

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

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**“ÓXIDOS DE COLESTEROL, COLESTEROL, LIPÍDIOS  
TOTAIS E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM  
CARNE DE PERU”**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Sueli Regina Baggio, aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de fevereiro de 2000.

**SUELI REGINA BAGGIO**  
**Farmacêutica Industrial**

Campinas, 22 de fevereiro de 2000.

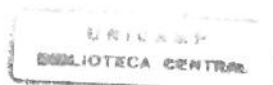
**Dra. NEURA BRAGAGNOLO**  
**Orientadora**

  
Dra. Neura Bragagnolo  
Presidente da Banca

**Profa. Dra. DÉLIA RODRIGUEZ-AMAYA**  
**Co-orientadora**

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

**Campinas, SP, 2000**



|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| UNIDADE      | B.C.                                |
| N.º CHAMADA: | T/UNICAMP                           |
|              | B146                                |
| V.           | Ex.                                 |
| TCMBO BC/    | 40780                               |
| PROC.        | 278100                              |
| C            | <input type="checkbox"/>            |
| D            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO        | 99,00                               |
| DATA         | 30/03/00                            |
| N.º CPD      |                                     |

CM-00138931-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

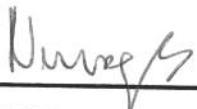
B146o Baggio, Sueli Regina  
Óxidos de colesterol, colesterol, lipídios totais e composição  
de ácidos graxos em carne de peru / Sueli Regina Baggio. –  
Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Neura Bragagnolo  
Co-orientador: Délia Rodriguez-Amaya  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

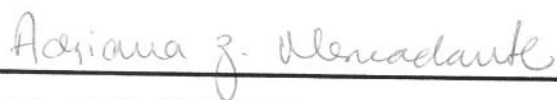
1.Óxidos. 2.Colesterol. 3.Lipídios. 4.Ácidos graxos.  
5.Peru (Ave) I.Bragagnolo, Neura. II.Rodriguez-Amaya, Délia.  
III.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. IV.Título.

**BANCA EXAMINADORA**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE



**DRA. NEURA BRAGAGNOLO  
(ORIENTADORA)**



**PROFA. DRA. ADRIANA Z. MERCADANTE  
(MEMBRO)**



**PROFA. DRA. HELENA TEIXEIRA GODOY  
(MEMBRO)**

**PROFA. DRA. MARIA DE LOURDES PIRES BIANCHI  
(MEMBRO)**

Campinas, \_\_\_\_ de janeiro de 2000.

A DEUS, PELA MINHA EXISTÊNCIA,  
CONQUISTA E REALIZAÇÃO.  
AOS MEUS PAIS ADELINO E ALAIDE,  
PELO IMENSO AMOR, CARINHO,  
DEDICAÇÃO E PACIÊNCIA E ÀS MINHAS  
IRMÃS SIMONE E SANDRA, PELA  
FORÇA, APOIO E INCENTIVO.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Neura Bragagnolo, agradeço pela orientação, dedicação, paciência, convívio e amizade.

À Profa. Dra. Délia Rodriguez-Amaya, pela co-orientação e apoio.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões apresentadas na redação final da tese.

À CAPES pela bolsa de mestrado e à FAPESP pelo apoio financeiro concedido ao projeto.

Ao Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada do Itai, em especial à Ana Maria Rauen de Oliveira Miguel, pela oportunidade, apoio e realização da tese.

Aos colegas do laboratório de Bromatologia e Lípidos, Jane Turatti, Elizabete Spina, José Álvaro, Cláudia, Rita Vilela, Rita Seco, Zilda e, um agradecimento especial à Adriana e ao Fernando, pelo carinho, amizade, incentivo e companheirismo.

Ao Gilson Nogueira, pela colaboração e suporte na área de informática.

Um grande agradecimento à Gislaíne Nogueira, pelo apoio, carinho, dedicação, esforço e grandiosa ajuda prestada na elaboração e redação final da tese.

Ao Roberto Machado de Moraes, ou melhor Boy, pela grande força, incentivo, apoio, companheirismo e amizade.

Ao Eduardo Vicente, pela colaboração e dedicação na execução das análises com CG-MS.

À minha família, que mesmo distante, sempre estiveram presentes, dando força, apoio e incentivo.

À tia Tereza Rebola Zari, pela hospitalidade, carinho e dedicação.

A todos que me incentivaram e contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

|                        |   |
|------------------------|---|
| RESUMO GERAL .....     | i |
| INTRODUÇÃO GERAL ..... | 1 |

### Capítulo 1

#### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### COLESTEROL E SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| RESUMO .....                                              | 6  |
| SUMMARY .....                                             | 6  |
| 1 - INTRODUÇÃO .....                                      | 6  |
| 2 – COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTETOL .....               | 7  |
| 3 – AUTOXIDAÇÃO DO COLESTEROL .....                       | 9  |
| 4 – MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL ..... | 14 |
| 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                      | 17 |

### Capítulo 2

#### VALIDAÇÃO DA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA POR CLAE DE COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL EM CARNE DE PERU

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| RESUMO .....                         | 24 |
| SUMMARY .....                        | 25 |
| 1 – INTRODUÇÃO .....                 | 26 |
| 2 - MATERIAL E MÉTODOS .....         | 28 |
| 2.1 – Material e Reagentes .....     | 28 |
| 2.2 - Métodos .....                  | 28 |
| 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....     | 36 |
| 4 – CONCLUSÃO .....                  | 40 |
| 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 40 |

**Capítulo 3****ÓXIDOS DE COLESTEROL, COLESTEROL, LIPÍDIOS TOTAIS E  
COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM CARNE DE PERU**

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO .....</b>                                                               | <b>44</b> |
| <b>SUMMARY .....</b>                                                              | <b>45</b> |
| <b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>                                                       | <b>46</b> |
| <b>2 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                | <b>47</b> |
| <b>2.1 – Material .....</b>                                                       | <b>47</b> |
| <b>2.2 – Métodos.....</b>                                                         | <b>48</b> |
| <b>2.2.1 – Determinação simultânea de óxidos de colesterol e colesterol .....</b> | <b>48</b> |
| <b>2.2.2 – Determinação da composição de ácidos graxos.....</b>                   | <b>49</b> |
| <b>2.3 – Análise estatística .....</b>                                            | <b>52</b> |
| <b>3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                            | <b>52</b> |
| <b>4 – CONCLUSÃO.....</b>                                                         | <b>59</b> |
| <b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                       | <b>59</b> |

**ANEXOS**

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| <b>Anexo 1.....</b> | <b>63</b> |
| <b>Anexo 2.....</b> | <b>72</b> |
| <b>Anexo 3.....</b> | <b>72</b> |
| <b>Anexo 4.....</b> | <b>76</b> |

## RESUMO GERAL

Considerando que o colesterol é um esteroide largamente distribuído no reino animal, susceptível à oxidação quando exposto ao ar, a temperaturas elevadas, luz, radiação ou à combinação destes fatores, pode ocorrer a formação de vários produtos de oxidação, tais como: 25-hidroxicolesterol; colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol; 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol; 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol; 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol; 7 $\beta$ -hidroxicolesterol; 7-cetocolesterol e colestano-4,6-dien-3-ona. Estes compostos são considerados mais aterogênicos do que o próprio colesterol na formação de placas ateroscleróticas.

A oferta de carne de peru tem aumentado muito nos últimos anos com a suposta característica de apresentarem baixos teores de colesterol, lipídios totais e de ácidos graxos saturados. Esses componentes influenciam no nível de colesterol sanguíneo, sendo que altos níveis é um dos fatores de risco às doenças cardiovasculares.

Com base nestes fatos, os objetivos do trabalho foram: (1) otimizar e validar uma metodologia para a determinação simultânea, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de óxidos de colesterol e colesterol em carne de peru; (2) determinar os teores de óxidos de colesterol, colesterol, lipídios totais e a composição de ácidos graxos em carne de peru.

Cinco diferentes lotes de amostras compostas de carne de peru, constituídos por três unidades, foram analisados. As amostras foram divididas em: asa, coxa, peito e pele.

Para a otimização da metodologia para determinação simultânea de óxidos de colesterol e colesterol, foram testados cinco métodos e oito condições cromatográficas, sendo selecionada a metodologia desenvolvida por SANDER *et al.* (1989). As condições cromatográficas estabelecidas no presente trabalho foram: coluna Nova Pak CN HP 300 x 3,9mm, 4 $\mu$ m (Waters, USA); fase móvel de hexano/isopropanol (96+4) e detector por conjunto de diodos fixado a 210nm. O

método foi validado através da recuperação, coeficiente de variação, limite de detecção e limite de quantificação. A identificação do colesterol e seus óxidos foi feita por comparação com o tempo de retenção do padrão, espectros de absorvância e co-cromatografia, e a confirmação por espectros de massas. Foram identificados dois óxidos de colesterol (7-cetocolesterol e 7 $\beta$ -hidroxicolesterol), sendo que o 7-cetocolesterol variou de  $0,33 \pm 0,03$  no peito a  $7,65 \pm 0,87 \mu\text{g/g}$  na pele. Não foi possível quantificar o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol nas condições estabelecidas no presente trabalho. Os valores de colesterol obtidos para a carne da asa, coxa, peito e pele foram  $46 \pm 5$ ;  $35 \pm 2$ ;  $27 \pm 3$ ;  $81 \pm 6 \text{mg/100g}$ , respectivamente, sendo significativamente maior na pele e menor no peito.

A partir da mesma extração utilizada para análise do colesterol e seus óxidos (FOLCH *et al.* 1957), foi determinado o teor de lipídios totais e a composição de ácidos graxos. Os teores de lipídios totais para a asa, coxa, peito e pele foram  $0,9 \pm 0,4$ ;  $1,1 \pm 0,2$ ;  $0,5 \pm 0,1$  e  $12 \pm 3 \text{g/100g}$ , respectivamente. O peito apresentou teor significativamente menor de lipídios totais, enquanto que a pele apresentou teor significativamente maior. A composição de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa com coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88 (50m x 0,25mm, 0,20 $\mu\text{m}$  de polietilenoglicol). Os principais ácidos graxos identificados na asa, coxa e peito foram C18:2 $\omega$ 6, C18:1 $\omega$ 9, C16:0, C18:0 e C20:4 $\omega$ 6, e na pele, além destes, o C16:1 $\omega$ 7. Os teores de ácidos graxos C15:0, C22:5 $\omega$ 3, C22:5 $\omega$ 6 e C22:6 $\omega$ 3 não apresentaram diferença significativa entre as amostras analisadas, mas variações significativas foram observadas entre asa, coxa e peito, e principalmente em relação à pele.

## INTRODUÇÃO GERAL

O colesterol é um importante constituinte dos produtos de origem animal, está presente em todas as membranas celulares e apresenta funções importantes no organismo humano, pois é a chave intermediária na produção de ácidos biliares, hormônios sexuais masculinos e femininos, hormônios adrenocorticais e participa da síntese da vitamina D<sub>3</sub>. Porém, está relacionado com aterosclerose e doenças cardiovasculares (KEYS, 1970; ANDERSON *et al.*, 1973; REISER, 1978), que são a principal causa de morte no Brasil e em muitos outros países.

A maior parte do colesterol do organismo, aproximadamente 75%, origina-se da biossíntese, enquanto que apenas 25% é fornecido pela dieta. Quando a alimentação é muito rica em colesterol, ocorre um bloqueio da síntese endógena. Por outro lado, a redução muito acentuada de colesterol pode aumentar sua fabricação biológica.

O NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (1988) dos EUA recomenda, para baixar os níveis de colesterol sanguíneo dos indivíduos que se encontram na faixa de risco (acima de 200mg/dL), a diminuição da ingestão de lipídios, gordura saturada e colesterol. De acordo com McNAMARA (1990) o colesterol sanguíneo sofre maior influência da quantidade de gordura e da composição de ácidos graxos ingeridos do que do colesterol.

Com base nestes fatos a indústria de alimentos tem desenvolvido várias tecnologias para reduzir a concentração ou eliminar o colesterol de alimentos processados ou "in natura". Estas tecnologias incluem o emprego de substitutos de gordura animal, a sua extração com solventes, gases e agentes complexantes e a sua transformação em produtos não-tóxicos pela ação das enzimas. Da mesma forma, criadores de animais têm tentado, através de dietas, melhoramento genético e sistemas de criação reduzir os níveis de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos saturados de carnes e de ovos.

O colesterol é um lipídio insaturado muito susceptível à oxidação, levando à formação de vários produtos de oxidação. Embora mais de setenta óxidos de

colesterol sejam conhecidos, apenas oito têm sido identificados em alimentos, os quais são: 25-hidroxicolesterol; colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol; 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol; 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol; 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol; 7 $\beta$ -hidroxicolesterol; 7-cetocolesterol e colestano-4,6-dien-3-ona (FINOCCHIARO & RICHARDSON, 1983; SANDER *et al.*, 1989). Destes óxidos, o 25-hidroxicolesterol e o colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol são considerados mais citotóxicos (KANDUTSCH *et al.*, 1978; PENG *et al.*, 1979; IMAI *et al.*, 1980; ANSARI *et al.*, 1982; ADDIS, 1986; KUMAR & SINGHAL, 1991; KUBOW, 1990).

Alimentos com alto teor de colesterol, como ovos e produtos com ovos; leite e seus derivados; carne e seus produtos processados; quando expostos ao ar, a temperaturas elevadas, luz, radiação, ou à combinação destes fatores durante o processamento e o armazenamento podem ser importantes fontes de óxidos de colesterol na dieta (SMITH, 1987; HUBBARD *et al.*, 1989).

Recentes relatos demonstram um papel possivelmente maior dos óxidos de colesterol do que o próprio colesterol na formação de placas ateroscleróticas (PENG & TAYLOR, 1984; HUBBARD *et al.*, 1989; KUMAR & SINGHAL, 1991). Desta forma a oxidação do colesterol é considerada um fator de risco para a saúde humana (NOVELLI *et al.*, 1998). Além de serem aterogênicos, os óxidos de colesterol estão associados a vários efeitos biológicos como mutagenicidade, carcinogenicidade, citotoxicidade, alteração das propriedades das membranas celulares e inibição da atividade da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) redutase (GUARDIOLA *et al.*, 1996; SEVANI & PETERSON, 1986; KUBOW, 1990; HUBBARD *et al.*, 1989).

No Brasil, existem poucos trabalhos integrados sobre colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em alimentos e inexistem trabalhos integrados com estes componentes e óxidos de colesterol. Foi encontrado apenas um trabalho sobre óxidos de colesterol em amostra de carne consumidas no Brasil (TORRES *et al.*, 1989) realizado, porém, nos Estados Unidos. SANDER *et al.* (1989) realizaram um trabalho sobre óxidos de colesterol em vários produtos alimentícios, entre os quais foram analisadas duas amostras de carne de peru liofilizada.

Sendo o colesterol predominante nos produtos de origem animal e considerando o seu alto consumo, a carne é um alimento que deve ser investigada. Embora seu teor de colesterol seja menor, quando comparada com ovos e frutos do mar, os teores de lipídios e gordura saturada são maiores. A oferta de carne de peru tem aumentado muito nos últimos anos com a suposta característica de apresentarem baixos teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos saturados. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar e validar uma metodologia para a determinação simultânea, por CLAE, de óxidos de colesterol e colesterol em carne de peru; e, determinar o teor de colesterol, óxidos de colesterol, lipídios totais e a composição de ácidos graxos em carne de peru.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDIS, P. B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. **Fd. Chem. Toxic.**, **24**: 1021, 1986.
- ANDERSON, J. T.; GRANDE, F. & KEYS, A. Cholesterol-lowering diets. **J. Amer. Diet. Assoc.**, **62**: 133, 1973.
- ANSARI, G. A. S.; WALKER, R. D.; SMART, V. B. & SMITH, L. L. Further investigations of mutagenic cholesterol preparation. **Food Chem. Toxicol.**, **20**: 35, 1982.
- FINOCCHIARO, E. T. & RICHARDSON, T. Sterol oxides in foodstuffs: a review. **J. Food Prot.**, **46**: 917, 1983.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P. B.; RAFECAS, M. & BOATELLA, Biological effects of oxysterols: current status. **Food Chem. Toxic.** **34**: 193, 1996.

- HUBBARD, R. W.; ONO, Y. & SANCHEZ, A. Atherogenic effect oxidized products of cholesterol. **Progr. Food Nutr. Sci.**, **13**: 17, 1989.
- IMAI, H.; WERTHESSEN, N. T.; SUBRAMANYAM, V.; LEQUESNE, P. W.; SOLOWAY, A. H. & KANISAWA, M. Angiotoxicity of oxygenated sterol and possible precursors. **Science**, **207**: 651, 1980.
- KANDUTSCH, A. A. & CHEN, H. W. Inhibition of cholesterol synthesis by oxygenated sterols. **Lipids**, **13**: 704, 1978.
- KEYS, A. Coronary heart disease in seven countries. **Circulation**. **41**: 1, 1970.
- KUBOW, S. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. **Trends Food Sci. Technol.**, **1**: 67, 1990.
- KUMAR, N. & SINGHAL, O. P. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. **J. Sci. Food Agric.**, **55**: 497, 1991.
- McNAMARA, D. J. Coronary heart disease. In: **Present knowledge in Nutrition** (Brown, M. L. Ed.), 349, 1990.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high blood cholesterol in adults. **Arch. Int. Med.**, **148**: 36, 1988.
- NOVELLI, E.; ZANARDI, E.; GHIRETTI, G. P.; CAMPANINI, G.; DAZZI, G.; MADARENA, G. & CHIZZOLINI, R. Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame milano and mortadella. **Meat Sci.**, **48**: 29, 1998.

- PENG, S. K. & TAYLOR, C. B. Cholesterol autoxidation, health and arteriosclerosis. A review on situations in developed countries. **Nutr. Diet.**, **44**: 117, 1984.
- PENG, S. K.; THAM, P.; TAYLOR, C. B. & MIKKELSON, B. Cytotoxicity of derivatives of cholesterol on cultured aortic smooth muscle cells and their effect on cholesterol bio-synthesis. **An. J. Clin. Nutr.**, **32**: 1033, 1979.
- REISER, R. Oversimplification of diet: coronary heart disease relationships and exaggerated diet recommendations. **Amer. J. Cli. Nutr.**, **31**: 865, 1978.
- SANDER, B. D.; ADDIS, P. B.; PARK, S. W. & SMITH, D. E. Quantification of holesterol oxidation products in a variety of foods. **J. Food Prot.**, **52**: 109, 1989.
- SEVANIAN, A. & PETERSON, A. R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. **Food Chem. Toxicol.**, **24**: 1103, 1986.
- SMITH, L. L. Cholesterol Autoxidation. **Chem. Physis. Lipids**, **44**: 87, 1987.
- TORRES, E.; PEARSON, A. M.; GRAY, J. I. & KU, P. K. Lipid oxidation in charqui (salted and dried beef). **Food Chem.**, **32**:257, 1989.

## **CAPÍTULO 1**

# **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA COLESTEROL E SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO**

**Trabalho a ser enviado ao Boletim da SBCTA**

## RESUMO

O colesterol é um importante constituinte dos alimentos de origem animal, o qual pode sofrer oxidação sob várias condições, principalmente durante o processamento e a estocagem. Esta revisão aborda basicamente os mecanismos de oxidação do colesterol e os métodos de análise para a determinação de óxidos de colesterol.

## SUMMARY

Cholesterol is an important constituent of food of animal origin which can be subject to oxidation under various conditions, mainly during processing and storage. This review discusses principally the mechanisms for cholesterol oxidation and the methods for the determination of cholesterol oxides.

## 1 – INTRODUÇÃO

O colesterol apresenta funções importantes no organismo, pois está presente em todas as membranas celulares, é a chave intermediária na síntese de ácidos biliares, hormônios e participa da síntese da vitamina D<sub>3</sub>.

O colesterol pode sofrer oxidação sob várias condições, como a exposição do mesmo ao ar, a temperaturas elevadas, iniciadores de radicais livres, luz ou à combinação destes (SMITH, 1987). Os principais óxidos de colesterol encontrados em alimentos são: 25-hidroxicolesterol, colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol, 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol e colestano-4,6-dien-3-ona (FINOCCHIARO & RICHARDSON, 1983).

Os produtos da oxidação do colesterol apresentam, possivelmente, um papel maior no desenvolvimento de placas ateroscleróticas do que o próprio colesterol (PENG & TAYLOR, 1984; HUBBARD *et al.*, 1989; KUMAR & SINGHAL 1991), bem como outros efeitos biológicos: citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, alterações nas propriedades das membranas celulares e inibição da atividade da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) redutase (GUARDIOLA *et al.*, 1996).

A determinação de óxidos de colesterol em produtos alimentícios pode ser realizada por uma variedade de metodologias, tais como: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Destas, a CLAE apresenta maior aplicação pela vantagem de ser realizada a frio, evitando assim a formação de artefatos. No entanto, esta análise não é uma tarefa muito fácil devido a necessidade de eliminação dos interferentes e da concentração dos óxidos na amostra, uma vez que quando presentes, encontram-se em pequenas quantidades.

O objetivo deste trabalho foi fazer uma breve revisão sobre os mecanismos de oxidação do colesterol e os métodos de análise para a determinação de óxidos de colesterol.

## 2 – COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTETOL

O colesterol é definido como um lipídio derivado ou lipídio esteróide e sua estrutura básica é a dos esteróis (Figura 1) conhecida como ciclopentanoperidrofenantreno. Esta nomenclatura é dada devido aos anéis 1, 2 e 3 que correspondem à estrutura dos fenantrenos e ao anel 4 que é um ciclopentano. A denominação peridro é devido a substituição do hidrogênio do carbono 3 por um grupo hidroxila. Os hidrogênios das posições 10 e 13 são substituídos por grupos metilas e o da posição 17 por um grupo R ( $C_8H_{17}$ ), o qual forma a cadeia lateral. O colesterol está presente em todas as membrans

celulares, é a chave intermediária na produção de ácidos biliares, hormônios sexuais masculinos e femininos, hormônios adrenocorticais e participa da síntese da vitamina D<sub>3</sub>. Porém, está relacionado com aterosclerose e doenças cardiovasculares (KEYS, 1970; ANDERSON *et al.*, 1973; REISER, 1978), que são a principal causa de morte no Brasil e em muitos outros países.

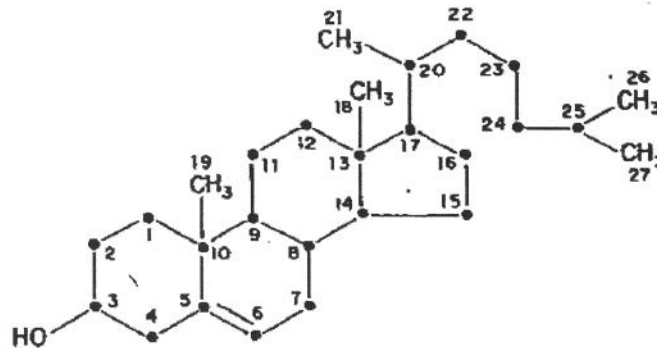


Figura 1. Estrutura do colesterol

O colesterol pode sofrer oxidação sob várias condições, como a exposição do mesmo ao ar, a temperaturas elevadas, iniciadores de radicais livres, luz ou à combinação destes (SMITH, 1987). Os principais óxidos de colesterol encontrados em alimentos são: 25-hidroxicolesterol, colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol, 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol e colestano-4,6-dien-3-ona (FINOCCHIARO & RICHARDSON, 1983).

Os produtos da oxidação do colesterol apresentam possivelmente um papel maior no desenvolvimento de placas ateroscleróticas do que o próprio colesterol (PENG & TAYLOR, 1984; HUBBARD *et al.*, 1989; KUMAR & SINGHAL 1991), bem como outros efeitos biológicos: citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, alterações nas propriedades das membranas celulares e inibição da atividade da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) redutase (GUARDIOLA *et al.*, 1996).

### 3 – AUTOXIDAÇÃO DO COLESTEROL

A autoxidação do colesterol é um processo de reações em cadeia, baseado na formação de radicais livres, idêntica à autoxidação dos lipídios insaturados (SMITH, 1987).

Relatos indicam que o estado físico do colesterol influencia nos tipos de produtos de oxidação que são formados (BERGSTROM & WINTERSTEINER, 1941; SMITH *et al.*, 1967; SMITH, 1987). Quando o colesterol está no estado cristalino (sólido) e na presença do ar, a reação de oxidação é dirigida para o arranjo cristalino. As moléculas de colesterol estão organizadas nas bicamadas celulares com os grupos 3-hidroxilas justapostos, expondo os sítios ativos. A autoxidação do colesterol em soluções aquosas de álcalis é muito mais rápida do que no colesterol esterificado com ácidos graxos, e esta é mais rápida quando submetida a altas temperaturas na presença do ar ou em solução com óleos e gorduras (SMITH, 1987).

A Figura 2 mostra as posições da molécula de colesterol que são mais susceptíveis ao ataque do oxigênio (SMITH, 1987). Os compostos predominantes são os originados a partir da oxidação do carbono C7, sendo eles: 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol; 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol; 7-cetocolésterol, colest-3,5-dien-7-ona e 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -colestanol. A oxidação dos carbonos terciários C20 e C25 da cadeia lateral do colesterol também pode ocorrer, originando o 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol e o 25-hidroxicolesterol, respectivamente. Dentre os óxidos de colesterol formados, nos alimentos e em sistemas biológicos, o 7-cetocolésterol é o de maior predominância, e os 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e colestanol são produzidos em menor proporção (KORAHANI *et al.*, 1982).

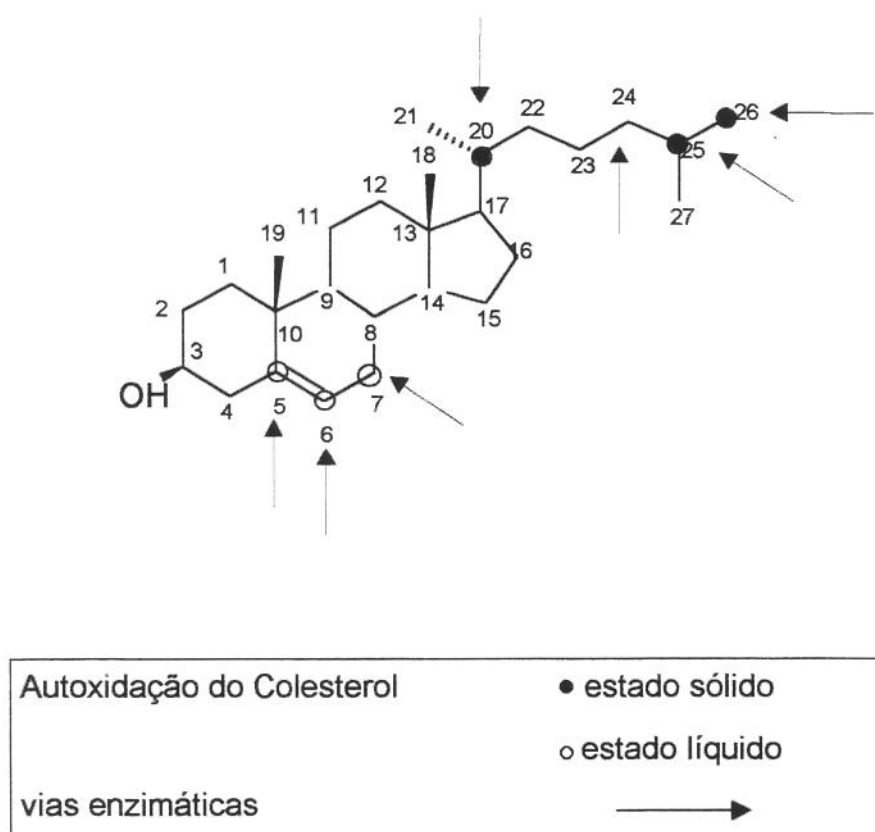


Figura 2 . Posições da molécula do colesterol susceptíveis ao ataque oxidativo.

As moléculas de colesterol são partes integrais da bicamada lipídica da membrana celular e estão associadas com os fosfolípidios. Como o colesterol contém uma dupla ligação no carbono C5, a formação de qualquer radical oxigênio ou radical livre pode iniciar a oxidação do mesmo (SMITH, 1987).

Os hidroperóxidos formados durante a oxidação lipídica dos ácidos graxos podem ser utilizados para a iniciação da oxidação do colesterol. O alto teor de ácidos graxos poliinsaturados presente nos alimentos pode causar a oxidação de espécies radicais dentro e fora das células. A oxidação lipídica é iniciada na superfície da membrana subcelular. A oxidação do colesterol em alimentos e sistemas biológicos pode ser intermolecular ou intramolecular. Em sistemas intermoleculares, o hidrogênio é extraído do colesterol por radicais peróxidos ou

óxidos dos ácidos graxos poliinsaturados (fosfolipídios) vizinhos na membrana celular. Em sistemas intramoleculares, a oxidação dos ácidos graxos ataca a porção colesteril das moléculas de éster de colesterol (SMITH, 1987).

O mecanismo de autooxidação do colesterol pode ser observado na Figura 3. A autooxidação do colesterol é um processo complexo, o qual corresponde à reação do radical 3 $\beta$ -hidroxicolesta-5-en-7-ila, situado sobre o carbono C7 da molécula do colesterol formado pela exposição do mesmo à radiação, com o oxigênio triplet ( $^3\text{O}_2$ ). O radical C7 peroxila é formado depois pela abstração de um hidrogênio, proveniente por exemplo do colesterol, o qual é transformado em 7 $\alpha$ - e 7 $\beta$ -hidroxiperoxicolesterol. Estes dois hidroperóxidos são os primeiros compostos identificados da oxidação do colesterol. Eles são formados simultaneamente, mas o 7 $\beta$ -hidroperóxido é predominante, porque é mais estável termodinamicamente (TENG *et al.*, 1973). Em seguida, eles são reduzidos a seus álcoois correspondentes (7 $\alpha$ - e 7 $\beta$ -hidroxicolesterol) e em 7-cetocolesterol (SMITH, 1987). Este último composto pode ser por sua vez degradado termicamente em colest-3,5-dien-7-ona (VAN LIER & SMITH, 1968). A reação do radical C25 (3 $\beta$ -hidroxicolesta-5-en-25-ila) com o oxigênio triplet ( $^3\text{O}_2$ ), conforme o mesmo mecanismo, origina o radical 3 $\beta$ -hidroxicolesta-5-en-25-peroxila que é em seguida transformado, pela retirada de um hidrogênio, em 25-hidroperoxicolesterol, que por sua vez se degrada termicamente em 25-hidroxicolesterol, como produto predominante. Outros hidroperóxidos originados a partir da cadeia lateral da molécula do colesterol tais como os 20 $\alpha$ - e 20 $\beta$ -, 24 $\alpha$ - e 24 $\beta$ -, 26 $\alpha$ - e 26 $\beta$ -hidroperóxidos são evidentes quando o colesterol é fortemente oxidado pelo ar. Estes compostos, por outro lado, têm a particularidade de se decomporem através da quebra da ligação  $\beta$  carbono-carbono da cadeia lateral, produzindo substâncias voláteis como acetona, ácido acético e esteróis (SMITH, 1987).

Os 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ - e 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxicolesterol (5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ - e 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi-5 $\alpha$ -colest-3 $\beta$ -ol) foram também identificados como produtos da oxidação do colesterol pelo ar, mas seu mecanismo de reação é mais complexo. Eles não são formados apenas pela reação do colesterol com o oxigênio triplet ( $^3\text{O}_2$ ), mas sobretudo com diferentes espécies de oxigênio ativas, tais como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radicais

hidroxilas ( $\text{OH}\bullet$ ), peroxilas ( $\text{ROO}\bullet$ ), alcóxilas ( $\text{RO}\bullet$ ) e ozônio ( $\text{O}_3$ ) (GUMULKA *et al.*, 1982). Os 5,6-epóxidos apresentam graus de estabilidade diferentes conforme o meio e o pH considerados (MAERKER & BUNICK, 1986; KIM & NAWAR, 1993). Podem ainda ser hidrolisados em  $3\beta,5\alpha,6\beta$ -colestanoetriol, considerado particularmente tóxico.

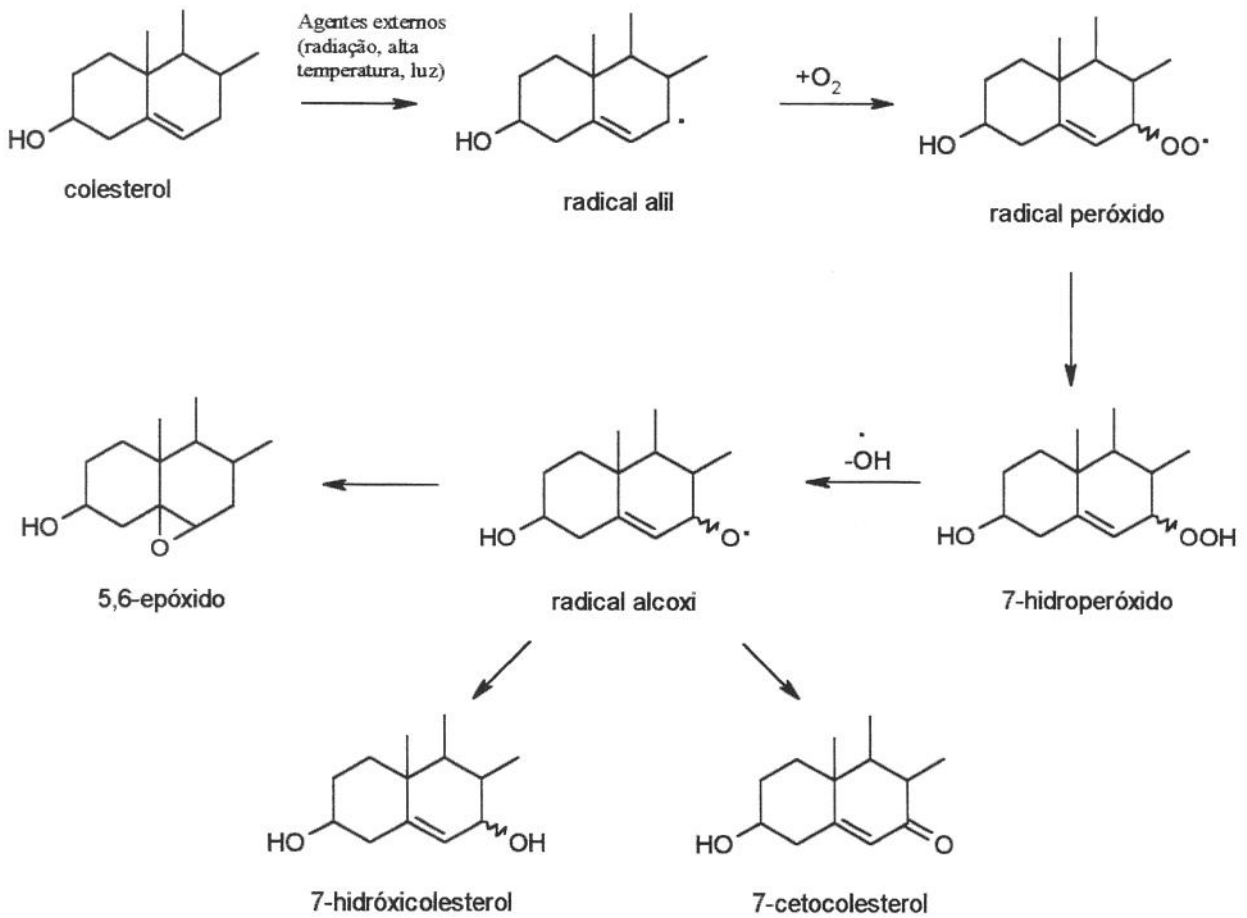


Figura 3. Mecanismo de autooxidação do colesterol.

Várias são as espécies ativas de oxigênio que podem desencadear as reações de iniciação da autooxidação do colesterol produzindo produtos da oxidação, os quais podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais produtos da oxidação do colesterol formados por diversas espécies ativas de oxigênio.

| Espécies ativas de oxigênio                             | Produtos iniciais da oxidação    | Produtos secundários da oxidação       |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|
| Ozônio (O <sub>3</sub> )                                | Ozonídeos                        | 3β,5α,6β-colestanotriol                |
|                                                         | Peroxiacetais                    |                                        |
| Oxigênio triplet ( <sup>3</sup> O <sub>2</sub> )        | 5α,6α- e 5β,6β-epoxicolesterol   | 7α- e 7β-hidroxicolesterol             |
|                                                         | 7α- e 7β-hidroperoxicolesterol   |                                        |
|                                                         | 20α- e 20β-hidroperoxicolesterol | 7-cetocolesterol                       |
|                                                         | 24α- e 24β-hidroperoxicolesterol | colesta-3,5-dien-7-ona                 |
|                                                         | 26α- e 26β-hidroperoxicolesterol | colesta-2,4,6-trieno                   |
|                                                         | 5α,6α- e 5β,6β-epoxicolesterol   | 20α- e 20β-hidroxicolesterol           |
| Oxigênio singlet ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )        | colesta-5-en-3-ona               | 24α- e 24β-hidroxicolesterol*          |
|                                                         |                                  | 24-cetocolesterol                      |
|                                                         |                                  | 25-hidroxicolesterol                   |
|                                                         |                                  | 26α- e 26β-hidroxicolesterol           |
|                                                         |                                  | 3β,5α,6β-colestanotriol                |
|                                                         |                                  | colesta-4-en-3-ona                     |
| Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 5α-hidroperoxicolesterol         | 7α-hidroperoxi- e 7α-hidroxicolesterol |
|                                                         | 6α- e 6β-hidroperoxicolesterol   | 3β-hidroxicolesta-4-en-6-ona           |
|                                                         |                                  | colesta-4-en-3,6-diona                 |
| Radical hidroxila (OH•)                                 | 5α,6α- e 5β,6β-epoxicolesterol   | 5α-colestan-3,6-diona                  |
|                                                         | 7α- e 7β-hidroxicolesterol       | 6α- e 6β-hidroxicolesterol             |
|                                                         | 7-cetocolesterol                 | colesta-2,4,6-trieno                   |
| Radicais peroxilas e alcóxilas (ROO•, RO•)              | derivados 5α,6α- e 5β,6β-epoxi-, | 3β,5α,6β-colestanotriol                |
|                                                         | 7α-hidroxi-, 7β-hidroxi- e 7-oxo | 3β,5α,6β-colestanotriol                |

\* Composto obtido por redução e não por degradação térmica. SMITH, (1987)

## 4 – MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL

Há uma grande variedade de metodologias para a determinação de óxidos de colesterol em produtos alimentícios, havendo discrepância nos resultados e a quantificação é também um grande desafio, especialmente em alimentos contendo baixos níveis destes compostos, pois o isolamento dos mesmos é frequentemente impedido pela quantidade de interferentes, tais como: colesterol, triacilglicerídios, fosfolipídios, etc. (McCLUSKEY & DEVERY, 1993).

Os óxidos de colesterol, formados por autooxidação do colesterol, e sua subsequente instabilidade requerem uma metodologia analítica branda para evitar a formação de artefatos, pois a presença do ar, luz, solventes contendo peróxidos ou tratamento térmico pode promover a formação de tais compostos (ROSE-SALIN *et al.*, 1995).

A separação dos produtos da oxidação do colesterol tem sido, anteriormente, realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) (ANSARI & SMITH, 1979). Esta técnica cromatográfica separa alguns compostos como os hidroxicolesteróis mas não os hidroperoxicolesteróis (TENG *et al.*, 1973). Além disso, há maior exposição das amostras à oxidação como resultado da grande área de superfície e da menor velocidade de eluição dos compostos (CSALLANY *et al.*, 1989).

Nos anos mais recentes, muitos trabalhos têm sido realizados usando a cromatografia gasosa (CG) para separar os óxidos de colesterol (FINOCCHIARO & RICHARDSON, 1983; MISSLER *et al.*, 1985; PARK & ADDIS, 1985, 1986a, 1986b, 1987; SANDER *et al.*, 1989; NOUROOZ-ZADEH, 1990; YAN & WHITE, 1990), embora eficiente para separar alguns produtos da oxidação do colesterol a CG pode também destruir termicamente o colesterol e os hidroperóxidos (FINOCCHIARO *et al.*, 1984; YAN & WHITE, 1990). A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-MS) é também uma técnica particularmente eficaz para a confirmação dos óxidos de colesterol (PARK & ADDIS, 1987; OSADA *et al.*, 1993; ROSE-SALIN *et al.*, 1995). Um outro método

cromatográfico bastante empregado é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ANSARI & SMITH, 1979; PENAZZI *et al.*, 1995), porém, a determinação simultânea dos óxidos de colesterol por CLAE é uma tarefa difícil porque estes compostos apresentam diferentes comprimentos de onda de absorção na luz ultravioleta (UV) e apresentam capacidade de resposta em diferentes sistemas de detecção. Alguns óxidos de colesterol de importância biológica como o 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol e o colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol não possuem características adequadas de absorção na luz UV (ANSARI & SMITH, 1979; SMITH, 1993; CSALLANY *et al.*, 1989), exigindo determinações mais complexas. Alguns autores têm utilizado detector de índice de refração, embora seja menos sensível que o UV (CHEN, 1994). Na Tabela 2 encontram-se relacionados alguns trabalhos utilizando CLAE. Observa-se que na maioria deles, independente do detector usado, a fase móvel foi de hexano/isopropanol para coluna de CN.

Chama atenção na literatura que os recentes trabalhos utilizam como técnica de análise CG-MS ou CLAE, sendo este seguido da confirmação com espectrometria de massas (ROSE-SALIN *et al.*, 1996; NIELSEN *et al.*, 1995; ROSE-SALIN *et al.*, 1995; PENAZZI *et al.*, 1995; OSADA *et al.*, 1993). Acredita-se que esta prática deva ser devido à dificuldade na confirmação dos compostos quando realizada apenas pelos tempos de retenção, espectros de absorvância e co-cromatografia.

Vários alimentos de origem animal processados, como produtos de carne (CSALLANY *et al.*, 1989; TORRES *et al.*, 1989; PIE *et al.*, 1991; MAHADEO *et al.*, 1992; MONAHAN *et al.*, 1992; HWANG & MAERKER, 1993; CHEN *et al.*, 1994), de ovos (BLACKWELDER & PIKE, 1990; PIE *et al.*, 1990; PRASAD & SUBRAMANIAN, 1992; LEBOVICS & GAÁL, 1992; FONTANA *et al.*, 1992; MORGAN & ARMSTRONG, 1992; PRZYBYLSKI *et al.*, 1993) e de leite ricos em gorduras (CHAN *et al.*, 1993; FINOCCHIARO *et al.*, 1984; McCLUSKEY *et al.*, 1997) foram relatados por conter vários óxidos de colesterol formados durante certas etapas do processamento.

Tabela 2. Determinação de óxidos de colesterol por CLAE.

| Referência                      | Material                 | Extração                                         | Limpeza                                                            | Fase Móvel                                  | Coluna                                    | Detector | Recuperação                                                                                                                       |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NIELSEN <i>et al.</i> , 1995    | Produtos lácteos         | clorofórmio/<br>metanol<br>(2+1)                 | Sep-Pak<br>heptano/<br>diclorometano/<br>isopropanol<br>(55+30+15) | hexano/<br>isopropanol<br>(95+5)            | CN<br>Fase Normal                         | IR       | 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol = 98%<br>7-cetocolesterol = 98%<br>colestanoltriol = 88%                                            |
| CSALLANY <i>et al.</i> , 1989   | Músculo e fígado         | clorofórmio/<br>metanol<br>(2+1)                 | Filtração em membrana                                              | hexano/<br>isopropanol<br>(97+3)            | $\mu$ -Porasil<br>(sílica)<br>Fase Normal | UV-206nm | 25-hidroxicolesterol = 93%<br>7-cetocolesterol = 88%<br>7 $\alpha$ -hidroxicolesterol = 87%<br>7 $\beta$ -hidroxicolesterol = 85% |
| CABONI <i>et al.</i> , 1997     | Gema de ovo em pó        | BLIGH <i>et al.</i> , 1959                       | Sep-Pak SPE<br>éter etílico                                        | hexano/<br>etanol anidro<br>(97+3)          | CN<br>Fase Normal                         | UV-210nm | NR                                                                                                                                |
| PENAZZI <i>et al.</i> , 1995    | Várias amostras          | FOLCH <i>et al.</i> , 1957                       | Sep-Pak<br>heptano/<br>isopropanol<br>(98+2)                       | hexano/<br>isopropanol<br>(93+7)            | $\mu$ -Porasil<br>(sílica)<br>Fase Normal | UV-210nm | 7-cetocolesterol = 99%                                                                                                            |
| CHEN <i>et al.</i> , 1994       | Banha                    | Sep-Pak<br>acetato de etila/<br>metanol<br>(1+1) | NR                                                                 | hexano/<br>isopropanol<br>(93+5)            | CN<br>Fase Normal                         | IR       | NR                                                                                                                                |
| ROSE-SALIN <i>et al.</i> , 1993 | Leite e produtos lácteos | SPE<br>isopropanol,<br>hexano                    | NR                                                                 | acetoneitrila/<br>etanol/água<br>(80+20+20) | C18<br>Nucleosil<br>Fase Reversa          | UV-206nm | NR                                                                                                                                |

NR = não referenciado ou não realizado

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J. T.; GRANDE, F. & KEYS, A. Cholesterol-lowering diets. **J. Amer. Diet. Assoc.**, **62**: 133, 1973.
- ANSARI, G. A. S. & SMITH, L. L. High-performance liquid chromatography of cholesterol autoxidation products. **J. Chromat.**, **175**: 307, 1979.
- BERGSTROM, S. & WINTERSTEINER, O. Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution. The nature of the products formed from cholesterol. **J. Biol. Chem.**, **141**: 597, 1941.
- BLACKWELDER, J. A. & PIKE, O. A. Oxidative stability of cholesterol-free egg lipid fractions. **J. Food Sci.**, **55**: 92, 1990.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extration and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, **37**: 911, 1959.
- CABONI, M. F.; COSTA, A.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; LERCKER, G. High performance liquid chromatographic separation of cholesterol oxidation products. **Chrom.**, **46**: 151, 1997.
- CHAN, S.; GRAY, J. I. & GOMAA, E. A. Cholesterol oxidation in whole milk powders as influenced by processing and packaging. **Food Chem.**, **47**: 321, 1993.
- CHEN, Y. C.; CHIU, C. P. & CHEN, B. H. Determination of cholesterol oxides in heated lard by liquid chromatography. **Food Chem.**, **50**: 53, 1994.

- CSALLANY, A. S., KINDOM, S. E., ADDIS, P. B. & LEE, J. HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Lipids**, **24**: 645, 1989.
- FINOCCHIARO, E. T. & RICHARDSON, T. Sterol oxides in foodstuffs: a review. **J. Food Prot.**, **46**: 917, 1983.
- FINOCCHIARO, E. T.; LEE, K. & RICHARDSON, T. Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butter oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **61**: 877, 1984.
- FOLCH, J. LESS, M. & STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, **226**: 497, 1957.
- FONTANA, A.; ANTONIAZZI, F.; CIMINO, G.; MAZZA, G.; TRIVELLONE, E. & ZANONE, B. High-resolution NMR detection of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk. **J. Food Sci.**, **57**: 869, 1992.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P. B.; RAFECAS, M. & BOATELLA, Biological effects of oxysterols: current status. **Food Chem. Toxic.** **34**: 193, 1996.
- GUMULKA, J.; PYREK, J. S. & SMITH, L. L. Interception of discrete oxygen species in aqueous media by cholesterol: formation of cholesterol epoxides and secosterols. **Lipids**, **17**: 197, 1982.
- HUBBARD, R. W.; ONO, Y. & SANCHEZ, A. Atherogenic effect oxidized products of cholesterol. **Progr. Food Nutr. Sci.**, **13**: 17, 1989.
- HWANG, K. T. & MAERKER, G. Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **70**: 371, 1993.

- KEYS, A. Coronary heart disease in seven countries. **Circulation**, **41**: 1, 1970.
- KIM, S. K. & NAWAR, W. W. Parameters influencing cholesterol oxidation. **Lipids**, **28**: 917, 1993.
- KORAHANI, V. B. J. & CRASTES DE PAULET, A. Autoxidation of cholesterol fatty acid esters in solid state and aqueous dispersion. **Lipids**, **17**: 703, 1982.
- KUMAR, N. & SINGHAL, O. P. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. **J. Sci. Food Agric.**, **55**: 497, 1991.
- LEBOVICS, V. K. & GAÁL, O. Cholesterol oxides in  $\gamma$ -irradiated spray-dried egg powder. **J. Sci. Food Agric.**, **60**: 252, 1992.
- MAERKER, G. & BUNICK, F. J. Cholesterol oxides II. Measurement of the 5,6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **63**: 771, 1986.
- MAHADEO, M.; UNKLESBAY, N.; CLARKE, A. D.; UNKLESBAY, K. & ELLERSIECK, M. Moist and dry convective heating and chilled storage of restructured beef roasts: effect on cholesterol and cholesterol oxide content. **Lebensm. Wiss. u. Technol.**, **25**: 412, 1992.
- McCLUSKEY, S. & DEVERY, R. Validation of chromatography analysis of cholesterol oxides in dried foods. **Trends Food Sci. Technol.** **4**: 175, 1993.
- McCLUSKEY, S.; CONNOLLY, J. F.; DEVERY, R.; O'BRIEN, B.; KELLY, J.; HARRINGTON, D. & STANTON, C. Lipid and cholesterol oxidation in whole milk powder during processing and storage. **J. Food Sci.**, **62**: 331, 1997.

- MONAHAN, F. J.; GRAY, J. I.; BOOREN, A. M.; MILLER, E. R.; BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A. & GOMAA, E. A. Influence of dietary treatment on lipid and cholesterol oxidation in pork. **J. Agric. Food Chem.** **40**: 1310, 1992.
- MORGAN, J.N. & ARMSTRONG, D.J. Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray-dried with direct heating. **J. Food Sci.**, **57**: 43, 1992.
- MISSLER, S. R.; WAISILCHUK, B. A. & MERRITT, C. Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparation. **J. Food Sci.**, **50**: 595, 1985.
- NIELSEN, J. H.; OLSEN, C. E.; DUEDAHL, C. & SKIBSTED, L. H. Isolation and quantitation of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. **J. Dairy Res.**, **62**: 101, 1995.
- NOUROOZ-ZADEH, J. Determination of the autoxidation products from free or total cholesterol: a new multistep enrichment methodology including the enzymatic release of esterified cholesterol. **J. Agric. Food Chem.**, **38**: 1667, 1990.
- OSADA, K.; KODAMA, T.; YAMADA, K. & SUGANO, M. oxidation of cholesterol by heating. **J. Agric. Food Chem.**, **41**: 1198, 1993.
- PARK, S. W. & ADDIS, P. B. Cappillary column gas liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. **Anal. Biochem.**, **52**: 275, 1985
- PARK, S. W. & ADDIS, P. B. Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivaties in heated tallow. **J. Agric. Food Chem.**, **34**: 653, 1986a.

- PARK, S. W. & ADDIS, P. B. Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. **J. Food Sci.**, **51**: 1380, 1986b.
- PARK, S. W. & ADDIS, P. B. Cholesterol oxidation products in some muscle foods. **J. Food Sci.**, **52**: 1500, 1987.
- PENAZZI, G.; CABONI, M. F.; ZUNIN, P.; EVANGELIST, F.; TISCORNIA, E.; TOSCHI, T. G. & LERCKER, G. Routine high-performance liquid chromatographic determination of free 7-ketocholesterol in some foods by two different analytical methods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **72**: 1523, 1995.
- PENG, S. K. & TAYLOR, C. B. Cholesterol autoxidation, health and arteriosclerosis. A review on situations in developed countries. **Nutr. Diet.**, **44**: 117, 1984.
- PIE, J. E.; SPAHIS, K. & SEILLAN, C. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. **J. Agric. Food Chem.**, **38**: 973, 1990.
- PIE, J. E.; SPAHIS, K. & SEILLAN, C. Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. **J. Agric. Food Chem.**, **39**: 250, 1991.
- PRASAD, C.R. & SUBRAMANIAN, R. Qualitative and comparative studies of cholesterol oxides in commercial and home-made Indian ghees. **Food Chemist.**, **45**: 71, 1992.
- PRZYBYLSKI, R.; ESKIN, N. A. M. & CULLIMORE, D. R. Transformation of egg cholesterol during bacterial fermentation. **Food Chem.**, **48**: 195, 1993.
- REISER, R. Oversimplification of diet: coronary heart disease relationships and exaggerated diet recommendations. **Amer. J. Clin. Nutr.**, **31**: 865, 1978.

- ROSE-SALLIN, C.; HUGGETT, A. C.; BOSSET, J. O.; TABACCHI, R. & FAY, L. B. Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [ $^2\text{H}_7$ ] cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. **J. Agric. Chem.**, **43**: 935, 1995.
- ROSE-SALIN, C.; BAUMANN, E.; BUTIKOFER, U.; SIEBER, R. & BOSSET, J. O. Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques RP-HPLC. **Trav. Chim. Aliment. Hyg.**, **84**: 141, 1993.
- ROSE-SALIN, C.; SIEBER, R.; BOSSET, J. O. & TABACCHI, R. Validation d'une méthode d'analyse permettant le dosage en parallèle du denrées alimentaires. **Trav. Chim. Aliment. Hyg.**, **87**: 137, 1996.
- SANDER, B. D.; ADDIS, P. B.; PARK, S. W. & SMITH, D. E. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. **J. Food Prot.**, **52**: 109, 1989.
- SMITH, L. L. Cholesterol Autoxidation. **Chem. Physis. Lipids**, **44**: 87, 1987.
- SMITH, L. L., MATTHEUS, W. S., PRICE, V. C., BACHMAN, R. C., RAYHOLDS, B. Thin-layer chromatographic examination of cholesterol autoxidação. **J. Chrom.** **27**: 187, 1967.
- SMITH, L. L. Analysis of oxysterols by liquid chromatography. **J. Liq. Chrom.** **16**: 1731, 1993.
- TENG, J. I.; KULIG, M. J.; SMITH, L. L.; KAN, G. & VAN-LIER, J. E. Sterol metabolism . XX. Cholesterol 7 $\beta$ -hydroperoxide. **J. Org. Chem.**, **38**: 119, 1973.

- 
- TORRES, E.; PEARSON, A. M.; GRAY, J. I. & KU, P. K. Lipid oxidation in charqui (salted and dried beef). **Food Chem.**, **32**:257, 1989.
- VAN LIER, J. E. & SMITH, L. L. Crystalline sterols obtained by gas chromatography. **J. Chrom.**, **36**: 7, 1968.
- YAN, P. S. & WHITE, P. J. Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. **J. AOCS.**, **67**: 927, 1990.

## **CAPÍTULO 2**

# **VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE, DE COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL EM CARNE DE PERU**

**Trabalho a ser enviado ao Journal AOAC**

---

## RESUMO

O colesterol é um importante constituinte dos produtos de origem animal sendo susceptível à oxidação. As metodologias mais utilizadas para a determinação de óxidos de colesterol em alimentos são a cromatografia em camada delgada, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). No presente trabalho foi otimizado e validado um método para a determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol por cromatografia líquida de alta eficiência. Inicialmente foram testados cinco métodos e oito condições cromatográficas. O método selecionado foi de acordo com SANDER *et al.* (1989), permitindo a determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol e maior economia de solventes, o qual apresentou as seguintes etapas: extração dos lipídios, saponificação a frio e extração da matéria insaponificável. As condições cromatográficas estabelecidas no presente trabalho foram: coluna Nova Pak CN HP (300 x 3,9mm, 4 $\mu$ m); fase móvel de hexano/isopropanol (96+4) e detector por conjunto de diodos fixado a 210nm. O método foi validado para carne de peru através da recuperação, repetibilidade, limite de detecção e limite de quantificação. A identificação do colesterol e óxidos de colesterol foi feita por comparação do tempo de retenção do padrão e o da amostra, espectros de absorvância e co-cromatografia, e a confirmação por espectros de massas. O método mostrou-se eficiente, exato e preciso, para o colesterol, colest-4,6-dien-3-ona, 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol.

## SUMMARY

Cholesterol is an important constituent of products of animal origin which is susceptible to oxidation. The analytical techniques most used to determine oxides of cholesterol in food are thin layer chromatography, gas chromatography and high performance liquid chromatography. In this work, a method to determine cholesterol and cholesterol oxides simultaneously by high performance liquid chromatography was optimized and validated. Initially five methods and eight chromatographic conditions were tested. The method of SANDER *et al.* (1989) was selected because it allowed the simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides with the least amount of solvents. The following stages were carried out: lipid extraction, cold saponification and extraction of unsaponifiable material. The chromatographic conditions established in this current work were: Nova Pak CN HP 300 x 3,9mm, 4 $\mu$ m column; hexane/isopropanol, 96+4, as mobile phase; diode array detector. The method was validated to turkey meat in terms of recovery, repeatability, detection limit and quantification limit. The cholesterol and cholesterol oxides were identified by the retention times compared with those of standards, spiking, and the UV spectra. The peak purity was ascertained by the UV spectra and confirmed by CG-MS. The method proved to be efficient, accurate and precise for cholesterol, cholesta-4,6-dien-3-one, 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol and, 7-ketocholesterol.

## 1 – INTRODUÇÃO

O colesterol é um importante constituinte dos produtos de origem animal, pois apresenta funções importantes no organismo. Está presente em todas as membranas celulares, é a chave intermediária na síntese de ácidos biliares, hormônios e participa da síntese da vitamina D<sub>3</sub>. Porém, está relacionado com aterosclerose e doenças cardiovasculares.

O colesterol é um lipídio insaturado muito susceptível à oxidação, levando à formação de vários produtos de oxidação. A autooxidação do colesterol pode ocorrer sob várias condições, como a exposição do mesmo ao ar, a temperaturas elevadas, iniciadores de radicais livres, luz ou à combinação destes (SMITH, 1987). Os principais óxidos de colesterol encontrados em alimentos são: 25-hidroxicolesterol, colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol, 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol e colestano-4,6-dien-3-ona (FINOCCHIARO & RICHARDSON, 1983).

Os produtos da oxidação do colesterol apresentam possivelmente um papel maior no desenvolvimento de placas ateroscleróticas do que o próprio colesterol (PENG & TAYLOR, 1984; HUBBARD *et al.*, 1989; KUMAR & SINGHAL 1991), bem como outros efeitos biológicos indesejáveis: citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, alterações nas propriedades das membranas celulares e inibição da atividade da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) redutase (GUARDIOLA *et al.*, 1996).

Há uma grande variedade de metodologias para a determinação de óxidos de colesterol em produtos alimentícios, no entanto, é observado discrepância nos resultados. A quantificação é também um grande desafio, especialmente em alimentos contendo baixos níveis destes compostos, pois o isolamento dos mesmos é frequentemente dificultado pela quantidade de interferentes, tais como: colesterol, triacilglicerídios, fosfolipídios, etc. (McCLUSKEY & DEVERY, 1993).

A separação dos produtos da oxidação do colesterol foi inicialmente realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) (ANSARI & SMITH, 1979).

Esta técnica cromatográfica separa alguns compostos como os hidroxicolesteróis mas não os hidroperoxicolesteróis (TENG *et al.*, 1973). Além disso, há maior exposição das amostras à oxidação como resultado da grande área de superfície e da menor velocidade de eluição dos compostos (CSALLANY *et al.*, 1989).

Recentemente, muitos trabalhos têm sido realizados usando cromatografia gasosa (CG) para separar os óxidos de colesterol (FINOCCHIARO & RICHARDSON, 1983; MISSLER *et al.*, 1985; PARK & ADDIS, 1985, 1986a, 1986b, 1987; SANDER *et al.*, 1989; NOUROOZ-ZADEH, 1990; YAN & WHITE, 1990). Embora tenha sido eficiente para separar alguns produtos da oxidação do colesterol, a CG pode também destruir termicamente o colesterol e os hidroperóxidos (FINOCCHIARO *et al.*, 1984; YAN & WHITE, 1990). A cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-MS) é também uma técnica particularmente eficaz para a confirmação dos óxidos de colesterol (PARK & ADDIS, 1987; OSADA *et al.*, 1993; ROSE-SALIN *et al.*, 1995). Um outro método cromatográfico bastante empregado é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ANSARI & SMITH, 1979; PENAZZI *et al.*, 1995), porém, a determinação simultânea dos óxidos de colesterol por CLAE é uma tarefa difícil, porque alguns compostos apresentam diferentes comprimentos de onda de absorção na luz ultravioleta (UV), enquanto outros óxidos de importância biológica como o 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol e o colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol não possuem características adequadas de absorção na luz UV (ANSARI & SMITH, 1979; SMITH, 1993; CSALLANY *et al.*, 1989), exigindo determinações mais complexas. Alguns autores têm utilizado detector de índice de refração, embora tenha menos sensibilidade que o UV (CHEN *et al.*, 1994).

A formação dos óxidos de colesterol por autooxidação do colesterol e sua subsequente instabilidade requer uma metodologia analítica branda para evitar a formação de artefatos. A presença do ar, luz, solventes contendo peróxidos ou tratamento térmico pode promover a formação de tais compostos (ROSE-SALIN *et al.*, 1995).

Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar e validar uma metodologia por CLAE para a determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol em

carne de peru. Esta não é uma tarefa fácil, considerando todos os cuidados que devem ser tomados durante as etapas analíticas para não haver formação de artefatos durante a análise.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Material e Reagentes

Para a validação e otimização do método, foram utilizadas amostras de peito e de coxa de peru. As amostras foram adquiridas em supermercados de Campinas e imediatamente analisadas, no período de março a julho de 1999. As amostras foram limpas e tiveram suas gorduras visíveis removidas. Foram então trituradas e homogeneizadas em multiprocessador até obtenção de uma massa homogênea. Subamostras de 50g foram tomadas para análises em duplicata.

O colesterol foi adquirido da Merck (Alemanha) e os óxidos de colesterol: colest-4,6-dien-3-ona, 20 $\alpha$ -hidroxicoesterol, 25-hidroxicoesterol, 7-cetocolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicoesterol, foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). O 7 $\alpha$ -hidroxicoesterol foi obtido da Steraloids Inc. (Wilton, EUA).

Todos os solventes usados para a extração e preparo da amostra foram grau P.A. e para análise cromatográfica foram grau cromatográfico, os quais foram filtrados e degaseificados em ultra-som antes do uso.

### 2.2 - Métodos

A extração dos lipídios foi realizada pelo método de FOLCH *et al.* (1957).

Para a determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol em carne de peru por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram testados vários métodos de saponificação e extração da matéria insaponificável.

Os procedimentos testados encontram-se nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5.

## MÉTODO 1

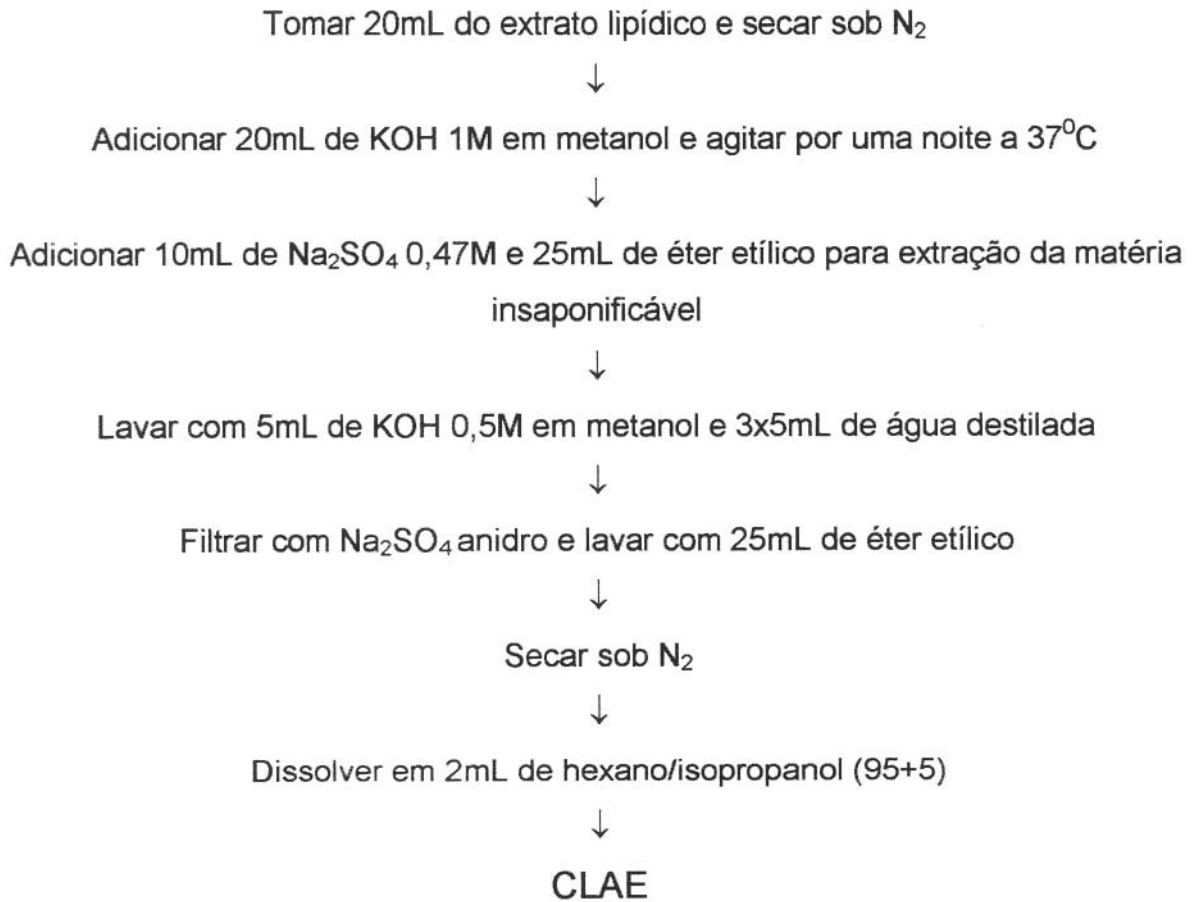


Figura 1. Fluxograma da determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol de acordo com o método de SARANTINOS *et al.* (1993).

## MÉTODO 2

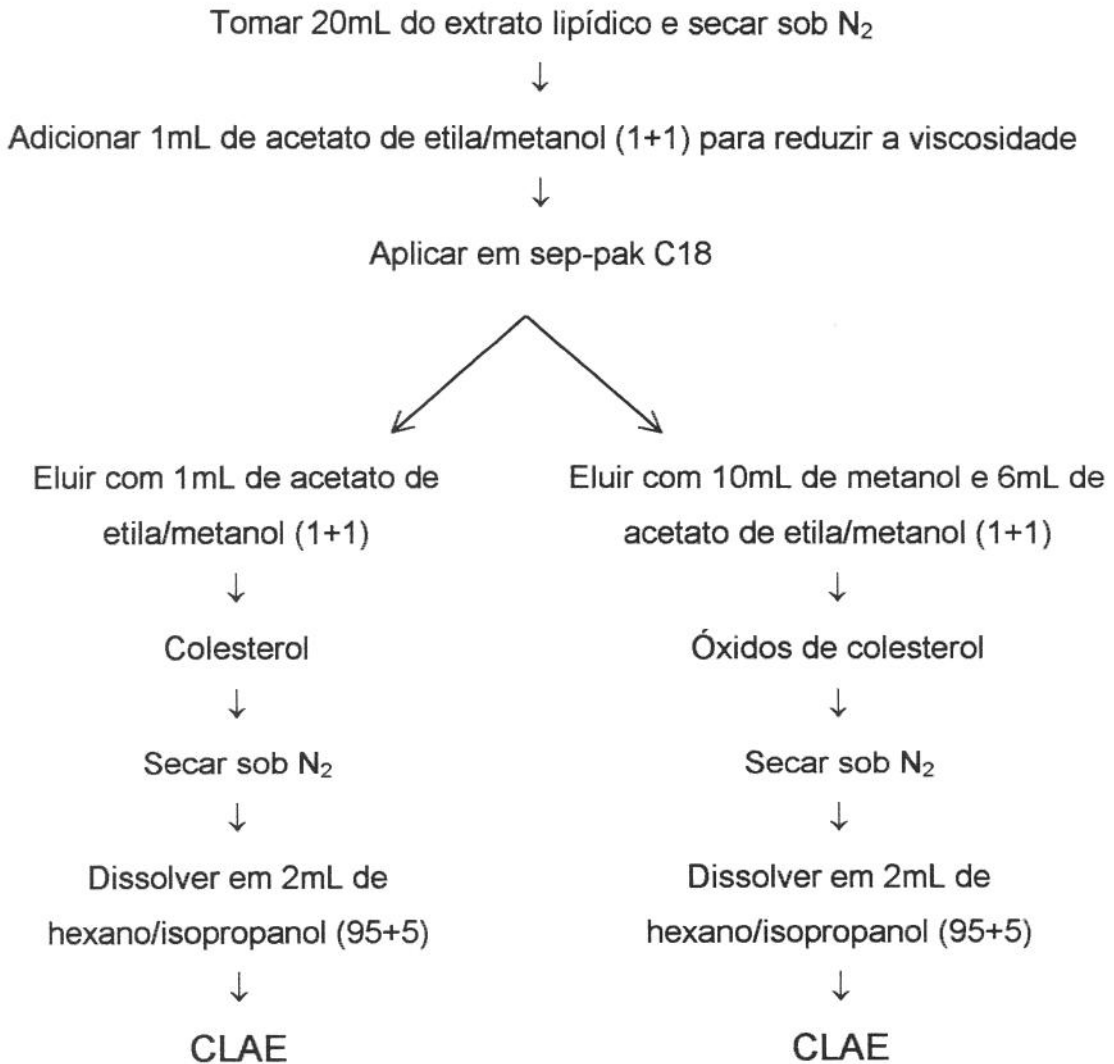


Figura 2. Fluxograma da determinação de colesterol e óxidos de colesterol de acordo com o método de CHEN *et al.* (1994).

### MÉTODO 3

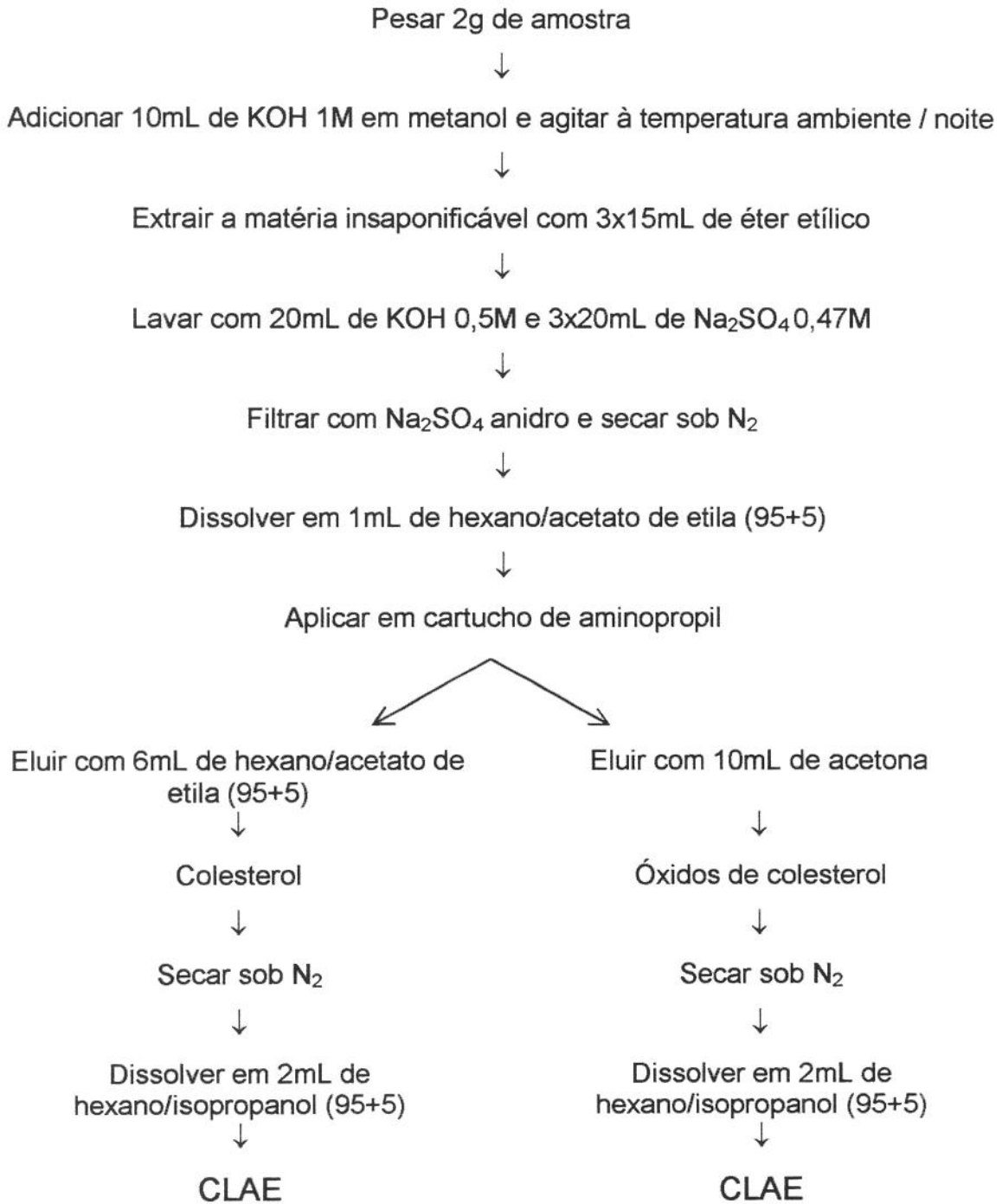


Figura 3. Fluxograma da determinação de colesterol e óxidos de colesterol de acordo com o método de PARK & ADDIS *et al.* (1986a).

## MÉTODO 4

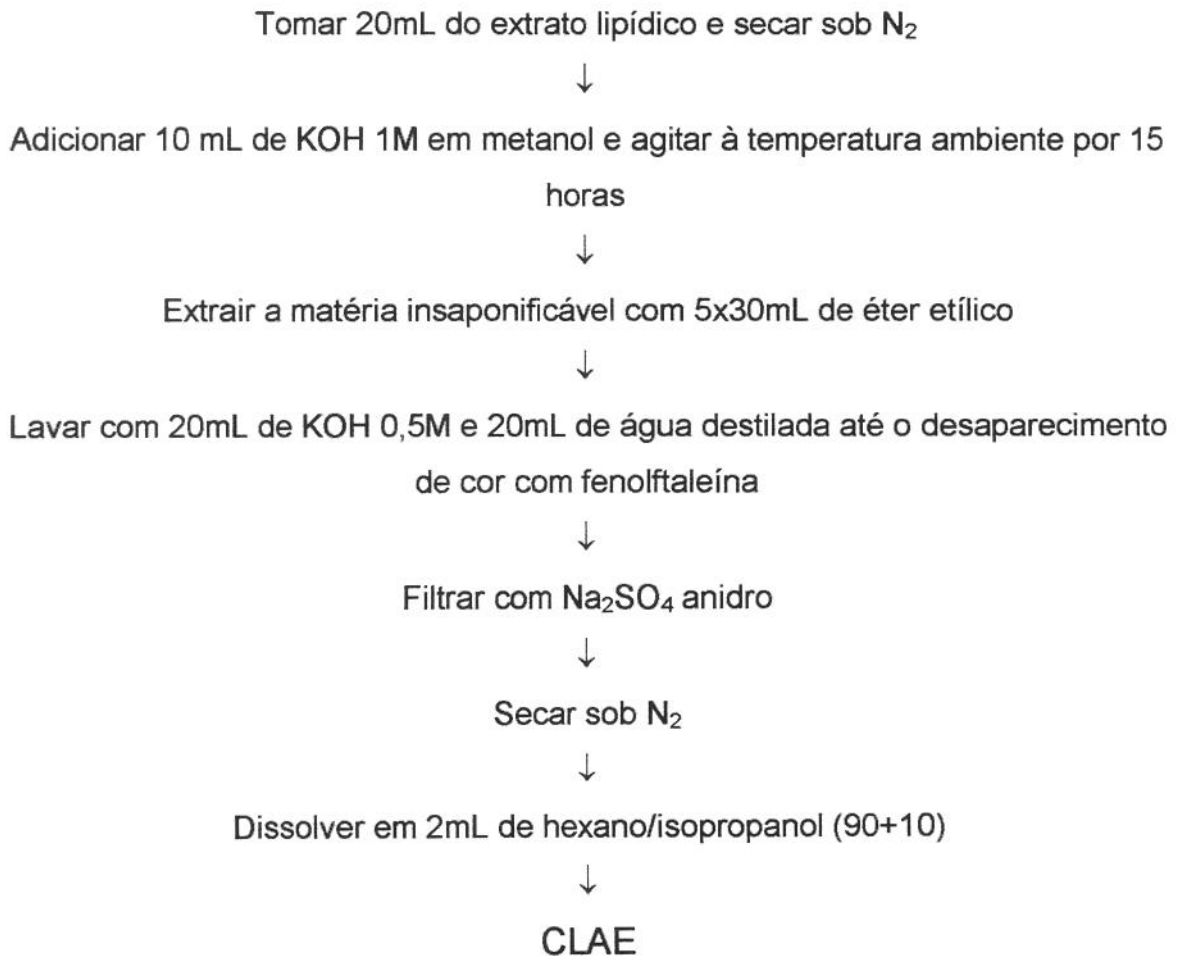


Figura 4. Fluxograma da determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol de acordo com o método de NOVELLI *et al.* (1998).

## MÉTODO 5

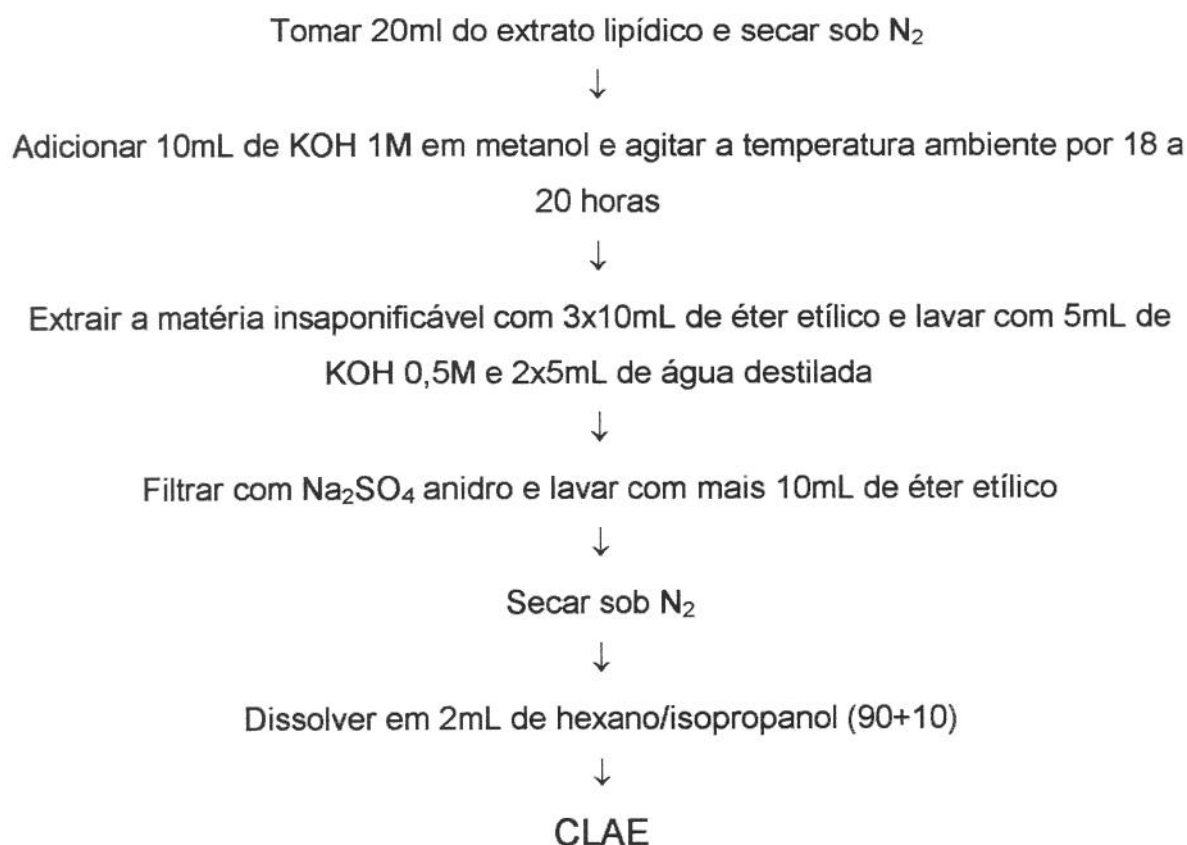


Figura 5. Fluxograma da determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol de acordo com SANDER *et al.* (1989).

Foram testadas também várias condições cromatográficas utilizando um cromatógrafo líquido (Schimadzu) com sistema binário de solventes (LAD 10), válvula "Rheodyne" com alça de amostragem de 20μL, detector por conjunto de diodos (M 10 A) e software (CLASS - LC 10). Os espectros de absorvância foram tirados entre 200 e 400nm e os cromatogramas foram registrados a 210nm.

As condições cromatográficas testadas estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas testadas.

| Condição | Coluna                                | Coluna de Guarda                  | Temp. da coluna (°C) | Fase móvel                       | Vazão (mL/min) |
|----------|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------|
| <b>a</b> | Microsorb C18 (Rainin) 100X4,6mm; 3µm | Sem                               | 35                   | acetonitrila/água (90+10)        | 1,5            |
| <b>b</b> | Lichrospher 100 RP 18, 125x4mm; 5µm   | Lichrospher 100 RP 18, 4x4mm; 5µm | 35                   | acetonitrila/isopropanol (70+30) | 0,8            |
| <b>c</b> | Lichrospher 100 RP 18, 125x4mm; 5µm   | Lichrospher 100 RP 18, 4x4mm; 5µm | 35                   | acetonitrila/isopropanol (82+18) | 1,2            |
| <b>d</b> | Lichrospher 100 RP 18, 250x4mm; 5µm   | Lichrospher 100 RP 18, 4x4mm; 5µm | 35                   | hexano/isopropanol (90+10)       | 1,5            |
| <b>e</b> | Lichrospher 100 RP 18, 250x4mm; 5µm   | Lichrospher 100 RP 18, 4x4mm; 5µm | 35                   | hexano/isopropanol (90+10)       | 1,0            |
| <b>f</b> | Lichrospher 100 RP 18, 250x4mm; 5µm   | Lichrospher 100 RP 18, 4x4mm; 5µm | 35                   | hexano/isopropanol (95+5)        | 1,0            |
| <b>g</b> | µ-Porasil (sílica) 250X4,6mm; 5µm     | Sem                               | 35                   | hexano/isopropanol (97+3)        | 1,0            |
| <b>h</b> | Nova Pak CN HP 300x3,9mm; 4µm         | Hypersil BDS CN, 7,5x4,6mm; 5µm   | 32,35 e 40           | hexano/isopropanol (96+4)        | 1,0            |

A identificação dos picos do colesterol e dos óxidos de colesterol foi feita por comparação dos tempos de retenção do padrão e o da amostra, por co-cromatografia e espectros de absorvância. Cromatogramas e espectros de absorvância característicos podem ser observados nas Figuras 1 a 12 do Anexo 1.

A confirmação da identidade de cada pico foi realizada por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-MS), usando um CG modelo HP 6890 acoplado a um MS HP 5973. A temperatura de interface foi de 320°C e a energia de impacto de elétrons foi de 70eV. Injetor splitless a 290°C, coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30m x 0,25mm; espessura do filme 0,25µm) com temperatura programada: temperatura inicial 110°C/2min, elevou-se para 235°C numa escala de 40°C/min, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, após elevou-se a temperatura a 310°C/5min numa escala de 1°C/min. O fluxo do gás de arraste (hélio) foi de 0,7mL/min. Os padrões de colesterol e de óxidos de colesterol e as amostras foram derivatizados de acordo com o método de SCHMARR *et al.* (1996).

A quantificação do colesterol e de seus produtos da oxidação foi feita por padronização externa. As curvas padrão encontram-se no Anexo 2.

A recuperação do método selecionado foi feita adicionando-se 80µg de colest-4,6-dien-3-ona, 20α-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol em carne de peito de peru.

O limite de detecção e o limite de quantificação para os óxidos de colesterol foram calculados de acordo com CHAIRMAN *et al.* (1983). A média do desvio padrão de dez repetições multiplicado por três é igual ao limite de detecção e multiplicado por dez é igual ao limite de quantificação.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a determinação simultânea por CLAE de colesterol e óxidos de colesterol em carne de peru, foi escolhido o método 5, de acordo com SANDER *et al.* (1989), que possui as seguintes etapas: extração dos lipídios de acordo com FOLCH *et al.* (1957), saponificação a frio e extração da matéria insaponificável com éter etílico. Este método foi o que apresentou melhor resultado, permitindo a determinação simultânea de colesterol e óxidos de colesterol e a utilização de um menor volume de solventes. A única modificação realizada no método foi a troca por uma alíquota maior do extrato lipídico, sendo 100mL para a asa e 50mL para as demais amostras. Nos métodos 2 e 3, que supostamente separa o colesterol e os óxidos de colesterol, nas condições testadas isto não ocorreu, verificando-se que não havia a separação total do colesterol bem como dos óxidos de colesterol. Além disso, para a determinação do colesterol e dos óxidos de colesterol seria necessário duas injeções no CLAE, o que consumiria muito tempo. Uma outra inconveniência observada no método 3 foi a pequena quantidade de amostra utilizada, dificultando a quantificação dos compostos da oxidação do colesterol, pois estes, quando formados, encontram-se em baixas concentrações. Nos métodos 1 e 4, embora muito parecidos entre si, e com o método escolhido, observou-se a formação de uma emulsão compacta dificultando a separação das fases. Uma outra desvantagem do método 4 foi o grande consumo de solventes.

Para a determinação simultânea por CLAE de colesterol e óxidos de colesterol, a condição cromatográfica que apresentou melhor resultado, ou seja, maior seletividade, resolução e eficiência foi usando uma coluna de guarda Hypersil BDS CN 7,5 x 4,6mm, 5 $\mu$ m; coluna Nova Pak CN HP, 300 x 3,9mm, 4 $\mu$ m (Watters, USA); temperatura da coluna de 32<sup>o</sup>C; fase móvel composta de hexano/isopropanol (96+4) com vazão de 1,0mL/min.

Os resultados para os testes de recuperação, limite de detecção e limite de quantificação realizados para os óxidos de colesterol pelo método inteiro, ou seja, extração dos lipídios segundo FOLCH *et al.* (1957), saponificação, extração da

matéria insaponificável e determinação por CLAE, encontram-se na Tabela 3. Observa-se também a repetibilidade do método através do coeficiente de variação.

Tabela 3. Taxas de recuperação, limite de detecção e limite de quantificação dos óxidos de colesterol em amostras de peito de peru pelo método estabelecido.

| Óxidos de colesterol adicionados (80µg) | n  | % Recuperação | DP   | % CV | Limite de Detecção (µg/g) | Limite de Quantificação (µg/g) |
|-----------------------------------------|----|---------------|------|------|---------------------------|--------------------------------|
| colesta-4,6-dien-3-ona                  | 10 | 82,75         | 0,08 | 0,03 | 0,24                      | 0,80                           |
| 20α-hidróxi-colesterol                  | 10 | 81,13         | 0,05 | 0,07 | 0,15                      | 0,50                           |
| 25-hidróxi-colesterol                   | 10 | 70,44         | 0,05 | 0,05 | 0,15                      | 0,50                           |
| 7-ceto-colesterol                       | 10 | 78,00         | 0,08 | 0,02 | 0,24                      | 0,80                           |

n = número de repetições

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

O resultado obtido para a recuperação do 7-cetocolesterol (78%) foi inferior aos valores obtidos por CSALLANY *et al.* (1989) e NIELSEN *et al.* (1995), os quais encontraram 88% e 98%, respectivamente. CSALLANY *et al.* (1989) encontraram uma recuperação de 93% para o 25-hidroxicolesterol. De acordo com estes autores, como a quantidade dos óxidos é muito pequena, altas recuperações podem não ser encontradas. CSALLANY *et al.* (1989) trabalharam em dois níveis de concentração, os quais variaram de 2,5 a 20µg, enquanto que NIELSEN *et al.* (1995) realizaram apenas um nível de concentração, sendo 40µg.

Os limites de detecção encontrados para os óxidos de colesterol no presente trabalho foram inferiores aos valores obtidos por ROSE-SALIN *et al.* (1993), cujos limites para o 20α-hidroxicolesterol e para o 25-hidroxicolesterol foram 1µg/g e para o 7-cetocolesterol 0,9µg/g. Valores maiores também foram obtidos por

CSALLANY *et al.* (1989), que encontraram para o 25-hidroxicolesterol, 2,2 $\mu$ g/g e para o 7-cetocolesterol, 0,38 $\mu$ g/g.

A repetibilidade do método foi excelente, com coeficiente de variação variando de 0,02 para o 7-cetocolesterol a 0,07% para o 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol. Esses resultados são inferiores aos obtidos por PENAZZI *et al.* (1995), os quais encontraram 3,9 e 3,7% para dois métodos utilizando CLAE. ROSE-SALIN *et al.* (1993) consideram que obtiveram boa repetibilidade com valores para coeficiente de variação de 0,5 a 1,2% nos compostos testados (25-hidroxicolesterol, 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, colestano-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol-6-ona, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol).

Através do conjunto de parâmetros: comparação dos tempos de retenção do padrão e o da amostra, co-cromatografia e espectros de absorvância, identificou-se o colesterol e os seguintes óxidos de colesterol: colestano-4,6-dien-3-ona, 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, e 7 $\beta$ -hidroxicolesterol. Nas amostras analisadas, apenas o colesterol, o 7-cetocolesterol e o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol foram confirmados por espectrometria de massas, os quais encontram-se nas Figuras 1, 2 e 3 do Anexo 3. Não foi possível quantificar o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol nas condições cromatográficas estabelecidas no presente trabalho.

Como o colesterol no método selecionado eluiu próximo ao pico do solvente, realizamos uma comparação entre duas condições cromatográficas (A e B). Sendo a condição A, a do próprio método, e a condição B, segundo BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA (1997), onde o colesterol eluiu separado de qualquer interferente. O método de acordo com BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA (1997), é rotineiramente utilizado no laboratório do Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada do Ital para a determinação de colesterol em diversas amostras, cujo limite de detecção é 0,3mg/100g. Este método foi validado utilizando-se o material padrão de referência de carne homogeneizada (SRM 1546) e o valor obtido foi de  $0,69 \pm 0,01$ g/Kg, semelhante ao valor declarado no certificado ( $0,750 \pm 0,072$ g/Kg).

Os resultados de colesterol obtidos nas duas condições cromatográficas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a nível de 5% e não apresentaram diferença significativa ( $p>0,05$ ), os quais estão relacionados na Tabela 2. Portanto, foi possível a determinação simultânea do colesterol e óxidos de colesterol pelo método escolhido neste trabalho.

Tabela 2. Comparação entre duas condições cromatográficas (A e B) para a determinação de colesterol (mg/100g), por CLAE, em carne de coxa e peito de peru.

| Amostra | A      | B       |
|---------|--------|---------|
| 1       | 24,6 a | 29,32 a |
| 2       | 27,8 a | 31,21 a |
| 3       | 26,9 a | 28,85 a |
| 4       | 17,5 a | 20,88 a |
| 5       | 25,8 a | 30,59 a |
| 6       | 26,3 a | 31,66 a |
| 7       | 23,6 a | 27,19 a |
| 8       | 28,5 a | 34,37 a |
| 9       | 23,6 a | 29,19 a |
| 10      | 21,6 a | 22,10 a |
| 11      | 27,5 a | 32,77 a |
| 12      | 23,5 a | 26,69 a |
| 13      | 23,5 a | 27,03 a |

A: (coluna Nova Pak CN HP, 300 x 3,9mm, 4 $\mu$ m; temperatura da coluna, 32<sup>o</sup>C; coluna de guarda, Hypersil BDS CN 7,5 x 4,6mm, 5 $\mu$ m; fase móvel, hexano/isopropanol (96+4); vazão, 1,0mL/min).

B: (coluna, Lichrospher 100 RP 18, 250 x 4mm, 5 $\mu$ m; temperatura da coluna, 35<sup>o</sup>C; coluna de guarda, Lichrospher 100 RP 18, 4 x 4mm, 5 $\mu$ m; fase móvel, acetonitrila/isopropanol (82+18); vazão, 1,2mL/min).

Valores na mesma linha com letras iguais não apresentaram diferença significativa ao nível de 5%.

## 4 – CONCLUSÃO

O método mostrou-se eficiente, exato e preciso, para o colesterol e seus óxidos: colest-4,6-dien-3-ona, 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSARI, G. A. S. & SMITH, L. L. High-performance liquid chromatography of cholesterol autoxidation products. **J. Chromat.**, **175**: 307, 1979.
- BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Otimização da determinação de colesterol por CLAE e teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em camarão rosa (*Panaeus brasiliensis*). **Ciênc. Tecnol. Alim.**, **17**: 275, 1997.
- CHAIRMAN, L. H. K.; CRUMMETT, W.; DEEGAN, J. J.; LIBBY, R.O.; TAYLOR, J. K. & WENTLER, G. Principles of Environmental Analysis. **Am. Chem. Soc.**, **55**: 2210, 1983.
- CHEN, Y. C.; CHIU, C. P. & CHEN, B. H. Determination of cholesterol oxides in heated lard by liquid chromatography. **Food Chem.**, **50**: 53, 1994.
- CSALLANY, A. S., KINDOM, S. E., ADDIS, P. B. & LEE, J. HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Lipids**, **24**: 645, 1989.
- FINOCCHIARO, E. T.; LEE, K. & RICHARDSON, T. Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butter oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **61**: 877, 1984.

- FINOCCHIARO, E. T. & RICHARDSON, T. Sterol oxides in foodstuffs: a review. **J. Food Prot.**, **46**: 917, 1983.
- FOLCH, J. LESS, M. & STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, **226**: 497, 1957.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P. B.; RAFECAS, M. & BOATELLA, Biological effects of oxysterols: current status. **Food Chem. Toxic.**, **34**: 193, 1996.
- HUBBARD, R. W.; ONO, Y. & SANCHEZ, A. Atherogenic effect oxidized products of cholesterol. **Prog. Food Nutr. Sci.**, **13**: 17, 1989.
- KUMAR, N. & SINGHAL, O. P. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. **J. Sci. Food Agric.**, **55**: 497, 1991.
- MCCLUSKEY, S. & DEVERY, R. Validation of chromatography analysis of cholesterol oxides in dried foods. **Trends Food Sci. Technol.**, **4**: 175, 1993.
- MISSLER, S. R.; WAISILCHUK, B. A. & MERRITT, C. Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparation. **J. Food Sci.**, **50**: 595, 1985.
- NIELSEN, J. H.; OLSEN, C. E.; DUEDAHL, C. & SKIBSTED, L. H. Isolation and quantitation of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. **J. Dairy Res.**, **62**: 101, 1995.
- NOVELLI, E.; ZANARDI, E.; GHIRETTI, G. P.; CAMPANINI, G.; DAZZI, G.; MADARENA, G. & CHIZZOLINI, R. Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame milano and mortadella. **Meat Sci.**, **48**: 29, 1998.

- NOUROOZ-ZADEH, J. Determination of the autoxidation products from free or total cholesterol: a new multistep enrichment methodology including the enzymatic release of esterified cholesterol. **J. Agric. Food Chem.**, **38**: 1667, 1990.
- OSADA, K.; KODAMA, T.; YAMADA, K. & SUGANO, M. Oxidation of Cholesterol by Heating. **J. Agric. Food Chem.**, **41**: 1198, 1993.
- PARK, S. W. & ADDIS, P. B. Cappillary column gas liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. **Anal. Biochem.**, **52**: 275, 1985
- PARK, S. W. & ADDIS, P. B. Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivaties in heated tallow. **J. Agric. Food Chem.**, **34**: 653, 1986a.
- PARK, S. W. & ADDIS, P. B. Fuerther investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. **J. Food Sci.**, **51**: 1380, 1986b.
- PARK, S. W. & ADDIS, P. B. Cholesterol oxidation products in some muscle foods. **J. Food Sci.**, **52**: 1500, 1987.
- PENAZZI, G.; CABONI, M. F.; ZUNIN, P.; EVANGELIST, F.; TISCORNIA, E.; TOSCHI, T. G. & LERCKER, G. Routine high-performance liquid chromatographic deteriination of free 7-ketocholesterol in some foods by two different analytical methods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **72**: 1523, 1995.
- PENG, S. K. & TAYLOR, C. B. Cholesterol autoxidation, health and arteriosclerosis. A review on situations in developed countries. **Nutr. Diet.** **44**: 117, 1984.
- ROSE-SALLIN, C.; HUGGETT, A. C.; BOSSET, J. O.; TABACCHI, R. & FAY, L. B. Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [ $^2\text{H}_7$ ] cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. **J. Agric. Chem.**, **43**: 935, 1995.

- ROSE-SALIN, C.; BAUMANN, E.; BUTIKOFER, U.; SIEBER, R. & BOSSET, J. O. Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques RP-HPLC. **Trav. Chim. Aliment. Hyg.**, **84**: 141, 1993.
- SANDER, B. D.; ADDIS, P. B.; PARK, S. W. & SMITH, D. E. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. **J. Food Protect.** **52**: 109, 1989.
- SARANTINOS, J.; O'DEA, K. & SINCLAIR, A. J. Cholesterol oxides in Australian foods identification and quantitation. **Food Australia.** **45**: 485, 1993.
- SCHMARR, H.; GROSS, H. B.; SHIBAMOTO, T. Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography. **J. Agri. Food Chem.**, **44**: 512, 1996.
- SMITH, L. L. Cholesteol Autoxidation. **Chem. Physis. Lipids.** **44**: 87, 1987.
- SMITH, L. L. Analysis of oxysterols by liquid chromatography. **J. Liq. Chrom.** **16**: 1731, 1993.
- TENG, J. I.; KULIG, M. J.; SMITH, L. L. ; KAN, G. & LIER, E. V. Sterol metabolism XX. Cholesterol 7 $\beta$ -hydroperoxide. **J. Org. Chem.**, **38**: 119, 1973.
- YAN, P. S. & WHITE, P. J. Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. **J. AOCS.**, **67**: 927, 1990.

## **CAPÍTULO 3**

# **ÓXIDOS DE COLESTEROL, COLESTEROL, LIPÍDIOS TOTAIS E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM CARNE DE PERU**

**Trabalho a ser enviado para Food Science**

## RESUMO

Foram determinados em carne de peru, a partir da mesma extração, os óxidos de colesterol, colesterol, lipídios totais e a composição de ácidos graxos, componentes alimentícios que influenciam no nível de colesterol sanguíneo. A carne de peru foi dividida em asa, coxa, peito e pele. A extração e a determinação do teor de lipídios foram realizadas de acordo com o método de FOLCH *et al.* (1957). O colesterol e os óxidos de colesterol foram determinados simultaneamente por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna CN (300 x 3,9mm, 4 $\mu$ m), detector por conjunto de diodos fixado a 210nm e como fase móvel hexano/isopropanol (96 + 4) a 1,0mL/min. A composição de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa com coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88 (50m x 0,25mm, 0,20 $\mu$ m de polietilenoglicol). Foram identificados dois óxidos de colesterol (7-cetocolesteol e 7 $\beta$ -hidroxicolesterol), sendo que o 7-cetocolesterol variou de  $0,33 \pm 0,03$  no peito a  $7,65 \pm 0,87\mu\text{g/g}$  na pele. Não foi possível quantificar o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol nas condições estabelecidas no presente trabalho. Os teores de lipídios totais (g/100g) e de colesterol (mg/100g) para a carne da asa, coxa, peito e pele foram  $0,9 \pm 0,4$  e  $46 \pm 5$ ;  $1,1 \pm 0,2$  e  $35 \pm 2$ ;  $0,5 \pm 0,1$  e  $27 \pm 3$ ;  $12 \pm 3$  e  $81 \pm 6$ , respectivamente. O peito apresentou menor teor de colesterol e lipídios totais, enquanto que a pele apresentou teores maiores. Os principais ácidos graxos identificados na asa, coxa e peito foram C18:2 $\omega$ 6, C18:1 $\omega$ 9, C16:0, C18:0 e C20:4 $\omega$ 6, e na pele, além destes, C16:1 $\omega$ 7. Os teores de ácidos graxos C15:0, C22:5 $\omega$ 3, C22:5 $\omega$ 6 e C22:6 $\omega$ 3 não apresentaram diferença significativa nas amostras analisadas, mas variações significativas foram observadas entre asa, coxa e peito, e principalmente em relação à pele.

## SUMMARY

Cholesterol oxides, cholesterol, total lipids and the composition of fatty acids, food components which influence the blood cholesterol level, were determined from the same extract of turkey meat. The wing, leg, breast and skin were separated. Extraction and determination of total lipid were carried out according to FOLCH *et al* (1957). The cholesterol and cholesterol oxides were determined simultaneously by high performance liquid chromatography (CN column; hexane/isopropanol, 96+4, as mobile phase; diode array detector) and the fatty acid composition by gas chromatography (SP-SIL 88 fused silica capillary column, H<sub>2</sub> as carrier gas, flame ionization detector). Two cholesterol oxides, 7-ketocholesterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, were identified by mass spectrometry, with 7-ketocholesterol varying from  $0,33 \pm 0,03$  in the breast and  $7,65 \pm 0,87 \mu\text{g/g}$  in the skin. It is not possible to quantify 7 $\beta$ -hydroxycholesterol in the present work. The total lipid (g/100g) and the cholesterol contents (mg/100g) for the wing, leg, breast and skin were  $0,9 \pm 0,4$  and  $46 \pm 5$ ;  $1,1 \pm 0,2$  and  $35 \pm 2$ ;  $0,5 \pm 0,1$  and  $27 \pm 3$ ;  $12 \pm 3$  and  $81 \pm 6$ , respectively. The breast presented lower and the skin higher total lipids and cholesterol content. The main fatty acids identified in the wing, leg and breast were C18:2 $\omega$ 6, C18:1 $\omega$ 9, C16:0, C18:0 and C20:4 $\omega$ 6 and, in the skin, C16:1 $\omega$ 7 as well. The fatty acids C15:0, C22:5 $\omega$ 3, C22:5 $\omega$ 6 e C22:6 $\omega$ 3 did not present a significant difference among the analysed samples, but variations were observed when comparing the wing, leg and breast, and especially the skin.

## 1 – INTRODUÇÃO

A relação entre dieta e saúde está amplamente difundida e os consumidores, cada vez mais, levam em consideração a qualidade dos produtos quando fazem sua opção de compra.

O colesterol é um esteroide largamente distribuído no reino animal, sendo um componente essencial das membranas celulares (SCHMARR *et al.*, 1996). É um álcool insaturado, insolúvel em água e susceptível à oxidação (BOSINGER *et al.*, 1993). A instabilidade do colesterol durante o armazenamento é conhecida desde 1900 (SCHULZE & WINTERSTEIN, 1904).

Alimentos com alto teor de colesterol, como, ovos e produtos com ovos; leite e seus derivados; carne e seus produtos processados; quando expostos ao ar, a temperaturas elevadas, luz, radiação ou à combinação destes fatores durante o processamento e o armazenamento podem ser importantes fontes de óxidos de colesterol na dieta (SMITH, 1987), que podem estar associados com o desenvolvimento de vários efeitos biológicos indesejáveis como aterogenicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, citotoxicidade e inibição da atividade da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) redutase (HUBBARD *et al.*, 1989). Estes compostos são possivelmente os iniciadores da formação de placas ateroscleróticas.

Doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no Brasil e em muitos outros países. Para minimizar esta situação, cardiologistas, clínicos gerais e nutricionistas recomendam uma dieta equilibrada, ou seja, com baixo teor de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos saturados e maior taxa de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados.

Os ácidos graxos saturados são considerados hipercolesterolêmicos, e os mais preocupantes, neste sentido, são mirístico, láurico e palmítico. O ácido esteárico tem função neutra, uma vez que no organismo se transforma imediatamente em ácido oléico (SINCLAIR, 1993). Dos ácidos graxos insaturados, merecem atenção os ácidos graxos *trans* oriundos do processamento e da

hidrogenação dos óleos e gorduras que são considerados mais aterogênicos que os saturados (LAMBERTSON, 1992). Os ácidos graxos poliinsaturados naturalmente *cis* são tidos como benéficos pois reduzem a agregação plaquetária, reduzem os triacilglicerídios e, conseqüentemente, reduzem o risco de doenças cardiovasculares (KINSELLA *et al.*, 1990).

A oferta de carne de peru tem aumentado muito nos últimos anos com a suposta característica de apresentar baixos teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos saturados. No entanto, há poucas informações sobre o conteúdo de colesterol, lipídios totais e composição de ácidos graxos em carne de peru, mesmo a nível internacional. Apenas um trabalho sobre óxidos de colesterol em carne de peru foi encontrado, porém, em carne liofilizada (SANDER *et al.*, 1989). Portanto, uma análise integrada de todos estes componentes foi realizada em carne de peru.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Material

Foram analisados cinco lotes com diferentes datas de validade de amostras compostas de carne de peru divididas em: asa, coxa, peito e pele. As datas de fabricação e validade dos lotes analisados encontram-se na Tabela 1. Cada lote foi representado por três unidades. As amostras foram adquiridas em supermercados de Campinas e imediatamente analisadas, no período de março a julho de 1999.

As amostras de carne de peru foram divididas, limpas e tiveram as gorduras visíveis removidas. Foram então trituradas e homogeneizadas em multiprocessador até obtenção de uma massa homogênea. Subamostras de 10g para asa e pele e de 50g para coxa e peito foram tomadas para análises em duplicata.

Tabela 1. Datas de fabricação e validade das amostras compostas de carne de peru analisadas.

| Amostra            | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Data de Fabricação | 23/11/98 | 07/10/98 | 16/10/98 | 07/12/98 | 10/09/98 |
| Data de Validade   | 23/05/00 | 07/04/00 | 16/04/00 | 07/06/00 | 10/03/00 |

## 2.2 – Métodos

Os lipídios foram extraídos como descrito por FOLCH *et al.* (1957). Alíquotas do mesmo extrato foram tomadas para a determinação simultânea de lipídios totais, por pesagem após a evaporação do solvente; óxidos de colesterol e colesterol, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); e, a composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa. Os três métodos estão sumariamente descritos na Figura 1.

### 2.2.1 – Determinação simultânea de óxidos de colesterol e colesterol

Alíquotas do extrato lipídico foram secas em rotaevaporador, saponificadas a frio e a matéria insaponificável foi extraída com éter etílico (SANDER *et al.*, 1989).

Utilizou-se um cromatógrafo líquido (Schimadzu) com sistema binário de solventes (LAD 10); válvula “Rheodyne” com alça de amostragem de 20µL; coluna de guarda Hypersil BDS CN 7,5 x 4,6mm, 5µm; coluna Nova Pak CN HP 300 x 3,9mm, 4µm; temperatura da coluna de 32°C; fase móvel composta de hexano/isopropanol (96+4) com vazão de 1,0mL/min; detector por conjunto de

diodos (M 10 A) e software (CLASS – LC 10). Os espectros de absorvância foram tirados entre 200 e 400nm e os cromatogramas foram registrados a 210nm.

Todos os solventes usados para a extração e preparo da amostra foram grau P. A. e para análise cromatográfica foram grau cromatográfico, os quais foram filtrados e degaseificados em ultra-som antes do uso.

A identificação dos picos do colesterol e dos óxidos de colesterol foi feita por comparação dos tempos de retenção do padrão e o da amostra, por co-cromatografia e espectros de absorvância.

A confirmação da identidade foi realizada por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-MS), usando um CG modelo HP 6890 acoplado a um MS HP 5973. A temperatura de interface foi de 320°C e a energia de impacto de elétrons foi de 70eV. Injetor splitless a 290°C, coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30m x 0,25mm; espessura do filme 0,25µm) com temperatura programada: temperatura inicial 110°C/2min, elevou-se para 235°C numa escala de 40°C/min, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, após elevou-se a temperatura a 310°C/5min numa escala de 1°C/min. O fluxo do gás de arraste (hélio) foi de 0,7mL/min. Os padrões de colesterol e óxidos de colesterol e as amostras foram derivatizados de acordo com o método de SCHMARR *et al.* (1996).

A quantificação do colesterol e de seus produtos da oxidação foi feita por padronização externa.

### 2.2.2 – Determinação da composição de ácidos graxos

Para a análise dos ácidos graxos, uma alíquota do extrato lipídico contendo aproximadamente 400mg de lipídios, foi seca em rotaevaporador. A saponificação e a metilação foram realizadas de acordo com o método de HARTMAN & LAGO (1973), usando solução de cloreto de amônia e ácido sulfúrico em metanol como reagente de esterificação.

A cromatografia gasosa, para a análise de ácidos graxos, foi realizada em cromatógrafo PHILIPS, modelo PU 4550, equipado com: injetor split, razão 100:1; coluna capilar CP-SIL 88, 50m de comprimento x 0,25mm de diâmetro interno e contendo 0,20µm de polietilenoglicol; detector por ionização em chama e uma work station com software BORWIN. As condições cromatográficas foram: temperatura da coluna, 180<sup>0</sup>C (isotérmica); gás de arraste, hidrogênio numa vazão de 2,25ml/min; gás "make-up", nitrogênio a 30ml/min; temperatura do injetor, 270<sup>0</sup>C; e temperatura do detector, 300<sup>0</sup>C.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada pelo uso em conjunto dos seguintes parâmetros: comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e padrões e co-cromatografia de padrões e amostras.

Cromatogramas característicos de cada amostra podem ser observados nas Figuras 1, 2, 3 e 4 do Anexo 4.

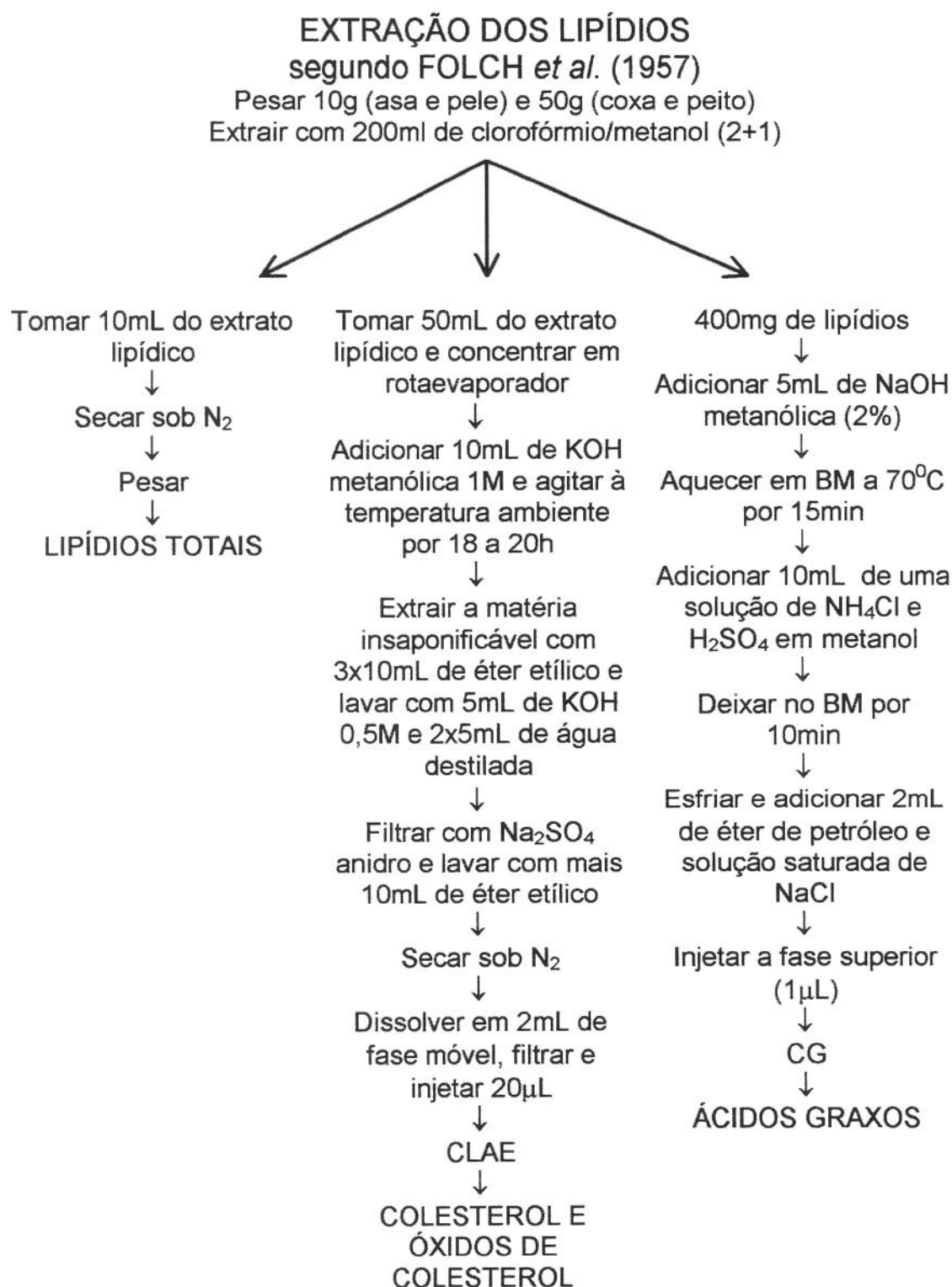


Figura 1. Fluxograma para determinação de lipídios totais, colesterol, óxidos de colesterol e ácidos graxos.

## 2.3 – Análise estatística

Para verificar as diferenças entre os cortes de peru (asa, coxa, peito e pele) os resultados obtidos para colesterol, lipídios totais e ácidos graxos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a nível de 5%.

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para colesterol e lipídios totais das amostras de carne de peru analisadas encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Teores de colesterol (mg/100g) e lipídios totais (g/100g) em carne de peru.

| Carne de Peru | Colesterol   | Lipídios Totais  |
|---------------|--------------|------------------|
|               | M $\pm$ DP*  | M $\pm$ DP*      |
| Asa           | 46 $\pm$ 5 b | 0,9 $\pm$ 0,4 bc |
| Coxa          | 35 $\pm$ 2 c | 1,1 $\pm$ 0,2 b  |
| Peito         | 27 $\pm$ 3 d | 0,5 $\pm$ 0,1 c  |
| Pele          | 81 $\pm$ 6 a | 12 $\pm$ 3 a     |

\* Média e desvio padrão de cinco amostras em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras iguais não apresentaram diferença significativa ao nível de 5%.

Houve diferença significativa no teor de colesterol entre os cortes de carne de peru analisados. A carne do peito de peru apresentou teor de colesterol significativamente menor ( $27 \pm 3$ mg/100g), enquanto que na pele foi maior ( $81 \pm 6$ mg/100g).

O teor obtido para coxa de peru ( $35 \pm 2$ mg/100g) foi semelhante ao encontrado por PALEARI *et al.* (1998), o qual foi de  $36,6 \pm 4,3$ mg/100g. Valores

maiores foram encontrados por WONG & SAMPUGNA (1993) que obtiveram  $54 \pm 0,5$  na carne branca,  $84 \pm 3,5$  na carne escura,  $87 \pm 0,5$  na pele e  $57 \pm 2,2$ mg/100g na gordura visível. As Tabelas de composição de alimentos também apresentam valores elevados de colesterol. De acordo com McCANCE & WIDDOWSON (1994), teores de 49 para carne branca e 81mg/100g para carne escura e, níveis de 85 para carne branca e 104mg/100g para carne escura, de acordo com FRANCO (1997).

O teor de lipídios totais variou de  $0,5 \pm 0,1$  no peito a  $12 \pm 3$ g/100g na pele. A carne da asa, da coxa e do peito não apresentaram diferença significativa no conteúdo de lipídios totais. Os valores obtidos foram menores que os encontrados na literatura. Na Tabela de McCANCE & WIDDOWSON (1994), teores de 1,1 na carne branca e 3,6g/100g na carne escura são referenciados. WONG & SAMPUGNA (1993) encontraram  $2,0 \pm 0,08$  na carne branca,  $5,1 \pm 0,04$  na carne escura,  $39,8 \pm 0,94$  na pele e  $68,1 \pm 1,11$ g/100g na gordura visível. PALEARI *et al.* (1998) relataram  $3,8 \pm 0,8$ g/100g para a coxa de peru. Valores maiores que estes estão na Tabela de FRANCO (1997), sendo 7,8 para carne magra e 13g/100g para carne semigorda.

O 7-cetocolesterol foi o óxido de colesterol presente em todas as amostras analisadas. Os resultados encontram-se na Tabela 3. Embora o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol não foi quantificado, esteve ausente em apenas dois lotes de peito e um lote de pele.

Tabela 3. Teor de 7-cetocolesterol ( $\mu$ g/g) em carne de peru.

| Corte | Amostra 1       | Amostra 2       | Amostra 3       | Amostra 4       | Amostra 5       |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|       | M $\pm$ DP*     | M $\pm$ DP*     | M $\pm$ DP*     | M $\pm$ DP*     | M $\pm$ DP*     |
| Asa   | $3,27 \pm 0,27$ | $2,10 \pm 0,17$ | $1,90 \pm 0,08$ | $3,65 \pm 0,44$ | $2,63 \pm 0,05$ |
| Coxa  | $0,87 \pm 0,05$ | $0,69 \pm 0,08$ | $4,92 \pm 0,20$ | $1,46 \pm 0,00$ | $1,61 \pm 0,11$ |
| Peito | $0,33 \pm 0,03$ | $2,06 \pm 0,12$ | $2,52 \pm 0,14$ | $0,65 \pm 0,00$ | $0,97 \pm 0,09$ |
| Pele  | $1,76 \pm 0,04$ | $5,93 \pm 0,48$ | $7,65 \pm 0,87$ | $2,67 \pm 0,05$ | $1,45 \pm 0,10$ |

\*Média e desvio padrão da determinação em duplicatas.

Diferentemente do teor de colesterol, o 7-cetocolesterol variou grandemente entre as amostras, sendo encontrado  $0,33 \pm 0,03$  no peito até  $7,65 \pm 0,87 \mu\text{g/g}$  na pele. Esta variação pode estar relacionada com possíveis alterações nas condições de estocagem das amostras antes de serem adquiridas e analisadas, as quais não se tem conhecimento.

SANDER *et al.* (1989) realizaram um trabalho sobre óxidos de colesterol em vários produtos alimentícios, entre os quais, foram analisadas duas amostras de carne de peru liofilizadas. Encontraram os seguintes óxidos de colesterol: 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol (6 e  $8 \mu\text{g/g}$ ), 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol (21 e  $7 \mu\text{g/g}$ ), 7 $\beta$ -hidroxicolesterol ( $18 \mu\text{g/g}$ ) e 7-cetocolesterol (8 e  $20 \mu\text{g/g}$ ). No presente trabalho, o maior teor de 7-cetocolesterol ( $7,65 \mu\text{g/g}$ ) foi semelhante ao menor valor encontrado por SANDER *et al.* (1989) ( $8 \mu\text{g/g}$ ). Os altos níveis detectados por SANDER *et al.* (1989) podem ser atribuídos às condições severas da liofilização. Em trabalhos realizados com outros tipos de carne, o 7-cetocolesterol foi o óxido de colesterol sempre presente. Por exemplo, CSALLANY *et al.* (1989) e LERCKER *et al.* (1993) encontraram em músculo cru de suínos, mantidos por 10 dias sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, 1,13 e  $1,1 \mu\text{g/g}$  de 7-cetocolesterol. RAO *et al.* (1996) obtiveram para carne crua de búfalo refrigerada sob  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $8,81 \mu\text{g/g}$  de 7-cetocolesterol no tempo zero;  $9,68 \mu\text{g/g}$  no tempo de 3 dias e  $10,07 \mu\text{g/g}$  no tempo de 6 dias de estocagem. Quando estocadas a  $-10^{\circ}\text{C}$  por um período de 30, 60 e 90 dias, encontraram 11,91, 12,26 e  $13,88 \mu\text{g/g}$ , respectivamente. KOWALE *et al.* (1996) detectaram 10,44, 11,93 e  $12,29 \mu\text{g/g}$  de 7-cetocolesterol em carne de carneiro crua refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$  num período de zero, 3 e 6 dias, respectivamente, e a  $-10^{\circ}\text{C}$ , 13,0, 14,18 e  $15,60 \mu\text{g/g}$  por um período de 30, 60 e 90 dias, respectivamente.

A Tabela 4 relaciona todos os ácidos graxos (mg/100g) encontrados nas amostras analisadas. Os principais ácidos graxos encontrados na asa, coxa e peito foram: C18:2 $\omega$ 6 ( $131,5 \pm 24,3$  no peito a  $290,1 \pm 46,6$  na coxa), C18:1 $\omega$ 9 ( $87,3 \pm 16,7$  no peito a  $236,5 \pm 48,8$  na coxa), C16:0 ( $98,0 \pm 16,8$  no peito a  $209,2 \pm 47,2$  na coxa), C18:0 ( $65,3 \pm 9,6$  no peito a  $138,1 \pm 25,1$  na coxa) e C20:4 $\omega$ 6

(44,3 ± 8,3 no peito a 76,6 ± 8,6 na coxa). Em relação à asa e à coxa, o peito apresentou teor do ácido graxo C16:0 maior que o C18:1 $\omega$ 9. A pele apresentou além destes, o C16:1 $\omega$ 7 como ácido graxo principal. A soma da média dos principais ácidos graxos representa aproximadamente 88% do total.

PALEARI *et al.* (1998) encontraram apenas três ácidos graxos como principais (C18:1 $\omega$ 9, C16:0 e C18:0), e WONG & SAMPUGNA (1993) relataram quatro (C18:1 $\omega$ 9, C18:2 $\omega$ 6, C16:0 e C18:0), sendo o C18:1 $\omega$ 9 o mais abundante. No presente trabalho, este ácido graxo foi encontrado em maior concentração apenas na pele.

A composição de ácidos graxos da pele, em geral, foi maior que a das carnes, apenas o ácido graxo C20:4 $\omega$ 6 apresentou maior teor na coxa, porém insignificante. Os ácidos graxos C15:0, C22:5 $\omega$ 3, C22:5 $\omega$ 6 e C22:6 $\omega$ 3 foram semelhantes aos das carnes. Entre as carnes, a maior diferença encontrada foi no peito, que apresentou teores de ácidos graxos C14:0 e C16:1 $\omega$ 7 menores e de C21:0 e C24:0 maiores. Os ácidos graxos C17:0 e C22:0 não apresentaram diferença significativa e não foram detectados na pele.

A porcentagem de ácidos graxos saturados variou de 31,6 na pele a 41,7% no peito, sendo o ácido graxo C16:0 encontrado em maior concentração, seguido do C18:0. Os ácidos graxos saturados são considerados hipercolesterolêmicos e os mais preocupantes são o ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0). Segundo HAYES *et al.* (1991), o C14:0 é o ácido graxo mais hipercolesterolêmico e o C16:0 é o menos. O ácido esteárico (C18:0) tem efeito neutro no nível de colesterol sanguíneo, uma vez que é rapidamente convertido em ácido oléico (C18:1 $\omega$ 9), um ácido graxo monoinsaturado considerado hipocolesterolêmico. A redução de ácidos graxos saturados é desejável porque estes ácidos, provenientes da dieta, elevam a concentração de colesterol no soro sanguíneo e de LDL (lipoproteína de baixa densidade) (SINCLAIR, 1993).

O teor de ácidos graxos saturados encontrado no presente estudo foi maior que os valores obtidos por WONG & SAMPUGNA (1993) e menor que os de PALEARI *et al.* (1998). Os teores de ácidos graxos monoinsaturados foram

semelhantes, e os teores de poliinsaturados foram ligeiramente menores que os obtidos por WONG & SAMPUGNA (1993). De acordo com SALES *et al.* (1996) a composição de ácidos graxos nas carnes de animais monogástricos, como no caso do peru, pode ser alterada pela dieta.

A porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados totais foi semelhante para a asa, coxa e peito, e menor na pele, sendo o C18:2 $\omega$ 6 o ácido graxo encontrado em maior quantidade, seguido do ácido araquidônico (C20:4 $\omega$ 6). A porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados totais foi praticamente a mesma para asa e coxa, apresentando em média 25%, sendo menor no peito (19,3%) e maior na pele (39,4%). Os teores de ácidos graxos  $\omega$ 3 variaram de 2,8 no peito a 114,8mg/100g na pele para o C18:3 $\omega$ 3, de 2,8 na coxa a 3,9mg/100g na pele para o C22:5 $\omega$ 3 e de 2,7 no peito a 3,2mg/100g na pele para C22:6 $\omega$ 3. O ácido graxo C20:5 $\omega$ 3 foi encontrado apenas na coxa (1,3mg/100g). Valores semelhantes foram encontrados por WONG & SAMPUGNA (1993).

A razão entre os ácidos graxos saturados e poliinsaturados, encontrada no presente trabalho, não apresentou diferença significativa entre as amostras analisadas, ficando em média 1,1. Este valor foi semelhante ao encontrado por WONG & SAMPUGNA (1993), 1,14. A razão  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 foi semelhante em todos os cortes analisados no presente trabalho.

A presença de ácidos graxos *trans* foi insignificante nas amostras analisadas. Apenas a coxa apresentou ácidos graxos *trans* do C18:1 $\omega$ 9 e C18:2 $\omega$ 6, em quantidades em torno de  $3 \pm 0,8$  e  $1,8 \pm 0,2$ mg/100g, respectivamente. O peito apresentou a forma *trans* somente do ácido graxo C18:1 $\omega$ 9 ( $0,8 \pm 0,5$ mg/100g). Surpreendentemente, WONG & SAMPUGNA (1993) encontraram ácidos graxos *trans* em todas as amostras analisadas e em quantidades elevadas, que atribuíram serem provenientes da ração dada aos perus. Obtiveram para o ácido graxo *trans* do C18:1 $\omega$ 9 valores de 2,1 na carne branca, 2,9 na carne escura e na pele, e 3,2g/100g na gordura visível; para o *trans* do C18:2 $\omega$ 6 encontraram 0,2 na carne branca, 0,3 na carne escura, e 0,5g/100g

na pele e na gordura visível. Em todas as amostras analisadas encontraram traços para o ácido graxo *trans* do C16:1 $\omega$ 7.

Comparando os valores obtidos no presente trabalho para lipídios, colesterol e ácidos graxos saturados, com os valores referenciados na Tabela de McCANCE & WIDDOWSON (1994) para carne branca de frango, observa-se que a carne de peru possui valores inferiores, onde os valores apresentados pelos autores são: 3,2g/100g de lipídios, 43mg/100g de colesterol e 1000mg/100g de ácidos graxos saturados. Quando comparados com dados nacionais de carne branca de frango de corte (MORAES *et al.*, 1987) e de caipira (AIDA *et al.*, 1985), os valores de lipídios totais, colesterol e ácidos graxos saturados foram semelhantes aos de peru. Por outro lado, os valores de colesterol encontrados na carne de peru foram menores que os encontrados em carne branca de frango, bovina e suína, cujos valores foram 50, 51 e 52mg/100g, respectivamente, de acordo com BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA (1992, 1993).

Tabela 4. Composição de ácidos graxos (mg/100g) em carne de peru.

| ÁCIDOS GRAXOS            | ASA<br>(M ± DP)* | COXA<br>(M ± DP)* | PEITO<br>(M ± DP)* | PELE<br>(M ± DP)* |
|--------------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| C10:0                    | 1,0 ± 0,2 b      | nd                | 0,4 ± 0,1 c        | 2,5 ± 0,8 a       |
| C12:0                    | 2,5 ± 0,5 b      | 1,6 ± 0,1 c       | nd                 | 5,8 ± 3,7 a       |
| C14:0                    | 6,6 ± 2,8 b      | 6,7 ± 2,2 b       | 2,4 ± 0,3 c        | 94,6 ± 23,6 a     |
| C15:0                    | 37,4 ± 10,2 a    | 35,6 ± 9,4 a      | 29,4 ± 5,9 a       | 39,8 ± 9,2 a      |
| C16:0                    | 182,5 ± 78,2 bc  | 209,2 ± 47,2 b    | 98,0 ± 16,8 c      | 2464,7 ± 616,5 a  |
| C17:0                    | 6,5 ± 2,8 a      | 10,7 ± 2,6 a      | 5,8 ± 3,2 a        | nd                |
| C18:0                    | 107,9 ± 36,9 bc  | 138,1 ± 25,1 b    | 65,3 ± 9,6 c       | 834,8 ± 222,0 a   |
| C21:0                    | nd               | 0,6 ± 0,1 c       | 1,0 ± 0,2 b        | 3,2 ± 0,9 a       |
| C22:0                    | 1,3 ± 0,3 a      | 1,5 ± 0,2 a       | 1,2 ± 0,1 a        | nd                |
| C24:0                    | nd               | nd                | 0,4 ± 0,2 a        | nd                |
| C14:1ω9                  | nd               | 1,2 ± 0,7 b       | 0,5 ± 0,2 c        | 11,5 ± 2,6 a      |
| C15:1ω6                  | nd               | nd                | nd                 | nd                |
| C16:1ω7                  | 21,9 ± 14,6 b    | 27,3 ± 6,8 b      | 5,7 ± 2,3 c        | 564,5 ± 146,1 a   |
| C18:1ω9t                 | nd               | 3,0 ± 0,8 a       | 0,8 ± 0,5 b        | nd                |
| C18:1ω9                  | 192,8 ± 105,5 bc | 236,5 ± 48,8 b    | 87,3 ± 16,7 c      | 3719,7 ± 890,1 a  |
| C20:1ω11                 | nd               | 1,4 ± 0,2         | nd                 | nd                |
| C22:1ω9                  | nd               | nd                | nd                 | nd                |
| C24:1ω9                  | nd               | nd                | nd                 | nd                |
| C18:2ω6                  | 224,6 ± 90,4 bc  | 290,1 ± 46,6 b    | 131,5 ± 24,3 c     | 2914,5 ± 500,3 a  |
| C18:2ω6t                 | nd               | 1,8 ± 0,2 b       | nd                 | 6,6 ± 5,9 a       |
| C18:3ω3                  | 6,3 ± 4,3 bc     | 9,1 ± 2,9 b       | 2,8 ± 0,6 c        | 144,8 ± 44,4 a    |
| C18:3ω6                  | nd               | 0,9 ± 0,1         | nd                 | nd                |
| C20:2ω6                  | 3,3 ± 1,3 b      | 2,8 ± 0,5 b       | 2,1 ± 0,5 b        | 18,9 ± 7,1 a      |
| C20:3ω6                  | nd               | nd                | nd                 | nd                |
| C20:4ω6                  | 55,8 ± 20,4 ab   | 76,6 ± 8,6 a      | 44,3 ± 8,3 c       | 67,2 ± 12,6 ab    |
| C20:5ω3                  | nd               | 1,3 ± 0,2         | nd                 | nd                |
| C22:4ω6                  | nd               | nd                | nd                 | nd                |
| C22:5ω3                  | 3,5 ± 1,4 a      | 2,8 ± 1,7 a       | 3,3 ± 0,8 a        | 3,9 ± 1,9 a       |
| C22:5ω6                  | 3,0 ± 1,9 a      | 3,9 ± 1,9 a       | 3,4 ± 0,7 a        | 3,4 ± 1,7 a       |
| C22:6ω3                  | 3,1 ± 1,6 a      | 3,0 ± 1,5 a       | 2,7 ± 0,7 a        | 3,2 ± 1,9 a       |
| SATURADOS                | 345,7 (40,2%)    | 404,0 (37,9%)     | 203,9 (41,7%)      | 3445,4 (31,6%)    |
| MONOINSA-<br>TURADOS     | 214,7 (25,0%)    | 269,4 (25,3%)     | 94,3 (19,3%)       | 4295,7 (39,4%)    |
| POLIINSATU-<br>RADOS     | 299,6 (34,8%)    | 392,3 (36,8%)     | 190,1 (39,0%)      | 3162,5 (29,0%)    |
| SATURADOS/<br>POLIINSAT. | 1,15             | 1,03              | 1,07               | 1,09              |
| TOTAL ω3                 | 12,9 (1,5%)      | 16,2 (1,5%)       | 8,8 (1,8%)         | 151,9 (1,4%)      |
| TOTAL ω6                 | 286,7 (33,7)     | 374,3 (35,1%)     | 181,3 (37,1%)      | 3004,0 (27,5%)    |
| ω3/ω6                    | 0,04             | 0,04              | 0,05               | 0,05              |

\* Média e desvio padrão de 5 amostras em duplicata.

nd = não detectado

Valores na mesma linha com letras iguais não apresentaram diferença significativa ao nível de 5%.

## 4 – CONCLUSÃO

A carne de peru apresentou baixo teor de lipídios totais, colesterol e ácidos graxos saturados, sendo uma boa alternativa para dietas que controlam o teor de colesterol sanguíneo. De todos os cortes de carne analisados, o peito foi o que apresentou os menores valores.

Dos produtos da oxidação do colesterol pesquisados, o 7-cetocolésterol e o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol estiveram presentes na maioria das amostras analisadas, apresentando grande variação entre os lotes com diferentes datas de validade.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDA, L. S.; WOSIACKI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. & MERCADANTE, A. Z. Caracterização da fração lipídica de tecidos de frango caipira. **Arq. Biol. Tecnol.**, **28**: 605, 1985.
- BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação comparativa de três métodos para determinação de colesterol em gema de ovo. **Arq. Biol. Tecnol.**, **36**: 237, 1993.
- BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de colesterol em carnes de frango. **Rev. Farm. Bioquím.**, **28**: 122, 1992.
- BOSINGER, S.; LUF, W. & BRANDL, E. Oxysterol: their occurrence and biological effects. **Int. Dairy Journal**, **3**: 1, 1993.
- FOLCH, J. LESS, M. & STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, **226**: 497, 1957.

- FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. 9ª ed., Editora Ateneu, 1997.
- HAYES, K. C.; PRONCZUK, A. LINDSEY, S. & DIERSEN-SCHADE, D. Dietary saturated fatty acids (12:0, 14:0, C16:0) differ in their impact on plasma cholesterol and lipoproteins in nonhuman primates. **Am. J. Clin. Nutr.**, **53**: 491, 1991.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, **22**: 475, 1973.
- HUBBARD, R. W.; ONO, Y. & SANCHEZ, A. Atherogenic effect oxidized products of cholesterol. **Progr. Food Nutr. Sci.**, **13**: 17, 1989.
- KINSELLA, J. E.; LOKESH, B. & STONE, R. A. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. **Am. J. Clin. Nutr.**, **52**: 1, 1990.
- KOWALE, B. N.; RAO, V. K.; BABU, N. P.; SHARMA, N. & BISHT, G. S. Lipid oxidation and cholesterol in mutton during cooking and storage. **Meat Sci.**, **43**: 195, 1996.
- LAMBERTSON, G. *Trans* fatty acids topic for Lipidforum. **Am. Oil Chem. Soc.**, **3**: 196, 1992.
- LERCKER, G.; CABONI, M. F. & CAPELLA, P. Oxisterols in foods. **Riv. Ital. Sostanze Grasse**, **70**: 579, 1993.
- McCANCE, R. A. & WIDDOWSON, E. M. **The Composition of Foods**. 5 ed. Richard Chy Ltd, Bungay, Suffolk, 1994.

- McCANCE, R. A. & WIDDOWSON, E. M. **The Composition of Foods**. 5 ed. Richard Chy Ltd, Bungay, Suffolk, 1994.
- MORAES, M. C. S.; BARROSO, M. A. T.; ZAPATA, J. F. F. & FUENTES, M. F. F. Estudo comparativo da gordura de capote, galinha caipira e frango-de-granja. **Bol. SBCTA**, **21**: 15, 1987.
- PALEARI, M. A. *et al.* Ostrich meat: physico-chemical characteristics and comparision with turkey and bovine meat. **Meat Sci.**, **48**: 205-210, 1998.
- RAO, V. K.; KOWALE, B. N.; BABU, N. P. & BISHT, G. S. Effect of cooking and storage on lipid oxidation and development of cholesterol oxidation products in water buffalo meat. **Meat Sci.**, **43**: 179, 1996.
- SALES, J.; MARAIS, D. & KRUGER, M. Fat content, caloric value, cholesterol content, and fatty acid composition of raw and cooked ostrich meat. **J. Food Comp. Anal.**, **9**: 85, 1996.
- SANDER, B. D.; ADDIS, P. B.; PARK, S. W. & SMITH, D. E. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. **J. Food Protect**, **52**: 109, 1989.
- SCHMARR, H. G.; GROSS, H. B. & SHIBAMOTO, T. Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, **44**: 512, 1996.
- SCHULZE, E. & WINTERSTEIN, E. Uber das verhalten des cholesterins gegen light (on the behaviour of cholesterol exposed to light). **Z. Physiol. Chem.**, **43**: 316, 1904.

---

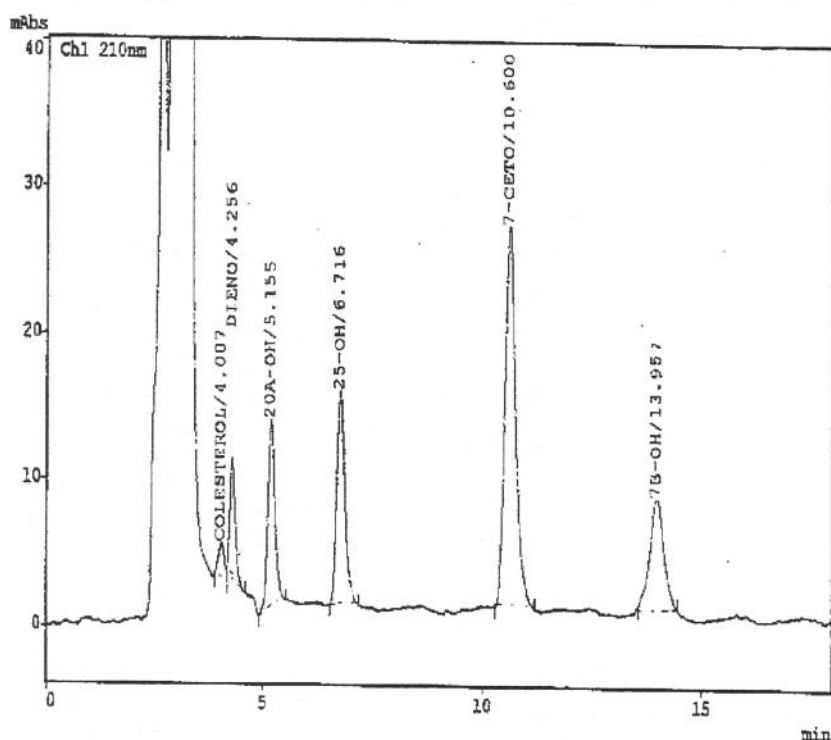
SMITH, L. L. Cholesterol Autoxidation. **Chem. Physis. Lipids**, **44**: 87, 1987.

WONG, M. K.; SAMPUGNA, J. Moisture, total lipids, fatty acids and cholesterol in raw ground turkey. **J. Agri. Food Chem.**, **41**: 1229-1231, 1983

# **ANEXOS**

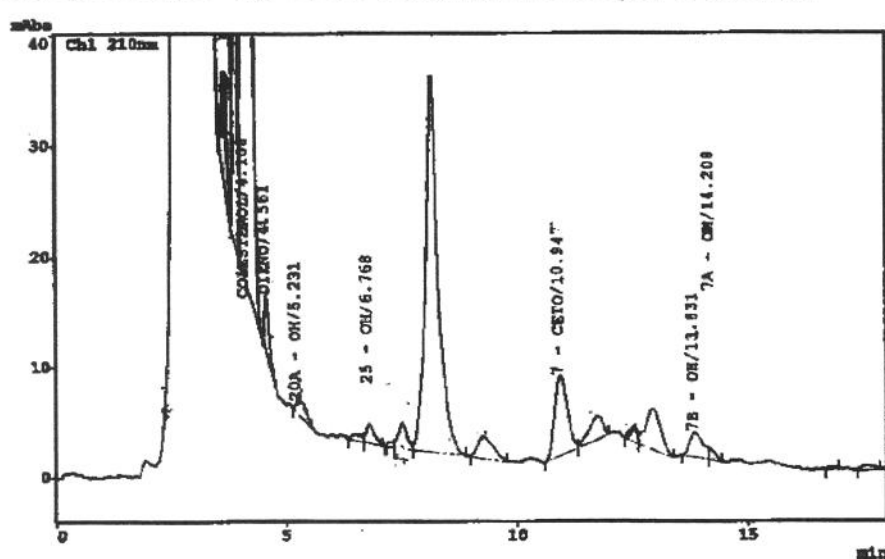
## Anexo 1

### Cromatogramas do colesterol e dos óxidos de colesterol



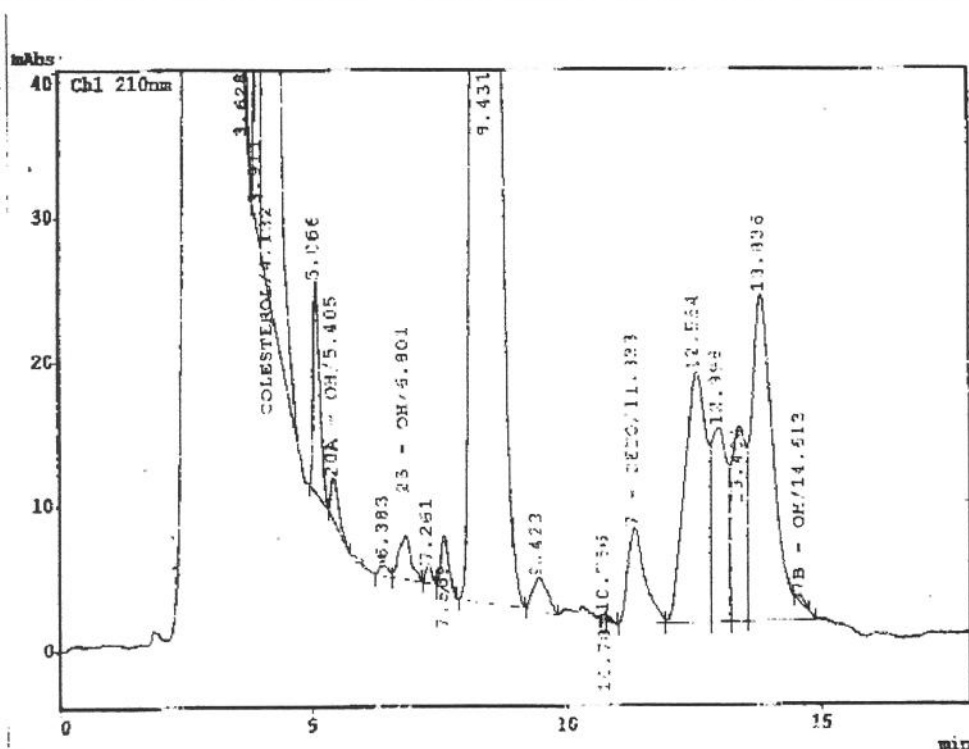
**Fig. 1 – Cromatograma característico dos padrões de colesterol e de óxidos de colesterol, obtidos pelo detector por conjunto de diodos.**

**Condições cromatográficas:** coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min. Detecção a 210nm.



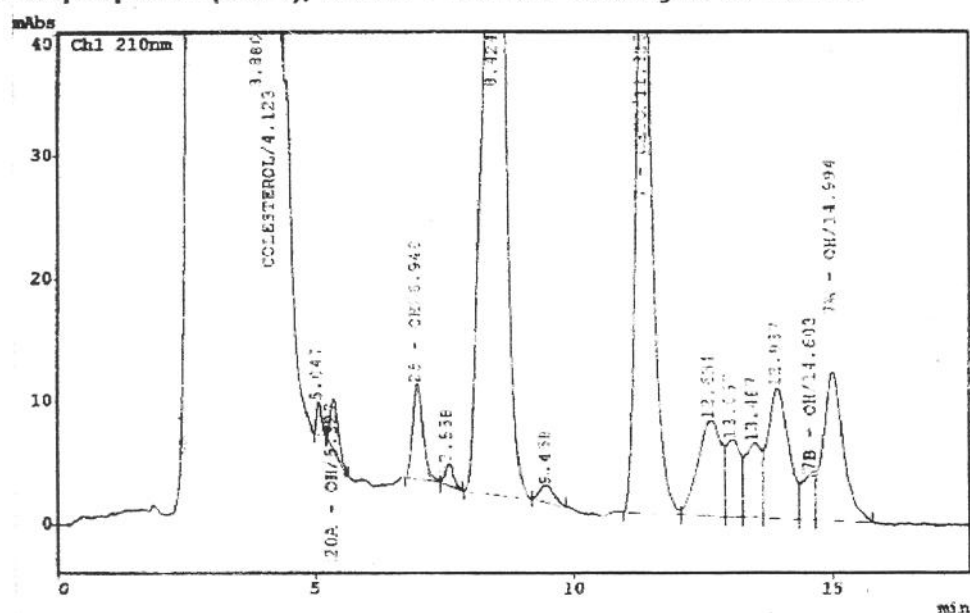
**Fig. 2 – Cromatograma característico de colesterol e óxidos de colesterol em asa de peru, obtidos pelo detector por conjunto de diodos.**

**Condições cromatográficas:** coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min. Detecção a 210nm.



**Fig. 3 – Cromatograma característico de colesterol e óxidos de colesterol em coxa de peru, obtidos pelo detector por conjunto de diodos.**

**Condições cromatográficas: coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min. Detecção a 210nm.**



**Fig. 4 – Cromatograma característico da co-cromatografia de colesterol e óxidos de colesterol em coxa de peru, obtidos pelo detector por conjunto de diodos.**

**Condições cromatográficas: coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min. Detecção a 210nm.**

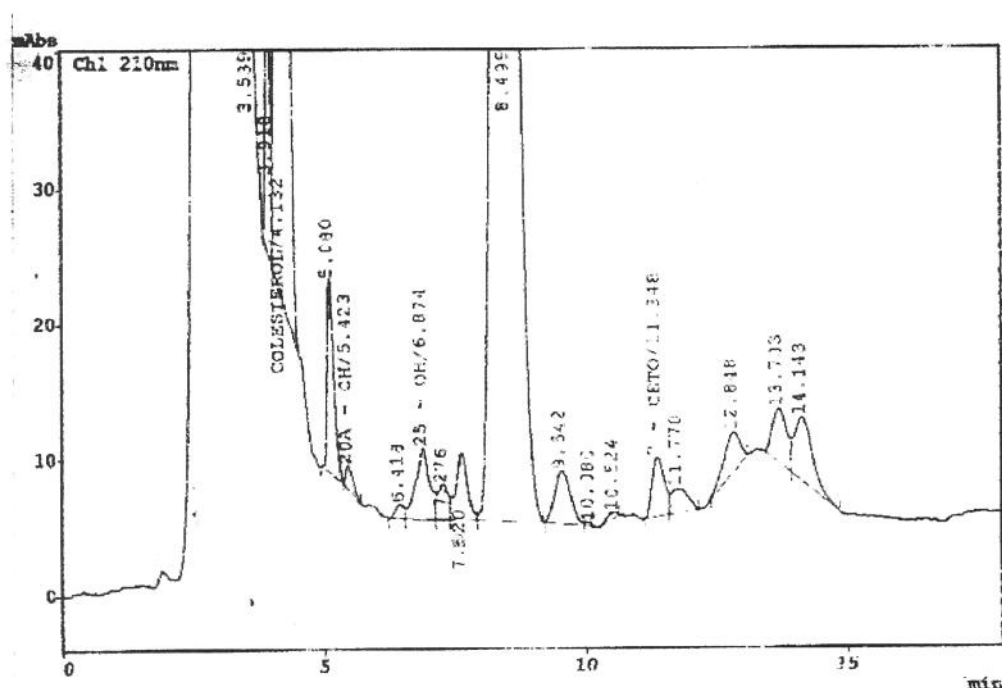


Fig. 5 – Cromatograma característico de colesterol e óxidos de colesterol em peito de peru, obtidos pelo detector por conjunto de diodos.

Condições cromatográficas: coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min. Detecção a 210nm.

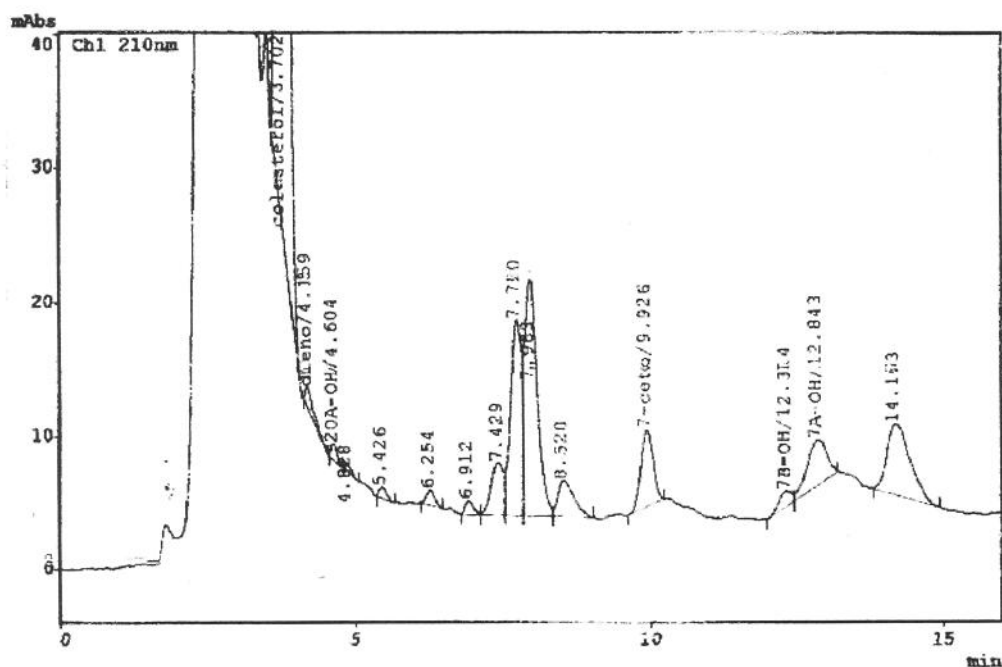
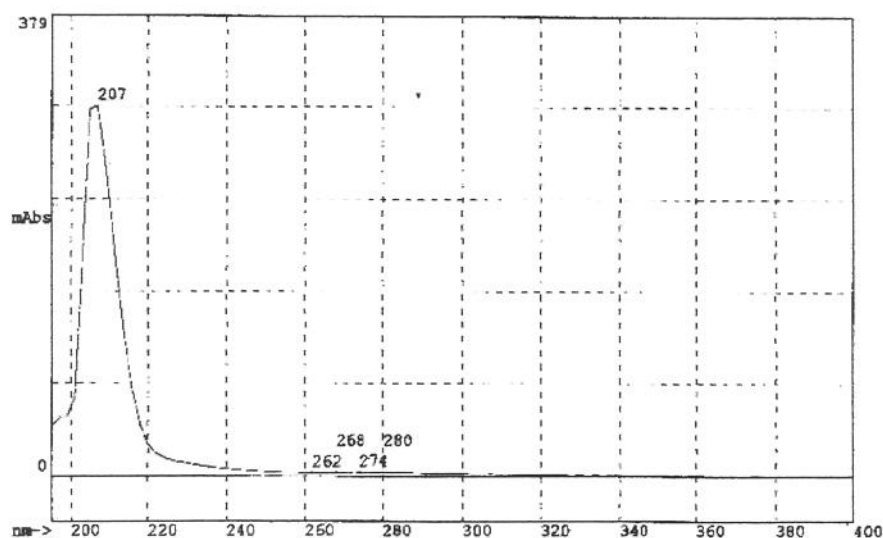


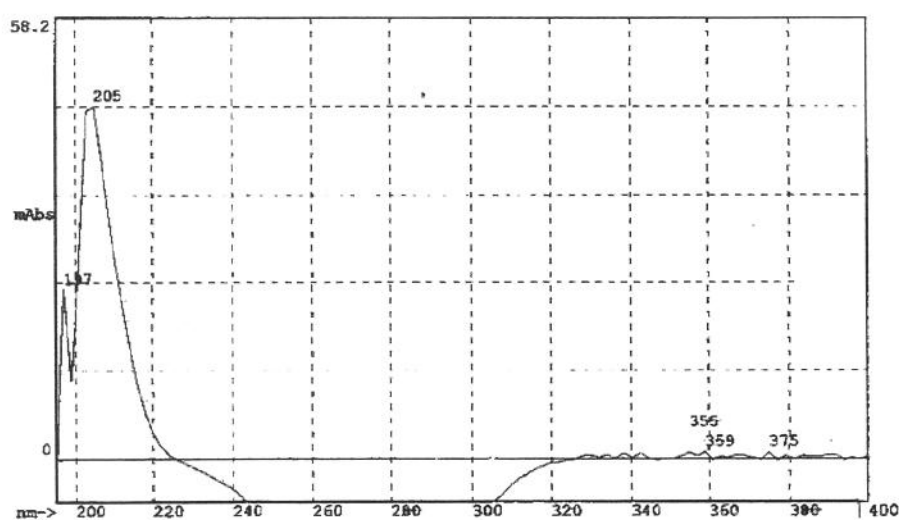
Fig. 6 – Cromatograma característico de colesterol e óxidos de colesterol em pele de peru, obtidos pelo detector por conjunto de diodos.

Condições cromatográficas: coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min. Detecção a 210nm.

## Espectros de absorvância do colesterol e dos óxidos de colesterol



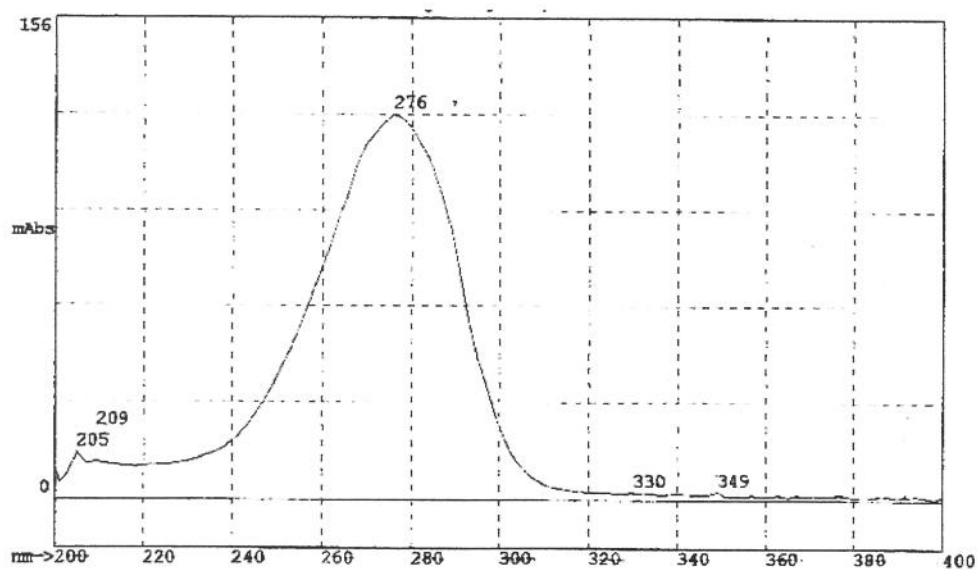
(a)



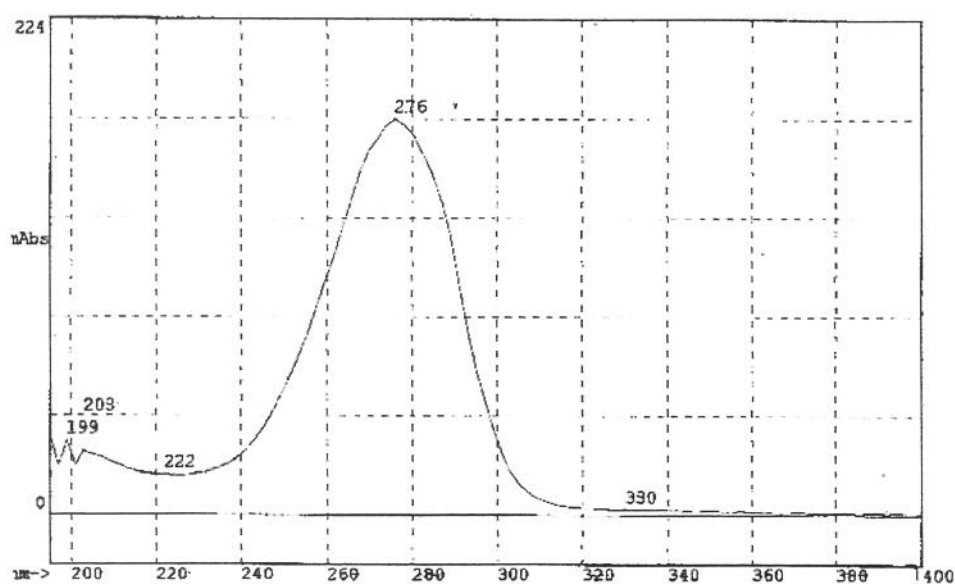
(b)

Fig. 7 – Espectros de absorvância de colesterol, padrão (a) e amostra (b), obtidos pelo detector por conjunto de diodos.

Condições cromatográficas: coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min.



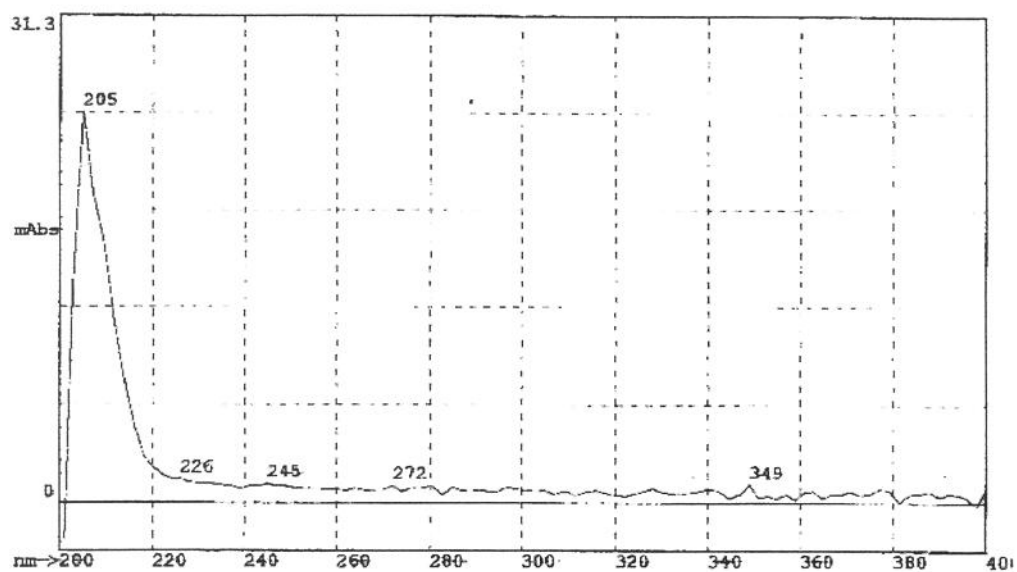
(a)



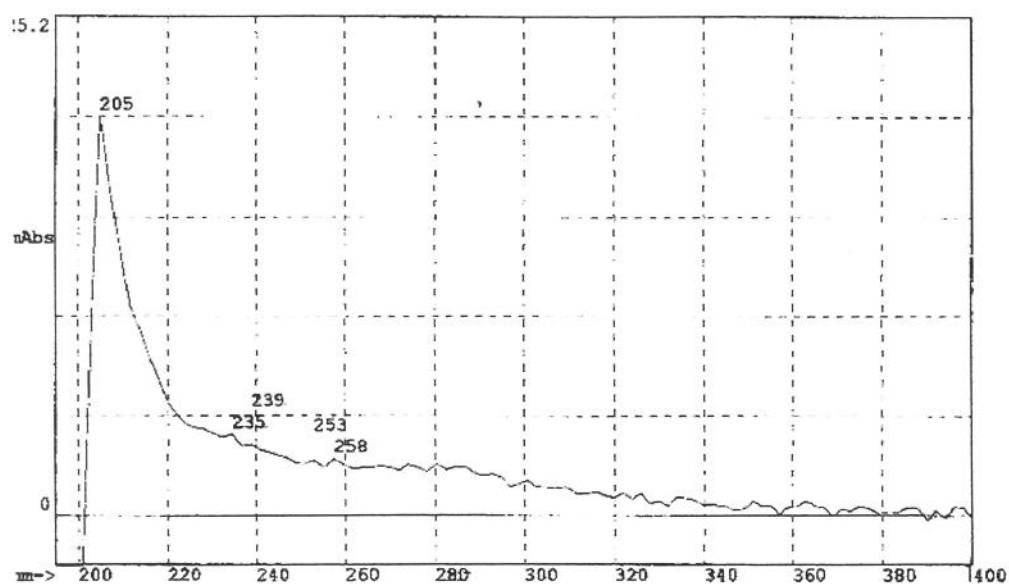
(b)

**Fig. 8 – Espectros de absorvância de colestá-4,6-dien-3-ona, padrão (a) e amostra (b), obtidos pelo detector por conjunto de diodos.**

**Condições cromatográficas: coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min.**



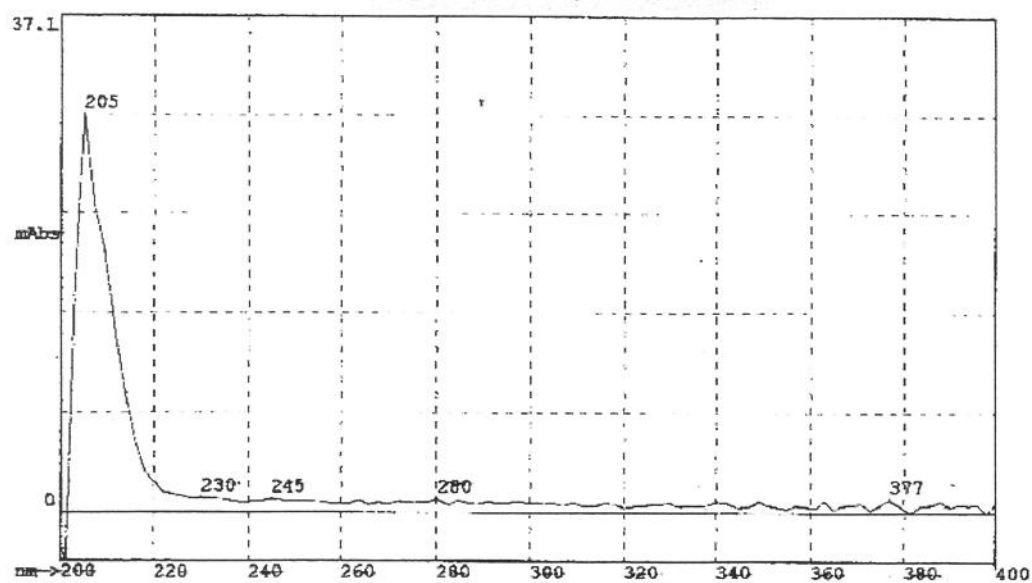
(a)



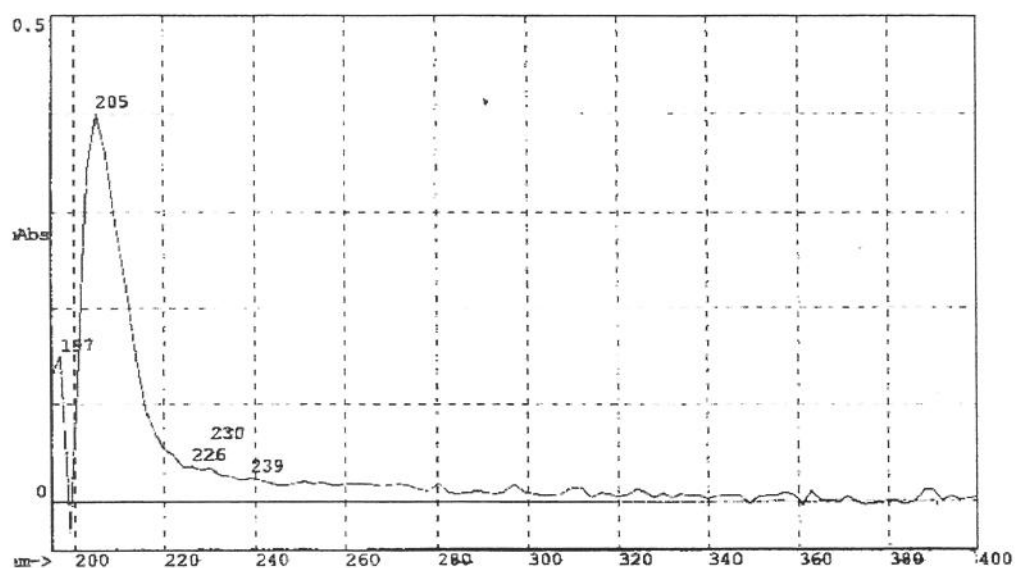
(b)

Fig. 9 – Espectros de absorvância de 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, padrão (a) e amostra (b), obtidos pelo detector por conjunto de diodos.

Condições cromatográficas: coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min.



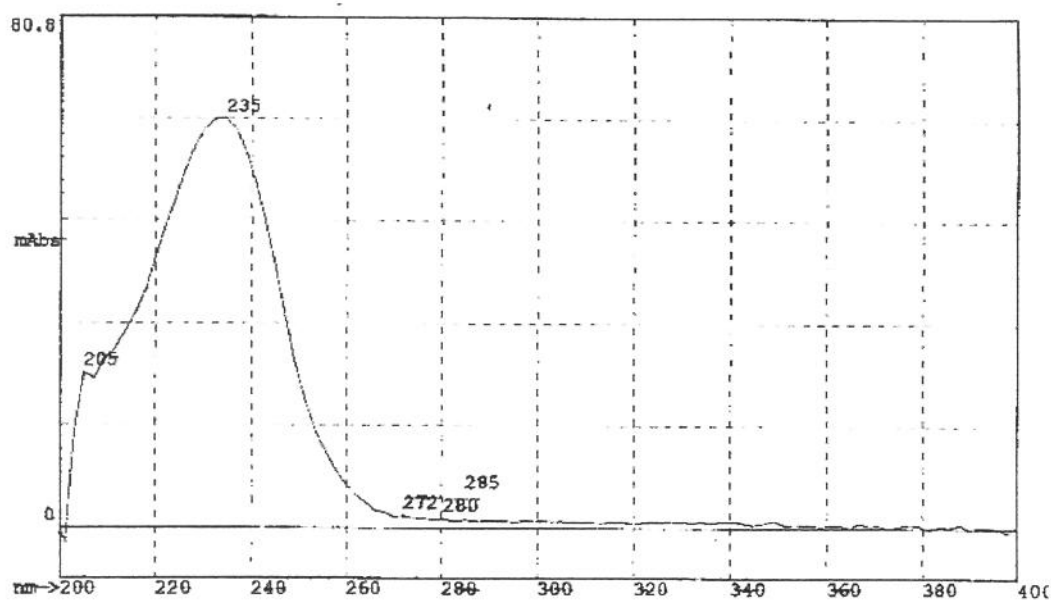
(a)



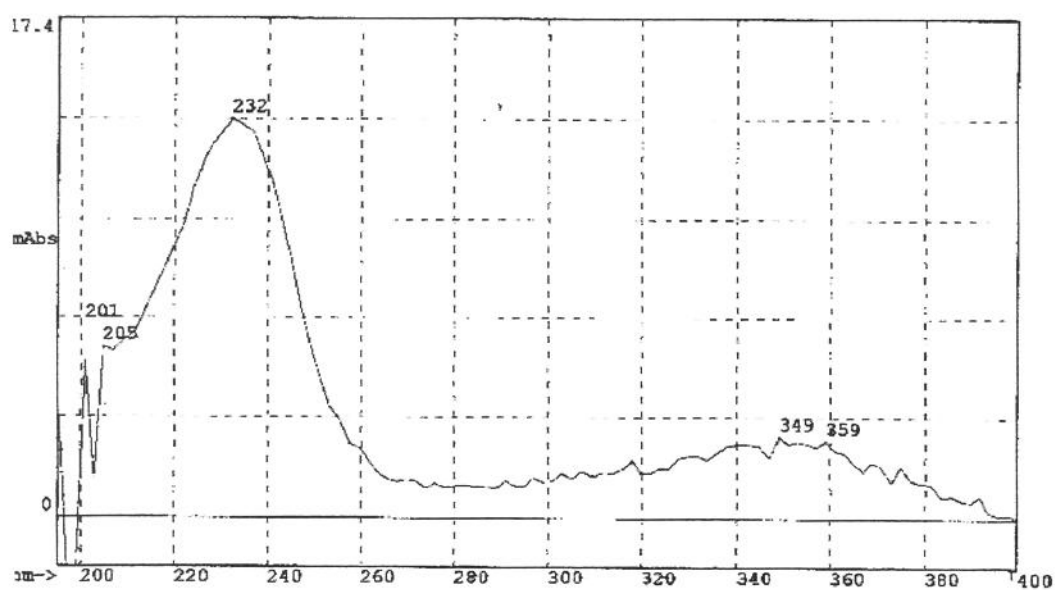
(b)

Fig. 10 – Espectros de absorvância de 25-hidroxicolesterol, padrão (a) e amostra (b), obtidos pelo detector por conjunto de diodos.

Condições cromatográficas: coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min.



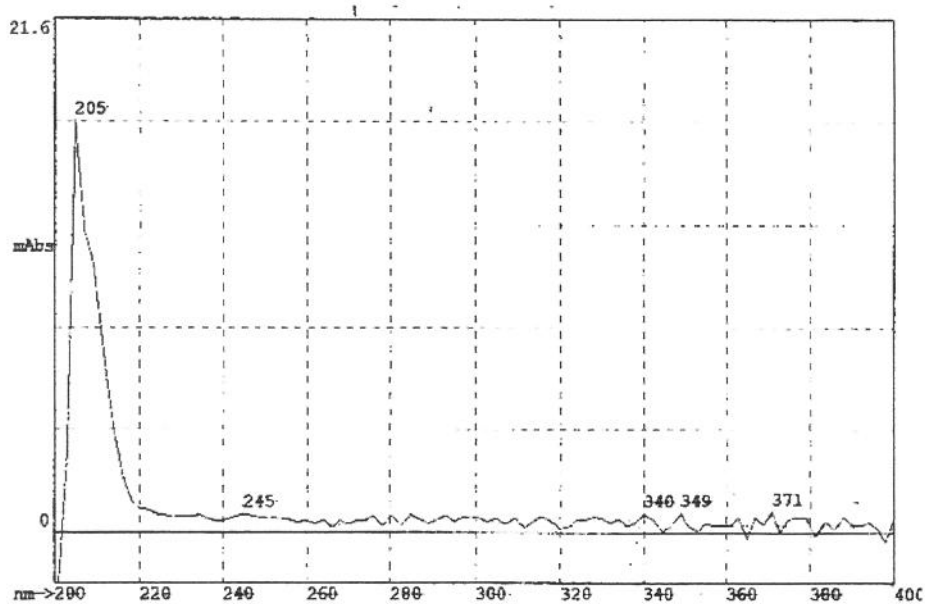
(a)



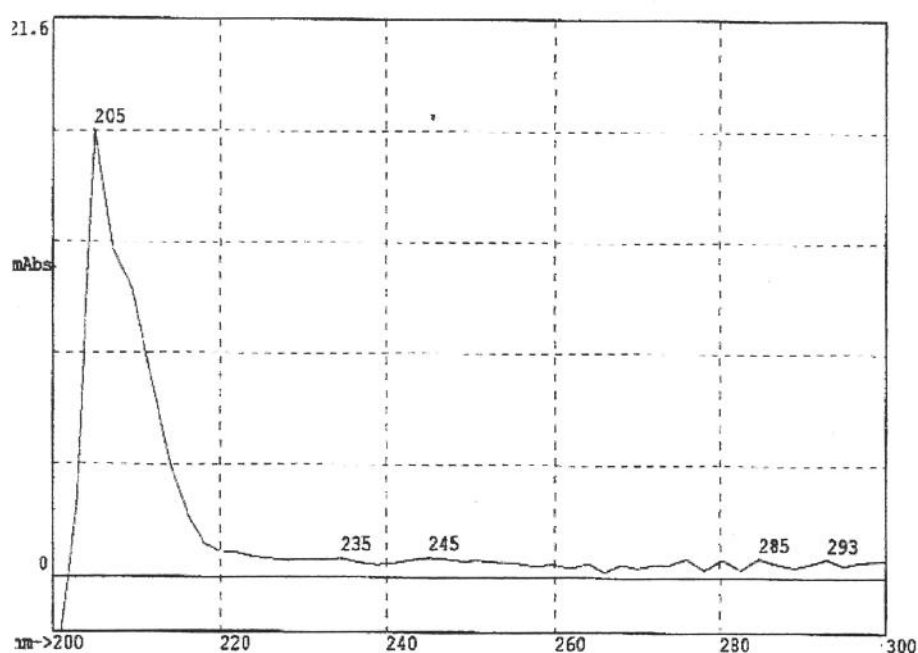
(b)

**Fig. 11 – Espectros de absorvância de 7-cetocolesterol, padrão (a) e amostra (b), obtidos pelo detector por conjunto de diodos.**

**Condições cromatográficas: coluna CN (300 x 3,9 mm, 4 $\mu$ m), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min.**



(a)



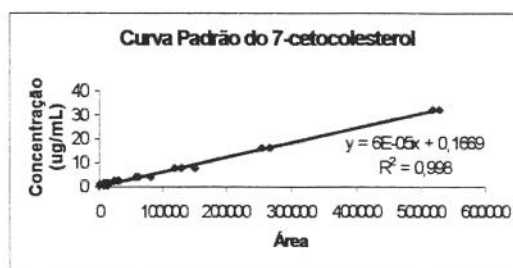
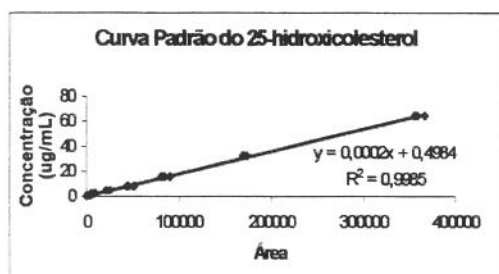
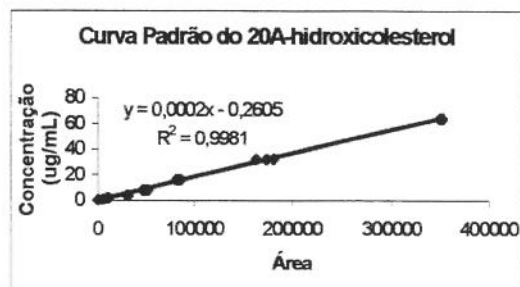
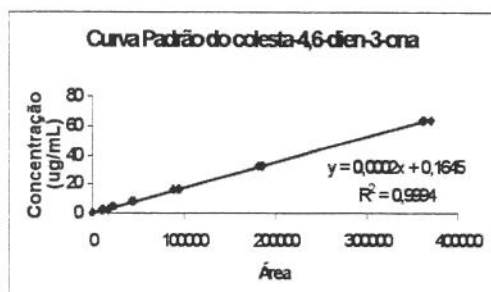
(b)

**Fig. 12 – Espectros de absorvância de 7β-hidroxicolesterol, padrão (a) e amostra (b), obtidos pelo detector por conjunto de diodos.**

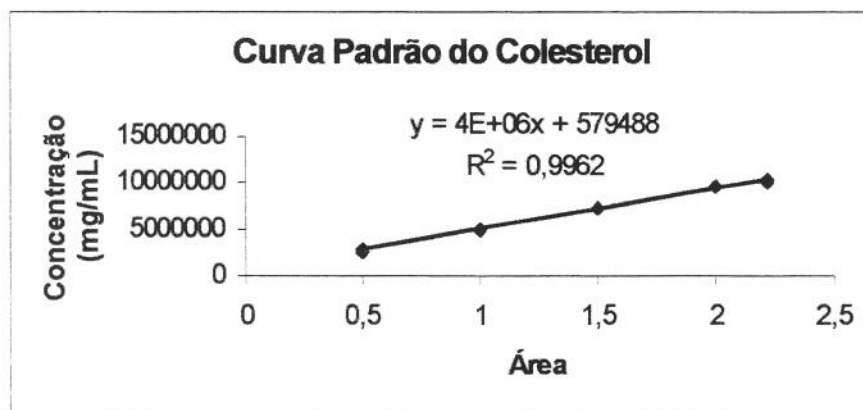
**Condições cromatográficas: coluna CN (300 x 3,9 mm, 4μm), fase móvel hexano/isopropanol (96+4), vazão 1 ml/min.**

## Anexo 2

### Curvas-padrão dos óxidos de colesterol

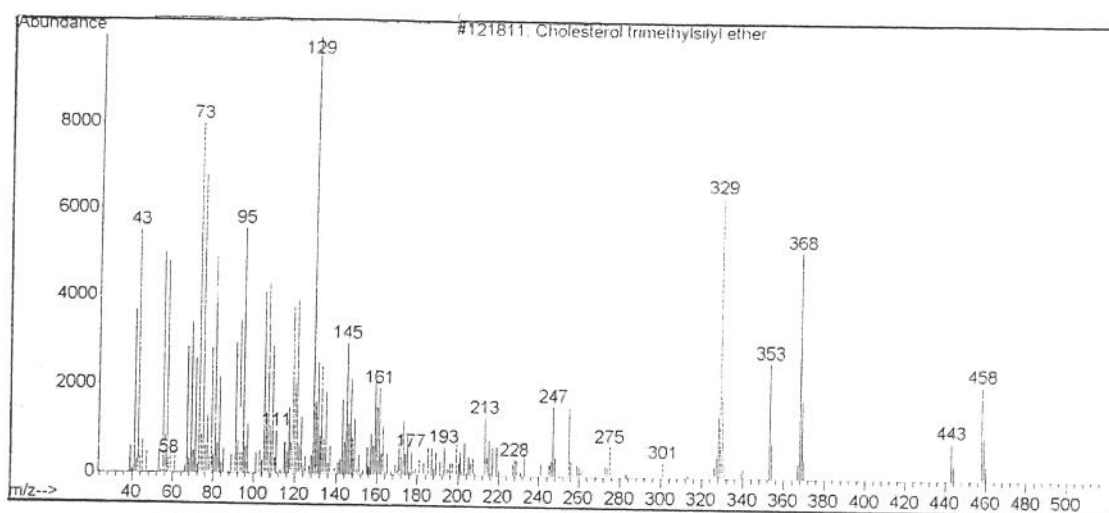


### Curva padrão do colesterol

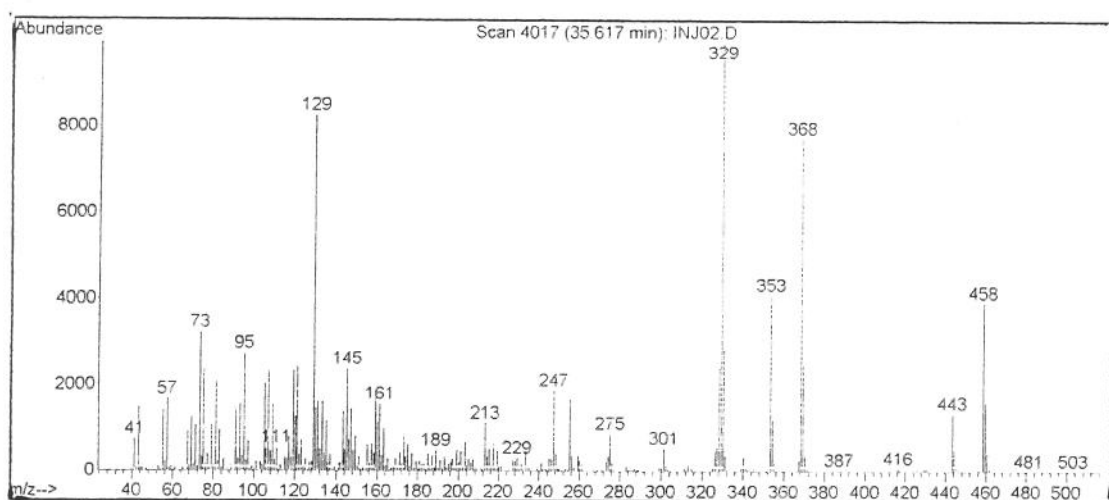


## Anexo 3

## Espectros de massas de colesterol e óxidos de colesterol

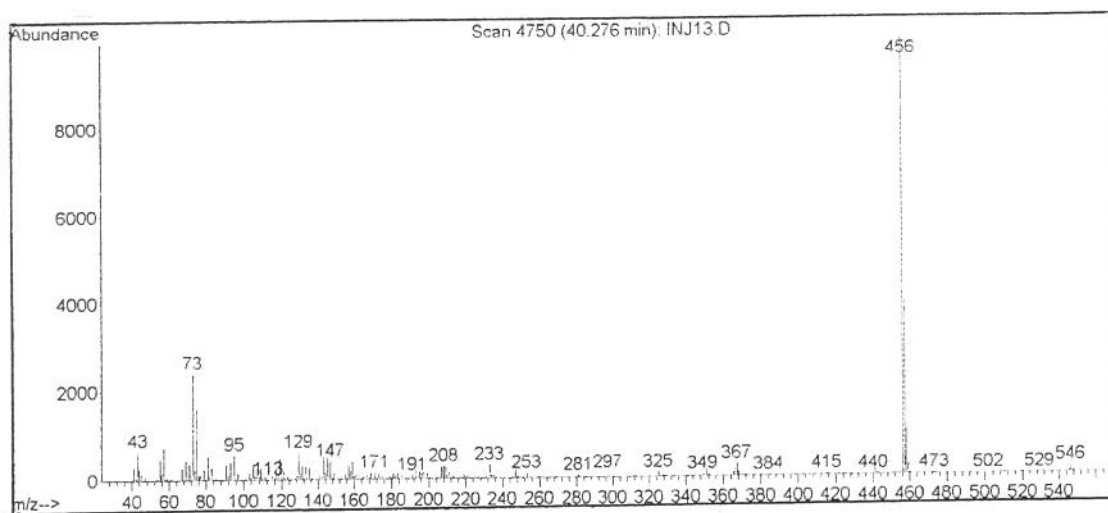


(a)

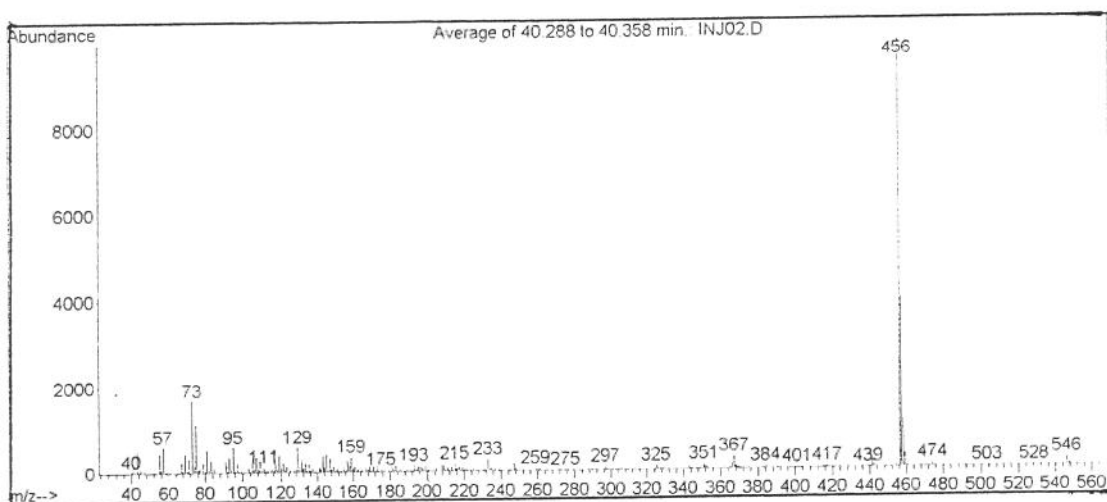


(b)

Fig. 1 – Espectros de massas do colesterol trimetilsilil éter derivado, padrão (a) e amostra (b), obtidos por cromatografia gasosa. Energia de ionização de 70eV. Os espectros de massas foram explorados de 40-600 (m/z).

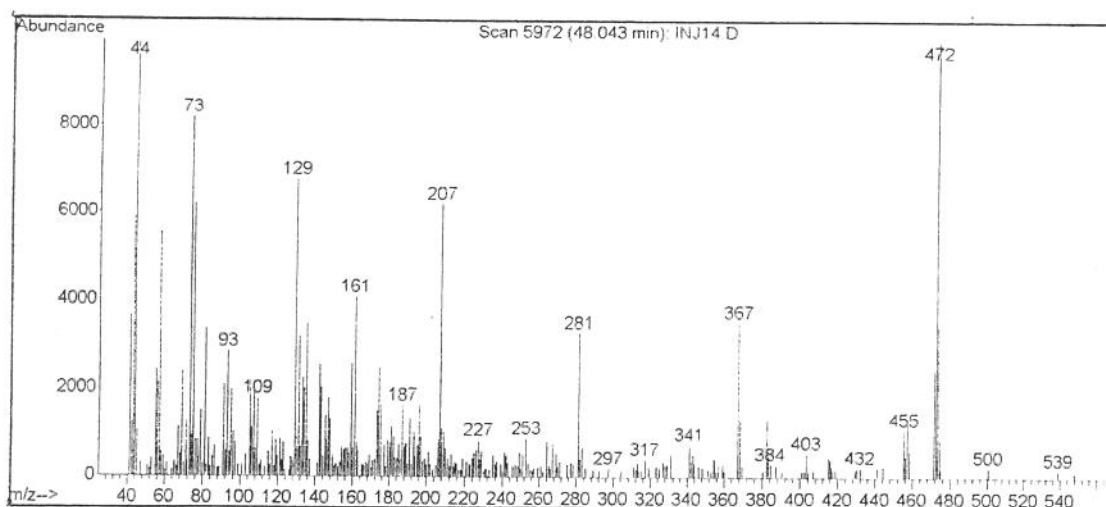


(a)

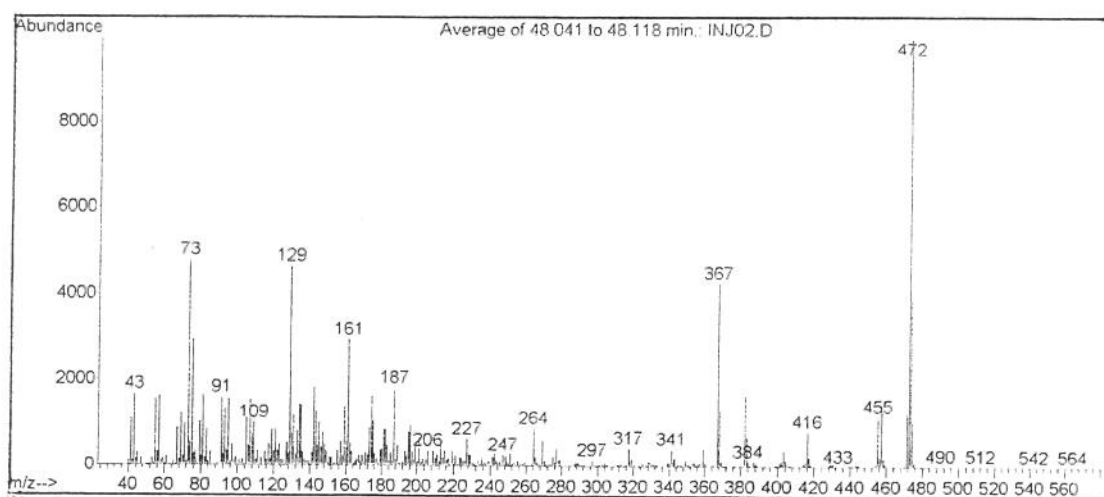


(b)

**Fig. 2 – Espectros de massas do 7 $\beta$ -hidroxicolesterol trimetilsilil éter derivado, padrão (a) e amostra (b). Energia de ionização de 70eV. Os espectros de massas foram explorados de 40-600 (m/z).**



(a)



(b)

**Fig. 3 – Espectros de massas do 7-cetocolesterol trimetilsilil éter derivado, padrão (a) e amostra (b). Energia de ionização de 70eV. Os espectros de massas foram explorados de 40-600 (m/z).**

## Anexo 4

## Cromatogramas dos ácidos graxos de carne de peru

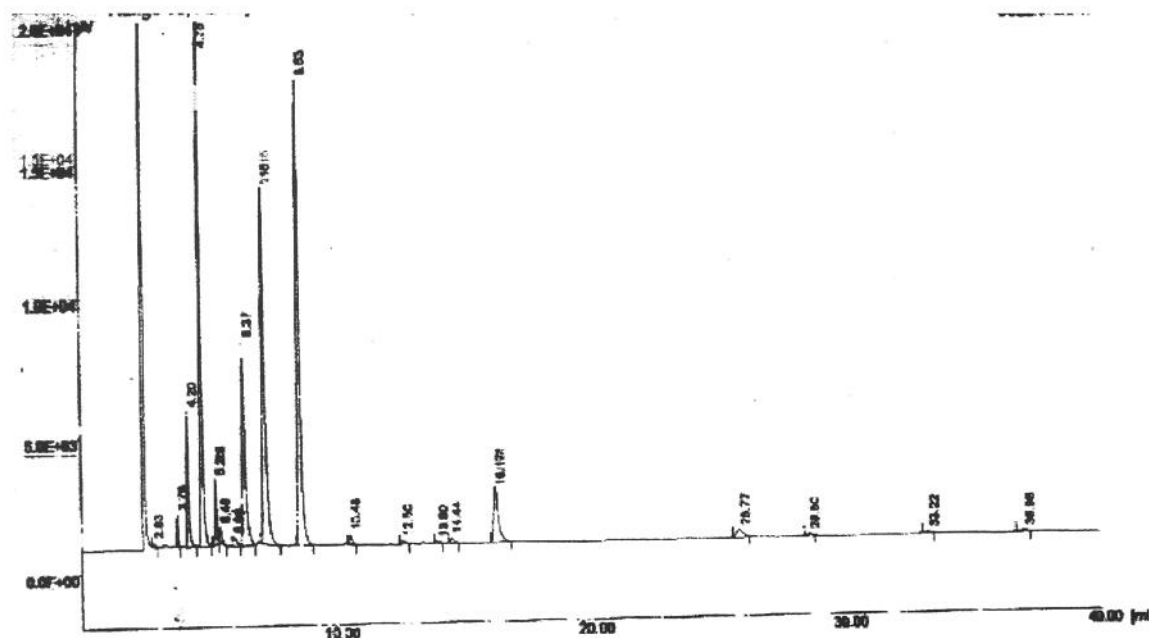


Fig. 1 – Cromatograma característico de ácidos graxos em asa de peru, obtido por cromatografia gasosa.

Condições Cromatográficas: coluna capilar CP-SIL 88 (50m x 0,25mm, 0,25 $\mu$ m) (temperatura 180°C), injetor split, razão 100:1 (temperatura 270°C), detector por ionização de chama (FID) (temperatura 300°C)

| Tempos de Retenção (min) | Ácidos Graxos    |
|--------------------------|------------------|
| 2,83                     | C10:0            |
| 3,79                     | C14:0            |
| 4,20                     | C15:0            |
| 4,75                     | C16:0            |
| 5,28                     | C16:1 $\omega$ 7 |
| 5,46                     | C17:0            |
| 5,98                     | NI               |
| 6,37                     | C18:0            |
| 7,15                     | C18:1 $\omega$ 9 |
| 8,53                     | C18:2 $\omega$ 6 |
| 10,48                    | C18:3 $\omega$ 3 |
| 12,50                    | C20:2 $\omega$ 6 |
| 13,90                    | C22:0            |
| 14,44                    | NI               |
| 16,17                    | C20:4 $\omega$ 6 |
| 25,77                    | NI               |
| 28,50                    | C22:5 $\omega$ 6 |
| 33,22                    | C22:5 $\omega$ 3 |
| 36,96                    | C22:6 $\omega$ 3 |

NI – Não identificado

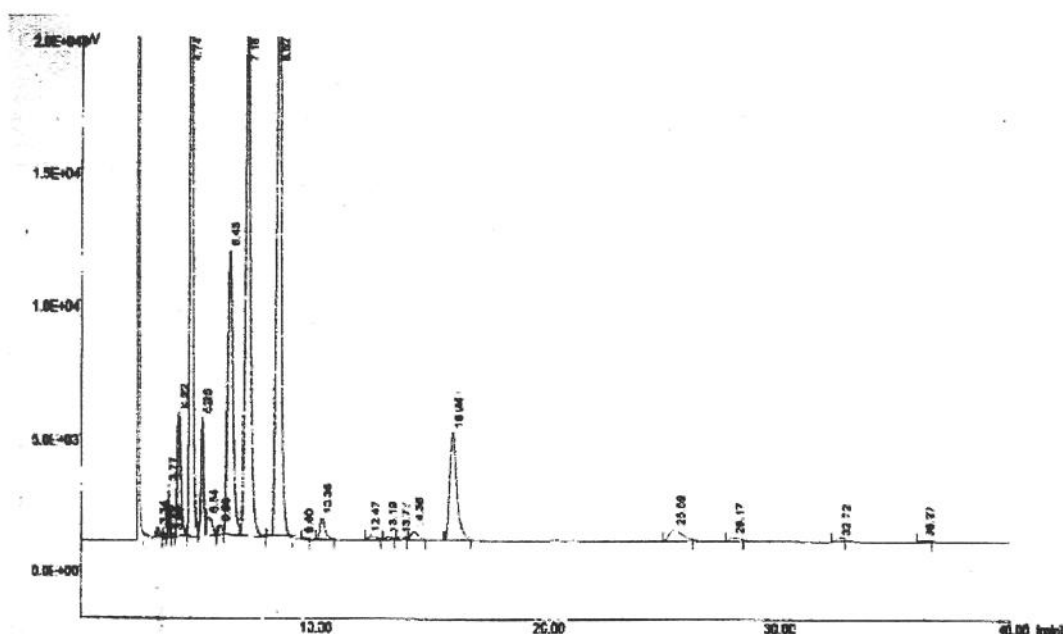
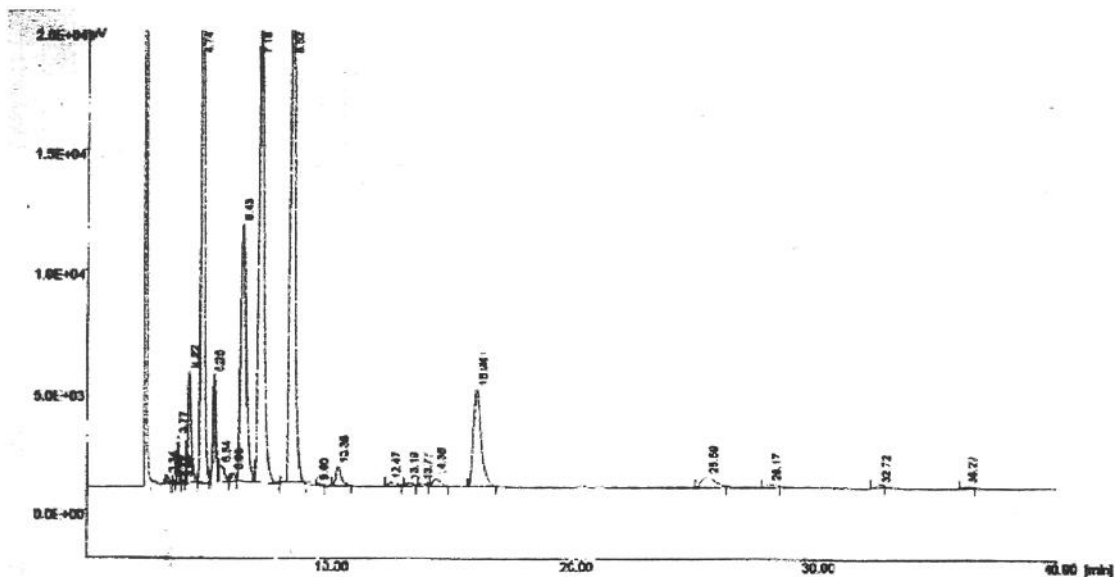


Fig. 2 – Cromatograma característico de ácidos graxos em coxa de peru, obtido por cromatografia gasosa.

Condições Cromatográficas: coluna capilar CP-SIL 88 (50m x 0,25mm, 0,25 $\mu$ m) (temperatura 180°C), injetor split, razão 100:1 (temperatura 270°C), detector por ionização de chama (FID) (temperatura 300°C)

| Tempos de Retenção (min) | Ácidos Graxos    |
|--------------------------|------------------|
| 3,34                     | C13:0            |
| 3,60                     | NI               |
| 3,77                     | C14:0            |
| 3,99                     | C14:1 $\omega$ 9 |
| 4,22                     | C15:0            |
| 4,74                     | C16:0            |
| 5,25                     | C16:1 $\omega$ 7 |
| 5,54                     | C17:0            |
| 6,03                     | NI               |
| 6,43                     | C18:0            |
| 7,18                     | C18:1 $\omega$ 9 |
| 8,52                     | C18:2 $\omega$ 6 |
| 9,60                     | C18:3 $\omega$ 6 |
| 10,38                    | C18:3 $\omega$ 3 |
| 12,47                    | C20:0 $\omega$ 6 |
| 13,19                    | NI               |
| 13,77                    | C22:0            |
| 14,36                    | NI               |
| 16,04                    | C20:4 $\omega$ 6 |
| 25,59                    | NI               |
| 28,17                    | C22:5 $\omega$ 6 |
| 32,72                    | C22:0 $\omega$ 3 |
| 36,27                    | C22:6 $\omega$ 3 |

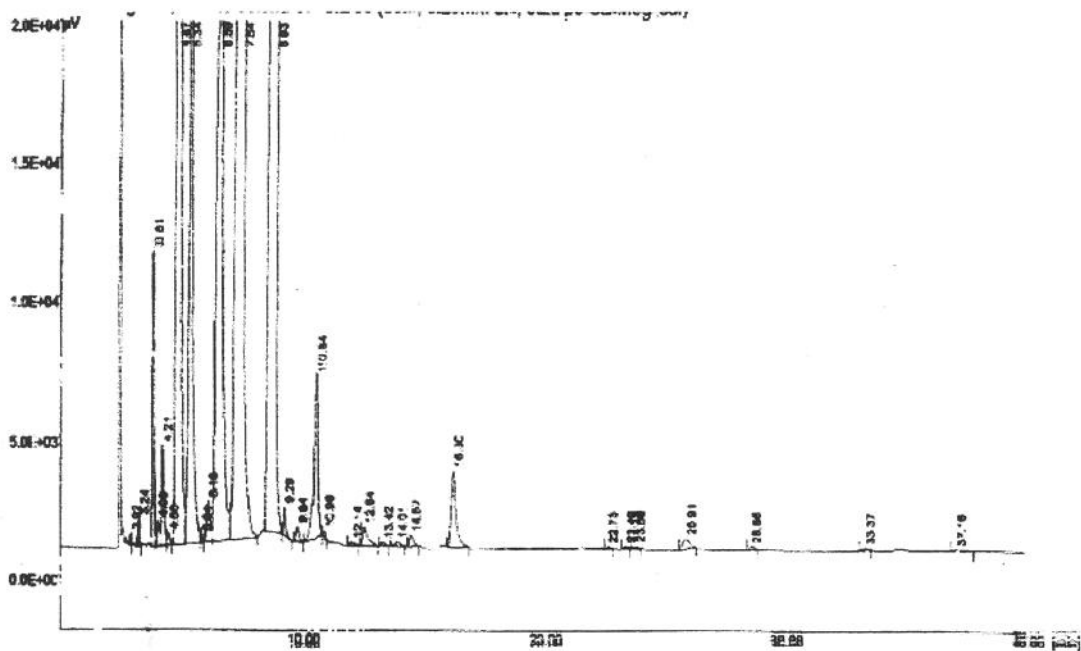
NI – Não identificado



**Fig. 3 – Cromatograma característico de ácidos graxos em peito de peru, obtido por cromatografia gasosa.**  
**Condições Cromatográficas:** coluna capilar CP-SIL 88 (50m x 0,25mm, 0,25µm) (temperatura 180°C), injetor split, razão 100:1 (temperatura 270°C), detector por ionização de chama (FID) (temperatura 300°C)

| Tempos de Retenção (min) | Ácidos Graxos |
|--------------------------|---------------|
| 2,84                     | C10:0         |
| 3,26                     | NI            |
| 3,40                     | C13:0         |
| 3,69                     | NI            |
| 3,83                     | C14:0         |
| 4,32                     | C15:0         |
| 4,88                     | C16:0         |
| 5,35                     | C16:1ω7       |
| 5,77                     | C17:0         |
| 6,23                     | NI            |
| 6,70                     | C18:0         |
| 7,47                     | C18:1ω9       |
| 8,88                     | C18:2ω6       |
| 9,85                     | NI            |
| 10,64                    | C18:3ω3       |
| 12,78                    | C20:2ω6       |
| 13,52                    | C22:0         |
| 14,13                    | NI            |
| 14,71                    | NI            |
| 16,58                    | C20:4ω6       |
| 21,56                    | C24:0         |
| 26,21                    | NI            |
| 28,86                    | C22:5ω6       |
| 33,53                    | C22:5ω3       |
| 37,22                    | C22:6ω3       |

NI – Não identificado



**Fig. 4 – Cromatograma característico de ácidos graxos em pele de peru, obtido por cromatografia gasosa.**  
Condições Cromatográficas: coluna capilar CP-SIL 88 (50m x 0,25mm, 0,25µm) (temperatura 180°C), injetor split, razão 100:1 (temperatura 270°C), detector por ionização de chama (FID) (temperatura 300°C)

| Tempos de Retenção (min) | Ácidos Graxos |
|--------------------------|---------------|
| 3,24                     | C12:0         |
| 3,81                     | C14:0         |
| 4,03                     | C14:1ω9       |
| 4,21                     | C15:0         |
| 4,87                     | C16:0         |
| 5,34                     | C16:1ω7       |
| 6,10                     | NI            |
| 6,59                     | C18:0         |
| 7,54                     | C18:1ω9       |
| 8,93                     | C18:2ω6       |
| 9,29                     | NI            |
| 9,84                     | NI            |
| 10,64                    | C18:3ω3       |
| 12,64                    | C20:2ω6       |
| 13,42                    | NI            |
| 14,01                    | NI            |
| 14,57                    | NI            |
| 16,30                    | C20:4ω6       |
| 25,91                    | NI            |
| 28,66                    | C22:5ω6       |
| 33,37                    | C22:5ω3       |
| 37,16                    | C22:6ω3       |

NI – Não identificado