literatura demonstram que não há consenso quanto ao papel do grau de insaturação dos ácidos graxos na oxidação do colesterol. Outros fatores, como a temperatura e o tempo de aquecimento, influenciam mais diretamente a oxidação (Soupas et al., 2004; Xu et al., 2011), como pode ser confirmado pelos resultados apresentados.

Neste trabalho o ácido palmítico apresentou um efeito negativo, diferente dos resultados encontrados no Capítulo II, ou seja, nas condições estudadas, pequenas concentrações deste ácido graxo já foram capazes de acelerar a degradação do colesterol. Esse fato pode ser atribuído ao aumento da temperatura, pois, quando se estudou esta variável em 130°C ela se mostrou protetora do colesterol contra a degradação, já aumentando a temperatura para 160°C a mesma não apresentou efeito significativo e em 230°C já apresentou um efeito pró-oxidante. Portanto, há sim uma
relação direta entre o aumento da temperatura e a degradação do ácido palmítico. Hu & Chen (2002) estudando sistemas modelo foto-oxidados contendo ésteres metílicos de ácidos graxos e colesterol, observaram que em presença de estearato resultou em uma maior perda de colesterol do que em presença de linoleato e docosa-hexaenoato. Por outro lado, quando o colesterol foi aquecido a 220°C com ácido esteárico a degradação do colesterol não foi influenciada, mas foi acelerada na presença de ácido linolênico (Nogueira, 2011).

Já com relação à bixina, esta variável apresentou um efeito negativo somente nos tempos de 25 e 50 s de aquecimento. Já nos tempos seguintes, o fato de não apresentar mais efeito significativo pode ser devido a sua total degradação após 50 s de aquecimento.

Diferentemente dos resultados apresentados no Capítulo II que mostram que a mioglobina não foi uma variável significativa, na temperatura de 230°C a mesma se mostrou pró-oxidante. Provavelmente devido ao curto tempo de aquecimento destes sistemas (5 min) o Fe presente na mioglobina não se complexou com os ácidos carboxílicos dos ácidos graxos ficando livre para agir como pró-oxidante (Schaich et al., 2013).

Outro motivo para esta variável ser significativa é porque pode ter ocorrido a oxidação de Fe⁺² para Fe⁺³, sendo este último um efetivo pró-oxidante. Segundo Schaich et al. (2013) metais oxidados são iniciadores diretos fortes, formando radicais através da abstração de elétrons das ligações duplas. Monahan, Crackel, Gray, Buckley & Morrissey (1993) utilizaram sistemas modelo para estudar os efeitos da hemoglobina, mioglobina e FeSO₄ na oxidação lipídica. De acordo com os autores, os

maiores valores de TBARS foram obtidos para o tratamento com hemoglobina, seguido dos tratamentos mioglobina > FeSO₄ > controle (carne suína).

De acordo com a Figura 1, o ensaio que apresentou a menor degradação do colesterol, quando comparado aos outros, foi o ensaio 2 seguido dos ensaios 1 e 4, os quais apresentam em sua composição o eritorbato de sódio. Outro fato que pode ser observado na Figura 1 é o comportamento do ensaio 11. O mesmo apresentou a maior degradação do colesterol a partir de 50 s de aquecimento e permaneceu com esse comportamento até o final dos 300 s. O ensaio 11 apresenta em sua composição a bixina, o ácido oleico e a mioglobina, três dos constituintes que mesmo em menores concentrações foram capazes de acelerar a degradação do colesterol.

	10 seg				25	seg			50	seg			90	seg			120	seg			300) seg		
Variáveis	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor																				
Média	0,95	0,01	65,45	<0,0001	0,81	0,02	48,82	<0,0001	0,54	0,02	32,44	<0,0001	0,28	0,02	11,56	<0,0001	0,18	0,02	8,29	0,0001	0,07	0,01	13,31	<0,0001
1	0,02	0,03	0,46	0,6591	0,13	0,04	3,40	0,0114	0,27	0,04	7,27	0,0002	0,12	0,05	2,28	0,0569	0,10	0,05	2,08	0,0762	0,02	0,01	1,86	0,1053
2	-0,04	0,03	-1,28	0,2415	-0,08	0,04	-2,24	0,0602	-0,08	0,04	-2,19	0,0651	-0,07	0,05	-1,35	0,2179	-0,05	0,05	-1,02	0,3409	-0,02	0,01	-1,33	0,2258
3	-0,02	0,03	-0,46	0,6591	-0,05	0,04	-1,43	0,1950	0,04	0,04	1,12	0,3016	-0,08	0,05	-1,54	0,1679	-0,06	0,05	-1,30	0,2336	-0,01	0,01	-0,80	0,4517
4	-0,08	0,03	-2,41	0,0471	-0,03	0,04	-0,81	0,4468	0,02	0,04	0,67	0,5249	0,03	0,05	0,55	0,5970	0,01	0,05	0,18	0,8651	-0,01	0,01	-0,80	0,4517
5	-0,10	0,03	-3,02	0,0194	-0,17	0,04	-4,48	0,0029	-0,22	0,04	-5,93	0,0006	-0,05	0,05	-0,98	0,3577	-0,08	0,05	-1,59	0,1568	-0,02	0,01	-1,86	0,1053
6	0,00	0,03	0,15	0,8823	0,05	0,04	1,43	0,1950	-0,09	0,04	-2,36	0,0500	-0,02	0,05	-0,31	0,7673	-0,04	0,05	-0,88	0,4076	-0,03	0,01	-2,13	0,0712
7	-0,05	0,03	-1,59	0,1567	-0,09	0,04	-2,33	0,0527	-0,16	0,04	-4,24	0,0039	-0,19	0,05	-3,51	0,0099	-0,13	0,05	-2,64	0,0333	-0,02	0,01	-1,86	0,1053

Tabela 4 - Efeito das variáveis na degradação térmica do colesterol em sistemas modelo secos aquecido a 230°C

Significância = p < 0,10 1 = eritrobato de sódio, 2 = bixina, 3 = ácido cítrico, 4 = ácido palmítico, 5 = EPA, 6 = ácido oleico e 7 = mioglobina

3.2 Formação de óxidos de colesterol

As Figuras 2, 3 e 4 apresentam a formação individual de COP's identificados e quantificados em cada ensaio do planejamento (material suplementar Tabelas 5 a 9). Observando os 5 gráficos apresentados, pode-se verificar que o óxido formado em maior concentração foi o 7-ceto, seguido do 5,6 β -epóxido > 5,6 α -epóxido > 7 β -OH > 7 α -OH.

Diferentemente dos resultados encontrados no Capítulo II, que mostra ser o 5,6β-epóxido o óxido encontrado em maior quantidade, os resultados encontrados neste capítulo são semelhantes aos encontrados por diversos autores, que relatam ser o 7-ceto o óxido formado em maior concentração, não somente quando se estuda a formação de COP's em sistemas modelo, mas também em diversos alimentos submetidos a tratamento térmico como carne bovina, suína, de frango, ovos, leite e derivados, entre outros (Paniangvait et al., 1995; Angulo et al., 1997; Guardiola et al., 2002; Xu et al., 2005; Boselli et al., 2005; Mariutti et al., 2008; Otaegui-Arrazola et al., 2010; Ansorena et al., 2013). O colesterol por conter uma dupla ligação no carbono 5, torna os carbonos das posições 4 e 7 os pontos mais susceptíveis a oxidação. 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).

Provavelmente a temperatura elevada contribuiu para o fato de não ser o 5,6βepóxido o óxido encontrado em maior quantidade, pois, para que ocorra a formação do mesmo, através de uma reação bimolecular, a presença de 7-hidroperoxicolesterol (7-

OOH) é necessária (Smith, 1987). Provavelmente, nesta temperatura os 7-OOH foram formados e rapidamente degradados formando o 7-ceto.

Avaliando a Figura 2, com relação à formação de 7-ceto pode-se observar que a maior formação ocorreu nos ensaios 4, 11 e 12. O ensaio 4 apresentou uma maior concentração a partir de 120 s de aquecimento, provavelmente devido a concentração de eritorbato de sódio, um dos constituintes deste ensaio, já ter decaído para níveis não detectados na análise após 90 s. Já o ensaio 11 apresentou concentração acima de 100 µg/mL de 7-ceto após 50 s, aumentando no tempo seguinte, e após 120 s a concentração começou a decrescer evidenciando que sua a concentração máxima foi atingida em 90 s e após esse tempo já começou a ocorrer a sua degradação. O ensaio 12 apresentou concentração máxima em 90 s, chegando a 110,92 µg/mL, concentração esta que decaiu pela metade no tempo final de aquecimento. Os demais ensaios apresentaram um comportamento semelhante com máxima concentração de 7-ceto entre 90 e 120 s e após esse tempo a concentração decaiu para níveis abaixo de 15 µg/mL.



Figura 2 – Formação de 7-ceto nos sistemas modelo secos a 230°C. Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle, constituído somente de colesterol

Observando a formação de 7β-OH (Figura 3), pode-se verificar que, em geral, todos os ensaios apresentaram o mesmo comportamento com máxima concentração entre 25 e 90 s. Destacam-se os ensaios 8, 11 e 12 que apresentaram concentrações maiores que os demais ensaios. O ensaio 8 apresentou concentração máxima de 53,04 μ g/mL após 25 s de aquecimento, enquanto a do ensaio 11 foi de 49,92 μ g/mL em 50 s e do ensaio 12 de 45,54 e 44,17 μ g/mL aos 90 e 120 s, respectivamente. Já para o 7α-OH (Figura 3), os ensaios que apresentaram as maiores concentrações foram o 11 com 46,92 μ g/mL aos 50 s de aquecimentos e o 12 com 40,89 e 39,47 μ g/mL aos 90 e 120 s de aquecimento, respectivamente. O ensaio 4 foi o ensaio que apresentou o comportamento mais distinto dos demais, pois, até o tempo de 25 segundo de aquecimento, o 7α-OH não havia sido detectado e no tempo de 90 s a sua

concentração foi de 32,54 μ g/mL decaindo par 6,17 μ g/mL no tempo final. Os demais ensaios apresentaram formação de 7 α -OH bastante semelhante, com concentrações máximas entre 25 e 90 s.



Figura 3 – Formação de 7β-OH (A) e 7α-OH (B) nos sistemas modelo secos a 230°C. Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle, constituído somente de colesterol

Quando se trata do 5,6α-epóxido (Figura 4), dois ensaios (1 e 2) apresentaram as menores concentrações deste óxido ao longo do tempo de aquecimento. Até 50 s não foi detectado o 5,6α-epóxido nestes ensaios e após esse tempo as concentrações variaram entre 13 e 16 µg/mL. O ensaio 11 foi o que apresentou a maior concentração, 74,34 µg/mL no tempo de 50 s de aquecimento. Os demais ensaios apresentaram máxima de concentração entre 25 e 90 s e após esse tempo a concentração diminuiu, evidenciando que este óxido já estava sendo degradado. Com relação ao 5,6β-epóxido (Figura 4), a maior concentração atingida foi de 167,84 µg/mL no ensaio 11. O ensaio 4 também apresentou uma concentração elevada de 5,6β-epóxido no tempo de 90 s, chegando a 131,97 µg/mL. Os demais ensaios apresentaram comportamento semelhante, com concentração máxima abaixo de 112 µg/mL, que foi atingida entre 25 e 90 s de aquecimento.



Figura 4 – Formação de 5,6α-epóxido e 5,6β-epóxido nos sistemas modelo secos a 230°C. Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle, constituído somente de colesterol

A Figura 5 apresenta a formação total de COP's nos sistemas. Como pode ser observado as concentrações variaram de 0 a 464,37 μg/mL, sendo a concentração máxima encontrada no ensaio 11 no tempo de 50 s de aquecimento. O ensaio 11 foi o que apresentou a maior concentração de todos os óxidos de colesterol, pois, foi o ensaio que apresentou a maior degradação do colesterol, mostrando assim, que há uma relação direta entre a degradação do colesterol e a formação de COP's.

Os ensaios 5, 6, 7, 9, 13, 14 e 15 também apresentaram as maiores concentrações de óxidos no tempo de 50 s (214,95; 219,96; 247,11; 237,09; 259,56; 276,86 e 268,21 µg/mL, respectivamente) e após esse tempo as concentrações de COP's já decaíram mais de 88 % no tempo final de aquecimento, 300 s.

Outros três comportamentos diferenciados podem ser observados quando se analisa a Figura 5, dos ensaios 1, 2 e 4. Os ensaios 1 e 2 apresentaram o máximo de concentração de COP's em 120 s com concentrações de 136,82; 161,86 e 291,95 µg/mL. Esses ensaios apresentaram pequenas concentrações de COP's até o tempo de 50 s (6,57; 23,10 e 62,5 µg/mL, 1, 2 e 4, respectivamente). Estes três ensaios juntamente com os ensaios 10 e 12 foram os que apresentaram concentrações máximas de COP's após 50 s de aquecimento.

Já os ensaios 3 e 8 apresentaram a maior concentração de COP's no tempo de 25 s de aquecimento com concentrações de 216,34 e 270,32 μg/mL, respectivamente. Logo no tempo seguinte, 50 s, essa concentração já começou a decair, chegando no tempo final, 300 s, com concentração de apenas 11,5 e 8,39 μg/mL, respectivamente.

Pode-se concluir que, o binômio tempo x temperatura contribuiu efetivamente na formação de óxidos bem como na degradação dos mesmos. Se o tempo de

aquecimento é elevado pode ocorrer a degradação não apenas do colesterol, mas também dos produtos da oxidação do colesterol, dando origem assim a outros COP's e produtos de maior peso molecular, como polímeros e outros compostos ainda desconhecidos (Park & Addis, 1986; Kim & Nawar, 1993; Hur et al., 2007).



Figura 5 – Formação total de COP's nos sistemas modelo secos aquecidos a 230°C durante 300 s. Ensaios numerados de acordo com a tabela 1. Ensaio 12, controle constituído somente de colesterol

3.3 Confirmação da identidade dos óxidos de colesterol

Foram identificados e confirmados 5 óxidos: 7-ceto, 7α-OH, 7β-OH, 5,6α- e β-

epóxidos (Figura 6), todos oriundos da oxidação do anel B.

Dois hidroperóxidos também foram identificados por espectrometria de massas,

o 7α-OOH e o 7β-OOH. Para os hidroperóxidos os tempos de retenção e os espectros de massas foram comparados aos encontrados por Nogueira, Costa, Crotti &

Bragagnolo, 2010.



Figura 6 – Cromatograma obtido por HPLC (UV 210 nm) do sistema modelo contendo colesterol puro submetido a 160 °C sob fluxo constante de 10 mL/min de O2 após 10 min de aquecimento

A Figura 7 apresenta os espectros de massas dos óxidos de colesterol identificados a partir do cromatograma apresentado na Figura 6. Os mesmos foram comparados com os espectros de massas de cada um dos padrões de óxidos de colesterol (Mariutti et al., 2008; Nogueira et al., 2011).

7-ceto



5,6α-epóxido





5,6β-epóxido



7β-OOH





7α-OOH









7α-OH



Figura 7 - Espectros de massas (MS e MS/MS) obtidos dos óxidos de colesterol

4. Conclusão

Pode-se concluir que, a temperatura de aquecimento foi efetivamente significativa no aumento da degradação do colesterol, formação de óxidos e na degradação dos mesmos.

O aquecimento a 230°C ocasionou perda de 96 % do colesterol inicialmente adicionado após 300 s e as variáveis que contribuíram significativamente nesta degradação foram bixina, ácido palmítico, EPA, ácido oleico e mioglobina. Já a variável que apresentou efeito protetor na degradação do colesterol foi o eritorbato de sódio, retardando o processo oxidativo.

Com relação a formação de óxidos, o 7-ceto foi o óxido formado em maior abundância e a concentração total de óxidos atingiu 464,37 µg/mL no ensaio 11 no tempo de 50 s de aquecimento. Após esse tempo a concentração de óxidos decaiu, atingindo no final do aquecimento 50,13 µg/mL.

Em resumo, pode-se sugerir que tanto a presença de ácidos graxos insaturados quanto de saturados contribuiu para a degradação do colesterol, enquanto que, o antioxidante eritorbato de sódio retardou a oxidação. Também o Fe presente na mioglobina apresentou efeito pró-oxidante, assim como a bixina sobre a degradação do colesterol.

Material suplementar

Tabela 5 – Formação de 7 β -OH (μ g/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 230°C

Tempo (seg)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
10	0,00 ± 0	0,00 ± 0	4,53 ± 0,25	0,00 ± 0	9,72 ± 2,38	$2{,}20\pm0{,}50$	4,54 ± 0,53	$6{,}69\pm0{,}78$	15,79 ± 0,32	3,11 ± 0,49	4,63 ± 0,43	0,93 ± 0,03	$3,62\pm0,60$	$6{,}32\pm0{,}65$	4,97 ± 0,61
25	0,59 ± 0,01	1,44 ± 0,20	30,94 ± 2,06	0,00 ± 0	23,67 ± 3,66	20,96 ± 2,12	17,2 ± 1,14	53,04 ± 3,83	30,65 ± 5,60	27,97 ± 1,43	29,65 ± 3,47	10,23 ± 2,38	27,27 ± 4,45	30,36 ± 4,40	28,82 ± 4,80
50	2,68 ±0,55	2,68 ± 0,37	23,51 ± 5,13	10,36 ± 1,77	35,53 ± 6,14	32,87 ± 3,44	26,45 ± 0,83	41,19 ± 3,60	30,88 ± 4,99	24,33 ± 4,30	49,92 ± 3,06	38,80 ± 6,37	33,01 ± 0,76	35,87 ± 2,81	34,44 ± 0,79
90	13,78 ± 3,39	27,69 ± 2,01	9,88 ± 0,40	$36,93\pm3,48$	13,05 ± 0,12	22,24 ± 1,59	11,09 ± 0,15	8,08 ± 1,61	19,37 ± 0,31	30,52 ± 1,34	18,83 ± 2,48	45,54 ± 6,31	17,25 ± 1,41	17,18 ± 2,34	17,22 ± 1,81
120	21,23 ± 1,59	28,20 ± 0,34	3,30 ± 0,31	32,01 ± 0,64	6,13 ± 0,96	12,93 ± 1,82	2,79 ± 0,64	1,25 ± 0,17	13,51 ± 0,82	9,12 ± 1,73	12,59 ± 0,47	44,17 ± 4,74	5,50 ± 1,32	7,45 ± 1,61	6,48 ± 1,37
300	6,10 ± 0,55	11,15 ± 2,42	1,36 ± 0,18	8,35 ± 1,12	1,38 ± 0,29	2,64 ± 0,20	0,76 ± 0,03	0,71 ± 0,18	1,98 ± 0,40	2,75 ± 0,16	1,12 ± 0,27	21,33 ± 5,07	1,87 ± 0,06	0,00 ± 0	0,94 ± 0,15

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 6 – Formação de 7α-OH (μg/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 230°C

Tempo (seg)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
10	0,00 ± 0	0,00 ± 0	3,56 ± 0,57	0,00 ± 0	16,68 ± 3,06	3,47 ± 0,19	5,62 ± 1,33	5,61 ± 0,11	8,74 ± 1,95	3,38 ± 0,21	4,10 ± 0,39	0,78 ± 0,19	$4,85\pm0,54$	8,56 ± 0,69	$6,705\pm0,56$
25	0,00 ± 0	$2,\!30\pm0,\!05$	18,84 ± 2,41	0,00 ± 0	12,78 ± 2,91	17,36 ± 4,01	7,31 ± 0,49	26,41 ± 1,09	22,59 ± 4,32	22,46 ± 4,79	21,05 ± 0,89	9,36 ± 1,91	30,01 ± 3,31	21,59 ± 3,70	21,30 ± 3,75
50	$0,76\pm0,05$	3,01 ± 0,71	8,71 ± 0,11	9,30 ± 1,36	20,96 ± 2,06	22,67 ± 3,42	15,29 ± 0,98	20,86 ± 3,91	14,23 ± 0,51	7,54 ± 0,81	46,92 ± 4,75	36,78 ± 6,08	15,14 ± 1,23	15,82 ± 0,20	15,48 ± 1,50
90	19,48 ± 2,73	22,44 ± 2,58	4,49 ± 0,24	32,54 ± 2,50	3,88 ± 0,84	8,17 ± 0,41	7,52 ± 1,34	3,77 ± 0,28	7,58 ± 0,48	7,53 ± 1,69	13,72 ± 1,85	40,89 ± 7,43	7,60 ± 0,87	5,06 ± 1,10	6,33 ± 0,98
120	19,78 ± 1,40	22,87 ± 0,75	1,79 ± 0,09	27,68 ± 0,53	2,17 ± 0,04	4,34 ± 0,52	4,66 ± 0,19	1,85 ± 0,15	4,83 ± 0,13	3,89 ± 0,11	10,08 ± 0,46	39,47 ± 5,93	3,51 ± 0,25	3,60 ± 0	$3,75\pm0,73$
300	$5{,}79\pm0{,}19$	8,80 ± 1,85	1,23 ± 0,28	6,17 ± 1,11	0,00 ± 0	1,37 ± 0,09	1,23 ± 0,15	0,98 ± 0,22	1,23 ± 0,13	0,36 ± 0,02	1,57 ± 0,31	10,82 ± 1,16	1,52 ± 0	0,00 ± 0	0,76 ± 0,02

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 7 – Formação de 5,6β-epóxido (μg/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 230°C

Tempo (seg)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	$0,00\pm0$	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
10	0,00 ± 0	0,00 ± 0	25,80 ± 4,63	0,00 ± 0	39,77 ± 8,69	$16,22 \pm 0,73$	$25,72\pm5,93$	43,22 ± 3,88	38,37 ± 0,13	19,68 ± 2,91	14,30 ± 0,79	0,00 ± 0	31,51 ± 5,85	28,56 ±3,78	30,04 ± 4,73
25	0,00 ± 0	0,00 ± 0	91,30 ± 7,91	0,00 ± 0	94,16 ± 15,18	60,02 ± 10,55	71,97 ± 14,85	108,57 ± 8,57	76,22 ± 15,07	44,42 ± 11,12	71,58 ± 5,55	35,49 ± 8,42	95,23 ±4,01	86,68 ± 4,81	90,96 ± 4,31
50	0,00 ± 0	13,30 ± 0,13	63,60 ± 15,54	29,12 ± 2,47	80,60 ± 14,57	74,30 ± 3,26	104,02 ± 1,72	76,78 ± 9,99	92,54 ± 5,10	61,94 ± 12,09	167,84 ± 14,87	88,91 ± 14,22	108,25 ± 8,03	111,05 ± 6,91	109,65 ± 8,15
90	35,92 ± 3,72	42,97 ± 2,37	23,11 ± 5,17	131,97 ± 11,63	34,29 ± 6,20	63,07 ± 7,41	39,78 ± 5,00	18,84 ± 0,60	51,75 ± 10,83	73,86 ± 9,58	89,19 ± 8,91	96,96 ± 7,65	51,16 ± 4,99	49,93 ± 4,82	50,55 ± 4,78
120	38,44 ± 5,58	41,91 ± 3,42	16,06 ± 0,20	91,80 ± 9,09	11,17 ± 1,90	22,50 ± 3,27	10,61 ± 0,88	0,00 ± 0	23,54 ± 4,02	19,97 ± 1,31	52,08 ± 2,10	77,41 ± 10,05	21,29 ± 3,68	23,00 ± 3,99	22,15 ± 2,69
300	0,00 ± 0	19,26 ± 3,57	0,00 ± 0	22,22 ± 2,91	0,00 ± 0	5,06 ± 0,72	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	$5{,}53\pm0{,}89$	11,25 ± 0,79	35,33 ± 1,93	9,34 ± 0,33	7,35 ± 0	4,67 ± 0,53

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 8 – Formação de 5,6α-epóxido (μg/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 230°C

Tempo (seg)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
10	0,00 ± 0	0,00 ± 0	13,26 ± 1,91	0,00 ± 0	11,19 ± 2,40	8,12 ± 0,68	15,87 ± 1,59	20,23 ± 1,83	16,63 ± 3,68	8,91 ± 0,42	0,00 ± 0	0,00 ± 0	14,27 ± 0,93	15,80 ±0,71	15,04 ± 0,89
25	0,00 ± 0	0,00 ± 0	47,38 ± 4,14	0,00 ± 0	33,23 ± 7,12	29,88 ± 4,27	33,54 ± 3,97	51,55 ± 2,42	36,23 ± 4,75	28,60 ± 4,64	25,35 ± 3,01	23,55 ± 4,47	$46,65\pm4,75$	43,55 ± 5,01	45,10 ± 6,75
50	0,00 ± 0	0,00 ± 0	47,67 ± 6,86	12,98 ± 2,29	36,80 ± 6,41	$56,83\pm6,40$	58,35 ± 4,36	53,63 ± 10,38	51,73 ± 4,41	45,59 ± 1,82	74,34 ± 7,62	38,32 ± 7,31	55,87 ± 2,54	59,40 ± 6,10	57,64 ± 2,30
90	13,23 ± 3,07	14,45 ± 2,03	26,94 ± 3,64	57,16 ± 2,44	19,13 ± 2,85	42,54 ± 8,39	34,51 ± 5,03	22,07 ± 1,17	31,55 ± 2,42	35,52 ± 8,33	52,14 ± 2,79	46,00 ± 5,00	32,03 ± 1,12	40,34 ± 3,58	36,19 ± 1,25
120	16,08 ± 1,82	13,52 ± 1,97	13,37 ± 3,24	49,52 ± 8,86	20,62 ± 5,02	32,33 ± 5,88	19,66 ± 1,69	8,58 ± 0,20	25,05 ± 2,90	14,91 ± 1,18	30,32 ± 4,96	37,28 ± 4,98	21,46 ± 3,57	21,65 ± 2,78	21,56 ± 3,51
300	0,00 ± 0	7,50 ± 0,60	0,00 ± 0	10,35 ± 1,11	0,00 ± 0	6,35 ± 0,77	6,12 ± 1,42	0,00 ± 0	5,38 ± 0,40	6,19 ± 1,47	9,15 ± 1,80	18,33 ± 3,66	6,16 ± 0,52	5,18 ± 0	3,08 ± 0,35

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 9 – Formação de 7-ceto (µg/mL)* durante aquecimento dos sistemas a 230°C

Tempo (seg)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0	0,00 ± 0
10	$0{,}52\pm0{,}02$	0,00 ± 0	2,41 ± 0,41	0,00 ± 0	9,65 ± 0,44	1,74 ± 0,15	$4{,}24\pm0{,}24$	4,83 ± 0,97	7,47 ± 1,60	5,80 ± 0,39	$5{,}26\pm0{,}89$	1,74 ± 0,10	2,01 ± 0,35	$5{,}80\pm0{,}73$	3,91 ± 0,36
25	1,27 ± 0,01	2,04 ± 0,32	27,88 ± 6,17	$0{,}50\pm0{,}05$	21,22 ± 3,18	$18,\!45\pm4,\!42$	16,08 ± 5,52	$30,75\pm3,10$	24,23 ± 1,90	10,19 ± 0,88	36,30 ± 5,78	$5{,}54\pm0{,}50$	$21,\!55\pm2,\!79$	21,34 ± 3,28	$21,\!45\pm2,\!75$
50	3,13 ±0,29	4,11 ± 0,99	43,56 ± 4,82	0,74 ±2,68	40,30 ± 1,85	33,29 ± 4,57	43,00 ± 1,57	49,56 ± 3,62	47,71 ± 2,37	38,51 ± 5,79	125,35 ± 6,23	46,69 ± 9,86	47,29 ± 1,93	54,72 ± 5,38	51,01 ± 1,53
90	30,47 ± 4,62	49,56 ± 5,72	29,16 ± 4,85	15,13 ± 7,10	$35,72\pm6,59$	46,68 ± 2,46	46,61 ± 2,57	39,10 ± 1,46	38,19 ± 5,54	44,23 ± 4,49	127,81 ± 3,73	110,92 ± 0,77	52,02 ± 4,28	58,40 ± 1,58	55,21 ± 4,28
120	41,29 ± 6,80	55,36 ± 4,01	$13,\!82\pm2,\!06$	90,94 ± 4,34	26,11 ± 5,08	35,08 ± 2,55	36,76 ± 3,32	19,34 ± 1,87	34,66 ± 3,22	35,09 ± 2,13	95,45 ± 14,02	77,44 ± 11,47	39,63 ± 2,87	44,33 ± 1,40	41,98 ± 2,45
300	$14,95 \pm 2,44$	23,62 ± 3,43	8,91 ± 1,03	106,30 ± 7,87	5,79 ± 0,66	9,43 ± 1,11	8,93 ± 0,91	6,70 ± 0,25	7,29 ± 1,43	13,52 ± 0,11	27,04 ± 5,09	$54,05\pm6,95$	$10,\!43\pm0,\!16$	12,30 ± 1,68	11,37 ± 0,16

* Média ± desvio padrão das triplicatas

Tabela 10 – Formação total de COP's (µg/mL)* durante aquecimento a 230°C

Tempo (seg)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,52	0,00	49,56	0,00	87,01	31,75	55,99	80,58	87,00	40,88	28,29	3,45	56,26	65,04	60,65
25	2,24	5,78	216,34	0,97	185,06	146,67	146,10	270,32	189,92	133,64	183,93	84,17	220,71	194,52	207,61
50	6,57	23,10	187,05	62,50	214,19	219,96	247,11	242,02	237,09	177,91	464,37	249,50	259,56	276,86	268,21
90	112,88	157,11	93,58	273,73	106,07	182,70	139,51	91,86	148,44	191,66	301,69	340,31	160,06	170,91	165,48
120	136,82	161,86	48,34	291,95	66,20	107,18	74,48	31,02	101,59	82,98	200,52	275,77	95,39	96,43	95,91
300	26,84	70,33	11,50	153,39	7,17	24,85	17,04	8,39	15,88	28,35	50,13	139,86	29,32	22,30	20,81

*Somatória das médias de todos os COP's

Figura 6 – Degradação dos ácidos graxos (16:0, 18:1n9, 20:5n3) nos ensaios dos sistemas modelo aquecidos a 230°C, segundo planejamento experimental







Referências

Angulo, A. J., Romera, J. M., Ramirez, M. & Gil, A. (1997). Determination of cholesterol oxides in dairy products. Effect of storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4318-4323.

Ansorena, D., Barriuso, B., Cardenia, V., Astiasarán, I., Lercker, G. & Rodriguez-Estrada, M. T. (2013). Thermo-oxidation of cholesterol: effect of the unsaturation degree of the lipid matrix. *Food Chemistry*, 141, 2757-2764.

AOCS. (1997). Official Method Ce 1b-89. In: Firestone, D. (Ed). *Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society* (5th ed.). Champaign: American Oil Chemists' Society Press.

Baggio, S. R. & Bragagnolo, N. (2006). Fatty acids, cholesterol oxides and cholesterol in brazilian processed chicken products. *Italian Journal of Food Science*, 18, 199-208.

Baggio, S. R., Miguel, A. M. R. & Bragagnolo, N. (2005). Simultaneous determination of cholesterol oxides, cholesterol and fatty acids in processed turkey meat products. *Food Chemistry*, 89, 475-484.

Boselli, E., Caboni, M. F., Rodriguez-Estrada, M. T., Toschi, T. G., Daniel, M. & Lercker, G. (2005). Photoxidation of cholesterol and lipids of turkey meat during storage under comercial retail conditions. *Food Chemistry*, 91, 705-713.

Bragagnolo, N. (2009). Cholesterol and cholesterol oxides in meat and meat products. In: *Handbook of Muscle Foods Analysis*, (pp. 187-219).Nollet, L. M. L. & Toldrá.

FAO/WHO (1982). Food and Nutrition Paper (Vol. 25). Rome: FAO.

Frankel, E. N. (2005). *Lipid oxidation*. (2th ed.). Bridgwater: The oily press.

Guardiola, F.; Dutta, P. C.; Codony, R.; Savage, G. P. (2002). *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence and Biological Effects,* Champaign: American Oil Chemists' Society Press.

Hu, P. C. & Chen, B. H. (2002). Effects of riboflavin and fatty acid methyl esters on cholesterol oxidation during illumination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3572-3578.

Hur, S. J., Park, G. B. & Joo, S. T. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COP's) in animal products. *Food Control*, 18, 939-947.

Joseph, J. D. & Ackman, R. G. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.

Karpińska-Tymoszczyk, M. (2013). The effect of oil-soluble rosemary extract, sodium erythorbate, their mixture, and packaging method on the quality of turkey meatballs. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 443-454.

Kerry, J., Gilroy, D. A. & O'Brien, N. M. (2002). Formation and content of cholesterol oxidation products in meat and meat products. In: Guardiola, F., Dutta, P. C. & Codony, R.; Savage, G. P. *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence and Biological Effects*, (pp. 162-185). Champaign: AOCS Press.

Kim, S. K. & Nawar, W. W. (1993). Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids*, 28, 917-922.

Lara, W. H. (ed) (1984). Monografias de Corantes Naturais para Fins Alimentícios. *Padrões de Identidade e Qualidade*, pp. 22-29. São Paulo.

Lee, H. W., Chien, J. T. & Chen, B. H. (2008). Inhibition of cholesterol oxidation in marinated foods as affected by antioxidants during heating. *Food Chemistry*, 108, 234-244.

Lercker, G. & Rodriguez-Estrada, M. T. (2000). Cholesterol oxidation: Presence of 7ketocholesterol in different food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 625-631.

Mariutti, L. R. B., Nogueira, G. C. & Bragagnolo, N. (2008). Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides extraction in chicken meat using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2913-2918.

Monahan, F. J., Crackel, R. L., Gray, J. I., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (1993). Catalysis of lipid oxidation in muscle model systems by haem and inorganic iron. *Meat Science*, 34, 95–106.

Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D. & Astiasarán, I. (2010). Oxysterols: A world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3289-3303.

Paniangvait, P., King, A. J., Jones, A. D. & German, B. G. (1995). Cholesterol oxides in foods of animal origin. *Journal of Food Science*, 52, 57-62.

Park, S. W. & Addis, P. B. (1986). Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *Journal of Food Science*, 51, 1380-1381.

Plackett, R. L. & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika Trust*, 33, 305-325.

Salanha, T., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. & Bragagnolo, N. (2006). HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV and APCI-MS detectors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4107-4113.

Sancho, R. A. S., Bragagnolo, N., Costa, G. G., Mariutti, L. R. B. & De Lima, F.A. (2011). Effect of annatto seed and coriander leaves as natural antioxidants in fish meatballs during frozen storage. *Journal of Food Science*, 76, 838-845.

Schaich, K. M., Shahidi, F., Zhong, Y. & Eskin, N. A. M. (2013). Lipid oxidation. In: *Biochesmistry of foods* (pp. 420-469). Elsevier Inc.

Schroepfer Jr., G. J. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological Reviews*, 80, 361-554.

Shivas, S. D.; Kropf, D. H.; Hunt, M. C.; Kastner, C. L.; Kendall, J. L. A.; Dayton, A. D. (1984). Effects of ascorbic acid on display life of ground beef. *Journal of Food Protection*, 47: 11–15.

Selani, M. M., Contreras-Castillo, C. J., Shirahigue, L. D., Gallo, C. R., Plata-Oviedo, M., & Montes-Villanueva, N. D. (2011). Wine industry residues as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat Science*, 88, 397-403.

Smith, L. L. (1987). Cholesterol autoxidation 1981-1986. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44, 87-125.

Smith, L. L. (1991). The oxidation of cholesterol. In: Peng, S. K.; Morin, R. J. *Biological Effects of Cholesterol Oxides*, (pp. 7-31). London: CRC Press.

Soupas, L., Juntunen, L., Lampi, A. M. & Piironen, V. (2004). Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6485-6491.

Uckoo, R. M., Jayaprakasha, G. K., Nelson, S. D. & Patil, B. S. (2011). Rapid simultaneous determination of amines and organic acids in citrus using high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 83, 948-954.

Valenzuela, A., Sanhueza, J. & Nieto, S. (2003). Cholesterol oxidation: Health hazard and the role of antioxidants in prevention. *Biological Research*, 36, 291-302.

Vicente, S. J. V., Sampaio, G. R., Ferrari, C. K. B. & Torres, E. A. F. S. (2012). Oxidation of cholesterol in foods and its importance for human health. *Food Reviews International*, 28, 47-70.

Wasowicz, E. (2003). Cholesterol and phytosterols. In: Sikorski, Z.E.; Kolakowska, A. *Chemical and functional properties of food lipids.* Washington: CRC Press.

Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R. & Enser, M. (2004). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66, 21-32.

Xu, G. H., Sun, J. L., Liang, Y. T., Yang, C. & Chen, Z. Y. (2011). Interaction of fatty acids with oxidation of cholesterol and beta-sitosterol. *Food Chemistry*, 124, 162-170.

Xu, Z. M., Zhang, T., Prinyawiwatkul, W. & Godber, J. S. (2005). Capabilities of different cooking oils in prevention of cholesterol oxidation during heating. *Journal of theAmerican Oil Chemists Society*, 82, 243-248.

CONCLUSÃO GERAL

À medida que se aumenta a temperatura o colesterol é degradado mais rapidamente, sendo uma das vias de degradação a auto-oxidação com formação de COP's. Foram identificados, quantificados e confirmados 5 COP's, nos sistemas modelo, sendo eles 7-ceto, 7 α -OH, 7 β -OH, 5,6 α -epóxido e 5,6 β -epóxido. Na temperatura de 130 e 160°C o óxido formado em maior quantidade foi 5,6 β -epóxido e na de 230°C foi o 7-ceto.

De acordo com o planejamento experimental as variáveis que contribuíram significativamente no processo de oxidação do colesterol foram, para as temperaturas de 130 e 160°C, EPA, bixina e ácido oleico que, ao longo do aquecimento, proporcionaram a maior degradação do colesterol. Por outro lado, as variáveis que apresentaram efeito protetor sobre a degradação foram o eritorbato de sódio e ácido palmítico em 130°C e eritorbato de sódio na temperatura de 160°C. Já para a temperatura de 230°C as variáveis que contribuíram significativamente para a possível degradação foram bixina, ácido palmítico, EPA, ácido oleico e mioglobina e a variável que apresentou possível efeito protetor na degradação do colesterol foi o eritorbato de sódio, retardando o processo oxidativo.

Nas temperaturas de 130 e 160°C houve perda de 97 % do colesterol inicialmente adicionado, e o sistema modelo constituído de colesterol, bixina, ácido oleico e mioglobina (ensaio 11) foi o que apresentou a maior degradação do colesterol ao final de 240 e 30 min de aquecimento, respectivamente. Já na temperatura de 230°C houve degradação de 96 % de colesterol ao final de 300 s de aquecimento, e o

sistema que apresentou a maior degradação também foi o que continha em sua composição colesterol, bixina, ácido oleico e mioglobina (ensaio 11).

Quanto à formação de óxidos verificou-se que as maiores concentrações obtida foram de 614,38 µg/mL em 130°C no tempo de 15 min de aquecimento, 588,69 µg/mL, em 160°C no tempo de 6 min e 464 µg/mL na temperatura de 230°C, no tempo de 50 segundos de aquecimento, concentrações estas encontradas no ensaio 11, sendo o mesmo ensaio que apresentou a maior degradação do colesterol.

Em resumo, pode-se sugerir, que nas condições estudadas de concentração, a presença de ácidos graxos insaturados contribuiu para a degradação do colesterol, enquanto que, o antioxidante eritorbato de sódio pode retardar a oxidação, assim como o ácido palmítico (saturado) para as temperaturas de 130 e 160°C. Por outro lado, o Fe presente na mioglobina não apresentou efeito pró-oxidante nas temperaturas de 130 e 160°C e na temperatura de 230°C esta variável foi significativa. Já o ácido cítrico não apresentou efeito protetor sobre a degradação do colesterol.

Pode-se concluir que, o binômio tempo x temperatura foi efetivamente significativo no aumento da degradação do colesterol, formação de COP's e na degradação dos mesmos.