

## CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ESTABILIDADE LIPÍDICA DO OVO DURANTE O PROCESSAMENTO E ESTOCAGEM

Michelle Garcêz de Carvalho\*, Alfredo Tenuta Filho

\*michellegarcezpi@outlook.com

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Laboratório de Produtos de Origem Animal, Universidade de São Paulo.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14685/rebrapa.v4i1.102>

**Resumo:** Diferentes condições de processamento, embalagem e estocagem podem afetar a proteção antioxidante natural do ovo. Dessa forma, os objetivos do trabalho foram: (a) Padronizar uma metodologia in vitro capaz de avaliar a capacidade antioxidante do ovo in natura e processado; (b) Investigar o efeito da pasteurização e da atomização sobre a estabilidade oxidativa da fração lipídica do ovo; e (c) Avaliar a capacidade antioxidante e a estabilidade oxidativa de ácidos graxos do ovo integral pasteurizado atomizado, frasco de polietileno de alta densidade, opaco, sob atmosfera de nitrogênio, a  $5\pm 2^\circ\text{C}$ , por até 90 dias. O método do fosfomolibdênio para medir a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) do ovo apresentou adequação analítica, com limite de quantificação de 0,017 mg  $\alpha$ -tocoferol/mL. A CATL diminuiu com o progresso do processamento e o inverso foi observado quanto aos lipídios, 7-CETO (7-cetocolesterol) e TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). O ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA) mantido sob condições de estocagem consideradas ideais permaneceu estável em relação à hidratação, a CATL e as TBARS. Conclui-se que o método do fosfomolibdênio apresentou adequação analítica suficiente. A pasteurização não afetou nenhum dos parâmetros avaliados, mas a atomização provocou diminuição significativa da CATL, e elevação dos lipídios, TBARS e 7-CETO. Foi mantida a hidratação e a estabilidade lipídica do OIPA estocado por 90 dias a  $5^\circ\text{C}$ , indicando que as condições de embalagem e estocagem foram efetivas.

**Palavras-chave:** Ovo, capacidade antioxidante, oxidação lipídica, processamento, estocagem.

**Antioxidant capacity and lipid stability egg during processing and storage:** Different processing conditions, packaging and storage can affect the natural antioxidant protection of the egg. Thus, the objectives were: (a) To standardize a methodology able to evaluate in vitro antioxidant capacity of fresh and processed egg, (b) investigate the effect of pasteurization and spray on the oxidative stability of the lipid fraction of egg and (c) evaluate the antioxidant capacity and oxidative stability of fatty acids from whole egg pasteurized atomized, bottle of high density polyethylene, opaque, under nitrogen, at  $5\pm 2^\circ\text{C}$  for up to 90 days. The phosphomolybdenum method to measure the total antioxidant capacity of lipid fraction (CATL) Egg presented analytical adequacy, with a limit of quantification of 0.017 mg  $\alpha$ -tocoferol/mL. The CATL decreased with the progress of processing and the reverse was observed for the lipids, 7-CETO (7-ketocholesterol) and TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). The pasteurized egg atomized (OIPA) kept under ideal storage conditions considered stable in relation to hydration, CATL and TBARS. It is concluded that the method of phosphomolybdenum suitability presented analytical sufficient. Pasteurization did not affect any of the parameters evaluated, but the atomization caused significant decrease CATL, and elevated lipids, TBARS and 7-CETO. Was maintained hydration and stability of the lipid OIPA stored for 90 days at  $5^\circ\text{C}$ , indicating that the conditions for packaging and storage were effective.

**Keywords:** Egg, antioxidant capacity, lipid oxidation, processing, storage.

### 1 Introdução

A ocorrência de radicais livres em alimentos causam deterioração, perdas nutricionais e ainda outras alterações indesejáveis, comprometendo atributos

químicos e sensoriais (MOHAMED; PINEDA; AGUILAR, 2007). Em oposição, a presença natural de antioxidantes é benéfica, como no caso da inibição da oxidação lipídica (ARAÚJO, 2011). O ovo, consumido na sua forma natural ou então após o processamento, compõe como matéria-prima diversos alimentos

industrializados (massas, maionese, etc) (TAI; CHEN; CHEN, 2000), é visto como fonte de proteína de qualidade nutricional inquestionável e de outros nutrientes. Dentre estes nutrientes, estão os carotenóides (beta-caroteno) e a vitamina E, ambos desempenhando atividade antioxidante (WATSON, 2002).

A pasteurização e a atomização são os principais processamentos aplicados ao ovo (TAI; CHEN; CHEN, 2000). A pasteurização implica em tratamento térmico relativamente mais brando, com aquecimento não superior a 100°C, por um curto período de tempo, para em seguida haver um rebaixamento conveniente da temperatura (choque térmico) até próximo a 0°C (FELLOWS, 2006). A atomização consiste da pulverização do produto líquido em um compartimento que recebe fluxo de ar quente. Como consequência há evaporação da água e a separação do produto em pó. A rápida evaporação da água permite manter mais baixa a temperatura das partículas sólidas, de maneira que a alta temperatura do ar de secagem (170-230°C) não afete demasiadamente o produto (LANNES; MEDEIROS, 2003; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008) A produção do ovo atomizado ao ser precedida da pasteurização da matéria-prima líquida envolve, portanto, dois processamentos térmicos sucessivos (FELLOWS, 2006).

A pasteurização, a atomização e a estocagem dos produtos processados, isoladamente e/ou em conjunto, podem afetar a capacidade antioxidante natural da matéria-prima (MAERKER, 1987; MEDINA, 2009). A perda da proteção antioxidante pode resultar na indução mais efetiva da oxidação de componentes do ovo, entre os quais os ácidos graxos e o colesterol, com produção de compostos reconhecidamente tóxicos (GALOBART *et al.*, 2001a; GALOBART *et al.*, 2001). É importante, portanto, que alimentos sensíveis à oxidação, principalmente, possam ter sua qualidade controlada, tanto na condição de matéria-prima e durante o processamento, como também na estocagem subsequente.

Vários métodos destinados à determinação da atividade antioxidante *in vitro* foram revisados (SINGH; SINGH, 2008). O método do fosfomolibdênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), considerado reprodutível, de baixo custo, livre da interferência de solventes e sem qualquer limitação, foi ajustado à determinação da capacidade antioxidante manifestada tanto por substâncias hidrossolúveis como lipossolúveis (LONGHI, 2007). No caso das substâncias lipossolúveis, a expressão final dos resultados é dada em termos de equivalentes de  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E). O método em questão foi usado em várias matrizes (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999; LONGHI, 2007; MOHAMED; PINEDA; AGUILAR, 2007), mas não em relação ao ovo.

Os objetivos deste trabalho foram padronizar o método do fosfomolibdênio, selecionado com base na literatura, para determinar a capacidade antioxidante do ovo *in natura* e processado, e avaliar os efeitos da pasteurização e atomização, realizadas em escala de laboratório, e da

estocagem do ovo atomizado, em condições ideais, sobre a estabilidade oxidativa de ácidos graxos e colesterol.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Reagentes e Amostras

Os reagentes utilizados tinham grau analítico compatível, adquiridos de vários fornecedores: hexano (Synth, 147), sulfato de sódio anidro (Vetec, S2032.01.AG), ácido sulfúrico (Synth, 31190), molibdato de amônio (Vetec, 122), fosfato de sódio monobásico (Vetec, 0752), etanol (Vetec, 000103.06),  $\alpha$ -tocoferol (Sigma, T3251), n-Hexano, grau HPLC (Sigma-Aldrich, 110-54-3), iso-propanol, grau HPLC (Sigma-Aldrich, 67-63-0), 7-cetocolesterol (3 $\beta$ -hidroxicolest-5 $\alpha$ -ene-7-one), Sigma (C2394), 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol (colest-5-ene-3 $\beta$ -, 7 $\alpha$ -diol), Sigma (C6420), 7 $\beta$ -hidroxicolesterol (colest-5-ene-3 $\beta$ -, 7 $\beta$ -diol), Sigma (C6430), Florisil, Merck (MgO:SiO<sub>2</sub>, 15:85), acetona (Vetec, 187), metanol (Vetec, 102), ácido tiobarbitúrico (Merck, 1.08180.0025), ácido tricloroacético (Vetec, 466), clorofórmio (Vetec, 192) e n-heptano (Synth, H.1001.01.BJ). O ovo processado em laboratório correspondeu a uma única marca, do Grupo I – Branco, tipo grande, com postura de cerca de três dias, adquirido em supermercados na cidade de São Paulo-SP. As amostras foram mantidas a 25±2°C até o início dos experimentos (2 dias), e ensaiadas em triplicata. Cada amostra correspondeu a 12 ovos.

### 2.2 Obtenção do ovo líquido integral, ovo líquido integral pasteurizado e ovo integral pasteurizado atomizado.

Ovos isentos de casca foram homogeneizados com auxílio de bastão de vidro, em um béquer revestido externamente com papel-alumínio, e peneirados em tela de náilon (1mm<sup>2</sup>). O produto foi transferido para um processador de alimentos (WALITA, RI7633), mantido sob vácuo e agitado durante 1 minuto, para completa homogeneização entre a clara e a gema. O produto homogeneizado foi transferido para um kitassato, sob vácuo (bomba de vácuo QUIMIS, Q355B), para que assim houvesse remoção de bolhas de ar formadas anteriormente, e mantendo o sistema sob banho de gelo para acelerar o processo de obtenção do ovo líquido integral. Obtido o ovo líquido integral, o mesmo foi pasteurizado em banho-maria (FISATON 550) efetivamente a 65°C/r 3 minutos, seguido da redução imediata da temperatura, por imersão em banho de gelo até 0°C (ESCARABAJAL, 2011). Foi adicionado três partes de água destilada, ao ovo líquido integral pasteurizado resfriado, homogeneizado com auxílio de um bastão de vidro e então submetido à atomização em escala de laboratório (MINI SPRAY DRYER B-290,

BUCHI), nas seguintes condições: temperatura de entrada de 170°C; temperatura de saída de 55±7°C; vazão de alimentação de 15mL/minuto; fluxo do atomizador de 439L/h; e, tempo de operação de 1h/L (ESCARABAJAL, 2011).

### 2.3 Estocagem do ovo integral pasteurizado atomizado

O ovo integral pasteurizado atomizado foi estocado em frasco de polietileno de alta densidade, opaco, sob atmosfera de nitrogênio, por até 90 dias, a 5±2°C e analisado a cada 30 dias. A atmosfera inerte desejada de nitrogênio foi viabilizada pelo deslocamento do ar do interior da embalagem, por jato de nitrogênio gasoso, com imediato rosqueamento da tampa do frasco. As condições empregadas na estocagem foram consideradas ideais (HUR; PARK; JOO, 2007)

## 2.4 Quantificações analíticas

### 2.4.1 Umidade

Foi determinada de acordo com o método proposto por ANVISA (2005), após a secagem da amostra em estufa (FABBE-PRIMAR 219) a 105°C, por no mínimo 24 h.

### 2.4.2. Lipídios totais

Os lipídios totais foram determinados por gravimetria em balança analítica (METTLER TOLEDO AG285) de acordo com o método de Folch, Lees e Stanley (1957), utilizando clorofórmio/metanol (2:1, v/v), adaptado por Csallany *et al.* (1989) pela adição de NaCl 0,88%, no caso do ovo líquido integral. O extrato lipídico obtido foi então evaporado a 32°C, sob vácuo, em evaporador rotatório (TECNAL TE210) e aquecido em estufa (FABBE-PRIMAR 219) a 105°C/40 minutos.

### 2.4.3 Capacidade antioxidante total da fração lipídica pelo método do fosfomolibdênio.

A extração das amostras e o procedimento analítico foram realizados com base em PRIETO; PINEDA; AGUILAR (1999) e MOHAMED; PINEDA; AGUILAR (2007).

### 2.4.3.. Extração

Em tubos de centrífuga (50 mL) foram adicionados 5g de sulfato de sódio anidro, 1g de amostra (ovo líquido integral, ou ovo líquido integral pasteurizado, ou ovo integral pasteurizado atomizado), omitindo o sulfato no

caso do ovo atomizado. O sulfato e a amostra foram homogeneizados entre si, com bastão de vidro, adicionados de 10 mL de hexano e agitados, primeiramente em agitador de tubos (PHOENIX, AT56), por 2 minutos, e depois em plataforma de agitação (HEIDOLPH UNIMAX, 2010), velocidade 6, por uma hora. Os tubos foram mantidos em isopor contendo gelo e ao abrigo da luz, durante a extração. Os tubos foram centrifugados (SORVALL, RC5C) a 10.000 rpm/10 minutos, mantendo a temperatura entre 0 a 5°C, os sobrenadantes filtrados em papel, transferidos para balões de 25 mL e o volume final completado com hexano.

### 2.4.3.2 Preparo do reativo

O reativo foi preparado no momento do uso. Alíquotas de 8,6 mL das soluções de molibdato de amônio (4 Mol/mL), fosfato de sódio monobásico (32 Mol/mL) e ácido sulfúrico (0,6 Mol/mL), respectivamente, foram transferidas para balão volumétrico e o volume completado para 25 mL, com de água destilada.

### 2.4.3.3 Procedimento

Alíquota de 0,5 mL do extrato obtido anteriormente foi transferida para um tubo eppendorf, com tampa rosqueável, e o solvente eliminado por evaporação, sob jato de nitrogênio gasoso. O resíduo foi ressuscitado em 0,2 mL de etanol, adicionado de 1 mL do reativo, homogeneizado em agitador de tubos, aquecido em banho-maria (FISATON, 550) a 95°C, por 90 minutos, resfriado em banho de gelo, por 5 minutos e, em seguida, submetido à centrifugação (INTERPRISE MINISPIN CENTRIFUGE) a 3000 rpm/ 3 minutos. Ao final, foi realizada a leitura em cubeta de vidro ótico (10 mm) a 695 nm em espectrofotômetro VIS (MICRONAL, B572). Durante o procedimento, a incidência direta de luz foi evitada. A capacidade antioxidante total da fração lipídica foi expressa em equivalente de  $\alpha$ -tocoferol.

### 2.4.3.4. Curva de calibração

Foi preparada solução de  $\alpha$ -tocoferol (25 mg) em etanol (50 mL), a partir da qual obtidas diluições atendendo às concentrações de 0,001; 0,014; 0,035; 0,043; e 0,087 mg/mL), para o estabelecimento da curva de calibração. Alíquotas (0,2 mL) das diluições indicadas foram então submetidas às etapas previstas no procedimento apontado anteriormente. Uma prova em branco foi preparada com 0,2 mL de etanol. Os resultados obtidos foram correspondentes a cinco repetições (n=5).

### 2.4.3.5 Padronização

A linearidade da curva de calibração, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e recuperação foram usados como parâmetros para a padronização do método (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002; BRASIL, 2003). A linearidade da curva de calibração média (n=5) foi estabelecida a partir de concentrações de  $\alpha$ -tocoferol, em etanol, de 0,001; 0,014; 0,035; 0,043; e 0,087 mg/mL. Os resultados foram analisados por regressão linear simples e calculados os termos de qualidade de ajuste linear - coeficiente de determinação (mínimo aceitável  $R^2=0,99$ ), coeficiente de correlação, a equação de regressão, o desvio-padrão e a normalidade dos resíduos. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados (em mg/mL) considerando o desvio-padrão (DP) em relação ao coeficiente angular (IC) obtidos pela linearidade, utilizando respectivamente as equações:  $LD= DP \times 3/IC$  e  $LQ= DP \times 10/IC$ . A precisão avalia a aproximação entre várias medidas efetuadas na mesma amostra. Usualmente, é expressa como coeficiente de variação (CV) de diversas amostras, e dado pela equação  $CV\% = (DP/M) \times 100$ , na qual DP é o desvio-padrão de cada concentração e M a média de cada concentração. A recuperação foi obtida com quatro amostras (n=4), em triplicata, conforme a equação  $R (\%) = (CTT - CTE / CTP) \times 100$ , sendo CTT a concentração total de  $\alpha$ -tocoferol (a encontrada na amostra + o padrão adicionado a ela), CTE a quantidade de  $\alpha$ -tocoferol da amostra e CTP o teor de  $\alpha$ -tocoferol do padrão.

#### 2.4.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS.

O método empregado (VYNCKE, 1970) envolveu a extração da amostra com ácido tricloroacético, a reação com o ácido tiobarbitúrico e a leitura do complexo róseo formado a 535 nm, em espectrofotômetro VIS (MICRONAL, B572). Os resultados foram expressos em mg de dialdeído malônico/kg.

#### 2.4.5 Óxidos de colesterol livres

O 7-cetocolesterol (7-CETO), 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol (7 $\alpha$ -OH) e 7 $\beta$ -hidroxicolesterol (7 $\beta$ -OH) foram analisados na forma livre. Foi considerado que o uso da saponificação, empregada na quantificação total dos óxidos de colesterol, poderia levar à destruição desses óxidos (7-cetocolesterol, principalmente) e/ou à formação de outros (CSALLANY *et al.*, 1989). A amostra foi extraída com clorofórmio e metanol (2:1, v/v), como indicado antes (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957), e o extrato lipídico obtido (50-60 mg) solubilizado com n-heptano/isopropanol (98:2, v/v), adicionado em coluna de Florisil (500 mg) e eluído com acetona, sendo esta evaporada posteriormente, a 40°C, sob vácuo (PENAZZI *et al.*, 1995) em evaporador rotatório (TECNAL TE210). O resíduo foi ressuspenso

em 2 mL da fase móvel hexano/isopropanol (93:7, v/v), filtrado em membrana durapore (Millex-MILLIPORE), com 0,45  $\mu$ m de diâmetro, e injetado (20  $\mu$ L) automaticamente (SIL-10ADVP) em cromatógrafo líquido de alta eficiência (SHIMADZU LC-10ADVP). Foi usada coluna de sílica  $\mu$ -Porasil de 30 x 0,39 cm, poro de 10  $\mu$ m de diâmetro, marca Waters, em fase normal, e com fluxo de 1,0 mL/minuto. O monitoramento se deu a 206 nm (7 $\alpha$ -OH e 7 $\beta$ -OH) e a 233 nm (7-CETO), utilizando detector de arranjo de fotodiodos (UV-VIS) SPD- M10ADVP (PENAZZI, 1995; MEDINA, 2009; ESCARABAJAL, 2011).

#### 2.4.6 Análises estatísticas

As variâncias de cada variável de resposta foram submetidas ao teste de Hartley, em seguida pela ANOVA para medidas repetidas, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey. As variáveis que apresentaram valor-p menor que 0,05 no teste de Hartley, foram submetidas ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para checar contrastes entre os tratamentos. O valor-p foi considerado significativo quando menor que 0,05 (SAS INSTITUTE, 1997).

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Capacidade antioxidante total da fração lipídica do ovo.

Quantidades significativas de substâncias oxidáveis - ácidos graxos e colesterol - componentes da fração lipídica do ovo pressupõem a existência de uma atividade antioxidante suficiente, exercida por componentes naturais como tocoferóis, carotenóides etc, e sugerem que esta proteção deva ser conhecida, em atenção a diferentes propósitos. Nesse contexto, o método do fosfomolibdênio (MOHAMED; PINEDA; AGUILAR, 2007; SINGH; SINGH, 2008) exibindo forte potencial de uso na avaliação da capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) do ovo foi selecionado e padronizado em relação à referida matriz. A base do método é a redução do molibdênio (Mo) VI a V, por substância(s) ativa(s), e formação de um complexo de Mo(V)+fosfato (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999; MOHAMED; PINEDA; AGUILAR, 2007).

Relativa à precisão não foi constatada dispersão ao redor da média, sendo que o valor máximo aceitável no caso seria de até  $\pm 5\%$ . A menor quantidade de  $\alpha$ -tocoferol/mL que pôde ser detectada foi de 0,005 mg (LD) e a menor concentração quantificada de 0,017 mg (LQ). A recuperação foi de  $97,22 \pm 10,00\%$  relativa ao  $\alpha$ -tocoferol adicionado à matriz, medindo a eficiência de sua extração. Os parâmetros avaliados foram

considerados plenamente adequados e concordantes com a literatura tomada como base (BRASIL, 2003).

A escolha do método para avaliar a CATL do ovo líquido integral, ovo líquido integral pasteurizado e ovo integral pasteurizado atomizado, foi devido principalmente à vinculação com o  $\alpha$ -tocoferol, cujo aporte natural pode ser comprometido no caso do ovo ser submetido ao processamento térmico e/ou estocagem. A menor concentração quantificada expressada como limite de quantificação (LQ) do método padronizado, de 0,017 mg de  $\alpha$ -tocoferol/mL, tem coerência com a ocorrência em ovo, de 0,97 mg de  $\alpha$ -tocoferol/100g (USDA, 2011), ou seja, o LQ constatado indica que o método tem sensibilidade suficiente para medir a participação antioxidante de tocoferóis. O método do fosfomolibdato tem potencial para ser utilizado com o propósito de pesquisa e em análises de rotina, no controle de qualidade do ovo, durante o processamento e/ou estocagem.

### 3.2 Efeitos da pasteurização e da atomização sobre a estabilidade oxidativa da fração lipídica do ovo.

Os efeitos da pasteurização e da atomização do ovo foram avaliados pelos lipídios totais (LP) e, principalmente, pela capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e 7-cetocolesterol (7-CETO) (Tabela 1). As TBARS e o 7-CETO têm sido empregados como indicativos da oxidação de ácidos graxos e colesterol, respectivamente.

Os resultados de LP, CATL, TBARS e 7-CETO encontrados no ovo líquido integral (OLI) (controle) e no ovo líquido integral pasteurizado (OLIP) não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si (Tabela 1), sugerindo não ter havido influência da pasteurização realizada em laboratório (65°C/3 minutos). O 7 $\alpha$ -hidroxicoolesterol e 7 $\beta$ -hidroxicoolesterol foram também analisados, cuja ocorrência estava abaixo do limite de quantificação. Os resultados observados são favoráveis, mas não podem ser extrapolados diretamente em relação à pasteurização industrial devido às diferenças inerentes entre a pasteurização feita em escala laboratorial e em escala industrial.

Em oposição, a atomização do OLIP afetou a fração lipídica do produto. Reduziu de modo significativo a CATL em 28,16%, comparada ao controle (OLI), ao mesmo tempo em que elevou as TBARS em 24,55% e o 7-CETO em 53,40%, produtos secundários da oxidação de ácidos graxos e do colesterol, respectivamente. Também neste caso, deve ser considerado que em uma situação industrial o comprometimento do OIPA possa ser diferente e eventualmente maior. É importante levar em conta que a pulverização do ovo líquido, durante a atomização do produto, se deu com auxílio do nitrogênio gasoso e visou reduzir e/ou eliminar o oxigênio, em função de sua ação oxidante.

A atomização promove redução da umidade e consequente aumento da concentração dos demais componentes do ovo (KITAHARA, 2004; MEDINA, 2009; ESCARABAJAL, 2011). A diminuição da água disponível provoca aumento da concentração de radicais livres, elevando assim a taxa de oxidação de ácidos graxos e de colesterol (ANGELO, 1992), favorecida pela temperatura e outros fatores envolvidos no processo.

Tem sido apontada que a diminuição da proteção natural do ovo durante o processamento, que é conferida por proteínas, tocoferóis, carotenóides, lipoproteínas e fosfolipídios, (HOPPE; MCINTOSH, 1993; GALOBART *et al.*, 2001a; WAHLE; CABONI *et al.*, 2005; WENZEL; SEUSS-BAUM; SCHLICH, 2010) poderá influenciar a estabilidade oxidativa de ácidos graxos e do colesterol (PENAZZI, 1995; MEDINA, 2009). A redução da CATL e o aumento das TBARS e do 7-CETO são coerentes entre si (Tabela 1) e também com relatos da literatura, exceto quanto ao estudo de Escarabajal (2011) que em condições laboratoriais idênticas, verificou que a atomização do ovo líquido integral pasteurizado não afetou a estabilidade oxidativa do colesterol, quando avaliada pelos óxidos derivados do carbono 7 (7 $\alpha$ -hidroxicoolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicoolesterol e 7-CETO). Esta divergência sugere reavaliação do assunto.

Trabalhando em escala laboratorial, Wenzel, Seuss-Baum, Schlich (2010) verificaram que a pasteurização da gema de ovo não levou a mudanças críticas no conteúdo de carotenóides (xantofilas). Ao contrário, a atomização e liofilização causaram perdas de 5,53% e 18,57%, respectivamente, induzidas por uma desnaturação de proteínas e desestabilização da matriz celular.

Concentrações de TBARS (mg de dialdeído malônico/kg) detectadas por Medina (2009), em ovo líquido integral pasteurizado (0,37 mg) e ovo integral pasteurizado atomizado (0,34 mg) comerciais, superaram as da Tabela 1 e foram relacionadas à matéria-prima empregada e ao processamento. Ao mesmo tempo, redução significativa de 25% dos carotenóides totais foi constatada no produto atomizado e nenhum comprometimento do colesterol, medido pelo 7-cetocolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicoolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicoolesterol e 25-hidroxicoolesterol livres.

A liofilização e a atomização industriais influenciaram a oxidação do colesterol, segundo Kitahara (2004). Os somatórios dos óxidos (7-cetocolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicoolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicoolesterol e 25-hidroxicoolesterol) foram de 22,80, 75,19 e 101,9  $\mu$ g/g, no ovo líquido integral, atomizado e liofilizado, respectivamente. Além disso, o processamento não influenciou significativamente o perfil de ácidos graxos. Galobart *et al.* (2001ab) relataram que o perfil lipídico do ovo influenciou a oxidação de ácidos graxos, indicada pelo aumento das TBARS em até 10 vezes, após a atomização industrial Caboni *et al.* (2005) observaram que a atomização industrial não afetou a composição de tocoferóis ( $\alpha$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocoferol).

**Tabela 1** – Lipídios totais (LP), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e 7-cetocolesterol (7-CETO) em ovo líquido integral (OLI), ovo líquido integral pasteurizado (OLIP) e ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA)

Ovo	LP	CATL	TBARS	7-CETO
OLI	7,90b± 0,68	2,45a± 0,12	0,00334b ± 0,49	8,39b ± 1,48
OLIP	8,03b± 0,59	2,38a± 0,28	0,00344b± 0,53	10,15b ± 1,53
OIPA	39,64a ± 0,33	1,76b ± 0,16	0,00416a ± 0,10	12,87a ± 2,18
p-valor*	0,48	0,06	0,008	0,63
p-valor#	<0,01	<0,001	0,003	0,002

Resultados médios (n=3)±desvio-padrão expressos em base seca. LP: g de lipídio/100g; CATL: equivalente em mg de  $\alpha$ -tocoferol/g; TBARS: mg de dialdeído malônico /kg; 7-CETO:  $\mu$ g 7-cetocolesterol/g. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes (p< 0,05) de acordo com o teste de Tukey ou Kruskal-Wallis. \*Valor-p para teste de homogeneidade de variâncias de Hartley (F-max); #Valor-p para análise de variância univariada ou teste de Kruskal-Wallis.

**Tabela 2** – Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e 7-cetocolesterol (7-CETO) do ovo integral pasteurizado atomizado mantido estocado em frasco de polietileno de alta densidade, opaco, sob atmosfera de nitrogênio, a 5±2°C, por até 90 dias

Estocagem (dias)	U	CATL	TBARS	7-CETO
1	3,60±0,54	1,97±0,38	0,00288±0,15	0,0212±0,002
30	3,12±0,81	1,79±0,40	0,00269±0,59	0,0259±0,0085
60	3,96±0,67	2,00±0,07	0,00200±0,36	0,0198±0,0004
90	4,30±0,41	1,73±0,45	0,00281±0,58	0,0163±0,0003
p-valor*	0,70	<0,001	<0,001	<0,001
p-valor#	0,10	0,22	0,27	0,03

Resultados médios (n=3)±desvio-padrão expressos em base seca. U: g de umidade/100g; CATL: equivalente em mg de  $\alpha$ -tocoferol/ g; TBARS: mg de dialdeído malônico/kg; 7-CETO:  $\mu$ g 7-cetocolesterol/ mg lipídio. \*Valor-p para teste de homogeneidade de variâncias de Hartley (F-max); #Valor-p para análise de variância univariada ou teste de Kruskal-Wallis.

Verificaram, no entanto, a ocorrência da reação de Maillard e oxidação do colesterol, medida pelo 7-cetocolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicoesterol, 7 $\beta$ -hidroxicoesterol, colesterol-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epóxido, colesterol-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epóxido, colestanoetriol, 25-hidroxicoesterol e 20-hidroxicoesterol. Compostos derivados da reação de Maillard são responsáveis principalmente pelo sabor e cor indesejáveis observados em ovo atomizado.

A oxidação de ácidos graxos e do colesterol resultante da atomização do ovo (Tabela 1) poderia ser reduzida ou totalmente controlada pela adição prévia de  $\alpha$ -tocoferol, aumentando assim o aporte natural da matéria-prima. Outros antioxidantes também poderiam ser usados isoladamente ou em associação, inclusive os sintéticos convencionais, não sendo dispensadas as condições adequadas de estocagem.

### 3.3 Estabilidade oxidativa da fração lipídica do ovo atomizado durante a estocagem

O ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA) foi mantido em frasco de polietileno de alta densidade, opaco, sob atmosfera de nitrogênio, a 5±2°C, por até 90

dias. Avaliado quanto à umidade, capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e 7-cetocolesterol (7-CETO), o OIPA não sofreu alteração em relação aos parâmetros analisados durante a estocagem (Tabela 2).

As condições de estocagem usadas são consideradas ideais, impedindo que fatores externos (oxigênio, luz, temperatura inadequada) promovam a oxidação de ácidos graxos e colesterol (HUR; PARK; JOO, 2007). Ao mesmo tempo há o pressuposto de que a estabilidade do produto atomizado tenha ocorrido também em função de sua CATL. Os resultados obtidos indicam a possibilidade de estocagem do ovo atomizado nas condições apontadas. Ao ovo atomizado disponível no comércio local não é dispensado esse cuidado. O controle da umidade serviu para indicar a impermeabilidade da embalagem ao vapor d'água, do meio exterior, considerando a higroscopicidade do produto (PRITZKER, 1994; MEDINA, 2009) e que sua hidratação favoreceria a oxidação. O período de estocagem de 90 dias é compatível como prazo de validade comercial do produto, até pela manutenção em temperatura de refrigeração (5±2°C), nada impedindo que não possa ser estendido, desde que estudos

posteriores assim o determinem. Relatos da literatura indicam o comprometimento de vitamina E e carotenóides, aumento das TBARS e oxidação do colesterol (WAHLE; HOPPE; MCINTOSH, 1993) em ovo estocado à temperatura ambiente, com ligeira modificação na manutenção do produto entre -18°C a 4°C (GRUNE *et al.*, 2001; WENZEL; SEUSS-BAUM; SCHLICH, 2010).

Durante a estocagem (12 meses) do ovo atomizado comercial, em embalagem de polietileno, na ausência de luz, sob vácuo, a 25°C, Mazalli e Bragagnolo (2007) relataram aumento nas quantidades de 7-cetocolesterol, 7- $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7- $\beta$ -hidroxicolesterol, 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol e 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol. Ao mesmo tempo, foi observada redução de ácidos graxos poli-insaturados, enquanto os níveis de monoinsaturados e lipídios totais permaneceram constantes. Medina (2009) estocou o ovo integral pasteurizado atomizado comercial à temperatura ambiente, em bolsa hermética de polietileno de baixa densidade, durante 90 dias, verificando incremento da umidade de 2,92 a 4,98% e atribuindo o fato à natureza levemente higroscópica do produto, em sintonia com relatos da literatura (PRITZKER, 1994). Verificou ainda aumento das TBARS (0,35 a 0,69 mg de dialdeído malônico /Kg), apontando como possível influência o manuseio das amostras e a permeabilidade da embalagem ao vapor d'água e ao oxigênio.

#### 4 Conclusões

O método do fosfomolibdênio apresentou adequação analítica suficiente para quantificar a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), relativa ao ovo líquido integral, ovo líquido integral pasteurizado e ovo integral pasteurizado atomizado. A pasteurização do ovo líquido integral não afetou a CATL e nem a estabilidade oxidativa de ácidos graxos e do colesterol do produto. Ao contrário, a atomização do ovo líquido integral pasteurizado diminuiu a CATL e provocou a oxidação de ácidos graxos e colesterol. A estocagem do ovo integral pasteurizado atomizado, em frasco de polietileno de alta densidade, opaco, sob atmosfera de nitrogênio, a 5 $\pm$ 2°C, por até 90 dias, foi efetiva para manter estável a hidratação e a CATL, além de prevenir a oxidação de ácidos graxos e colesterol.

#### 5 Agradecimentos

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

#### 6 Referências Bibliográficas

MOHAMED, R.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Antioxidant capacity of extracts from wild and crop

plants of the Mediterranean region. **Journal of food science**, v. 72, n.1, p.S059-63, 2007.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos** - teoria e prática. Ed.: UFV. ed.5. 2011, cap. 4.

TAI, C.Y.; CHEN, Y.C.; CHEN, B.H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: an overview (Part II). **Journal of food and drug analysis**, Nankang, v.8, n.1, p.1-15, 2000.

WATSON, R. R. **Eggs and health promotion**. 1ª ed. United States America, 2002, cap. 5.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**: princípios e prática, 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, cap. 15.

LANNES, S. C. S.; MEDEIROS, M. L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer. **Brazilian journal of pharmaceutical sciences**, v. 39, n. 1, jan./mar., 2003.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos**: princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 2008, cap. 8.

MAERKER, G. Cholesterol autoxidation-current status. **Journal of the american oil chemists' society, Champaign**, v.64, n.3, p.388-392, 1987.

MEDINA, M. K. J. **Óxidos de colesterol em ovo em pó comercial: ocorrência e efeito do processamento e adição de tocoferóis no produto armazenado**. 2009. 117p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GALOBART, J.; BARROETA, A.C.; BAUCCELLS, M.D.; GUARDIOLA, F. Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with w3 and w6 polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxanthin supplementation. **Poultry science**, v. 80, p. 327-337, 2001a.

GALOBART, J.; BARROETA, A.C.; BAUCCELLS, M.D.; CORTINAS, L.; GUARDIOLA, F.  $\alpha$ -tocopheryl transfer efficiency and lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with w3-polyunsaturated fatty acids. **Poultry science**, v. 80, p. 1496-1505, 2001b.

SINGH, S; SINGH, R.P. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. **Food review international**, v. 24, p. 392-415, 2008.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, n. 269, p.337-341, 1999.

LONGHI, J. G. **Atividade biológica da semente de mucuna pruriens**. Curitiba, 2007, 69p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

- ESCARABAJAL, C. **Estabilidade oxidativa de colesterol em ovo líquido, ovo líquido pasteurizado e em ovo em pó atomizado, obtidos em laboratório.** 2011. 106p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- HUR, S. J.; PARK, G. B.; JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPS) in animal products. **Food control**, v. 18, n. 8, p. 939-947, 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos.** 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1020p. (Série A. Normas e manuais técnicos).
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 726, p. 497-509, 1957.
- CSALLANY, A.S.; KINDOM, S.E.; ADDIS, P.B.; LEE, J. HPLC. Method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Lipids**, Champaign, v. 24, n. 7, p. 645-651, 1989.
- BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C.U. Recomendações para calibração em química analítica- Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química nova**, v.25, n.5, p.856-865, 2002.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 899**, de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br>, acesso em março de 2009.
- VYNCKE, B.W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette seifen anstrichmittel, Leinfelden**, v. 72, n.12, p.1084-1087, 197.
- PENAZZI, G.; CABONI, M. F.; ZUNIN, P.; EVANGELISTI, F.; TISCORNIA, E.; TOSCHI, T.G.; LERCKER, G. Routine high performance liquid chromatographic determination of free 7-ketocholesterol in some foods by two different analytical methods. **Journal of the american oil chemists' society**, Champaign, v. 72, n. 2, p. 1523-1527, 1995.
- KITAHARA, S. E. **Efeito do processamento e da estocagem sobre a formação de óxidos de colesterol em ovos.** 2004. 80p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- SAS INSTITUTE. **SAS software:** application of statistical tests through release 6.12. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1997.
- USDA, **National Nutrient Database for Standard Reference.** Release 22, 2008. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search>, acessado em julho de 2011.
- ANGELO, A. J. **Lipid oxidation in food.** American chemical society. Washington, DC, p. 1-13, 1992, cap. 3.
- WAHLE, K.W. J; HOPPE, P.P; MCINTOSH, G. Effects of storage and various intrinsic vitamin E concentrations on lipid oxidation in dried egg powders. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 61, p. 463-469, 1993.29. CABONI, M.F.; BOSELLI, E.; MESSIA, M.C.; VELAZCO, V.; FRATIANNI, A.; PANFILI, G.; MARCONI, E. Effect of processing and storage on the chemical quality markers of spray-dried whole egg. **Journal food chemistry**, Barking, v. 92, p. 293-303, 2005.
- WENZEL, M.; SEUSS-BAUM, I.; SCHLICH, E. Influence of pasteurization, spray- and freeze-drying, and storage on the carotenoid content in egg yolk. **Journal food chemistry**, v. 58, p. 1726–1731, 2010.
- PRITZKER, J. Hygroscopicity and spoilage of dry egg power. **Mittel gebiete lebensm hygiene**, v. 35, p. 341-344, 1994.
- GRUNE, T.; KRAMER, L.; HOPPE, P. P.; SIEMS, W. Enrichment of eggs wiht n-3 polyunsaturated fatty acids: effects of vitamin E supplementation. **Lipids**, v. 36, n. 8, p. 833-838, 2001.
- MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Effect of storage on cholesterol oxide formation and fatty acid alterations in egg powder. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 2743–2748, 2007.