



**EFEITO DA INCLUSÃO DE NÍVEIS CRESCENTES DE ORÉGANO DESIDRATADO
SOBRE O CONTEÚDO DE COLESTEROL E SEUS ÓXIDOS EM LEITE BOVINO *IN*
NATURA, PASTEURIZADO E QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL**

LUCIANA CAROLINA BAUER

2013

LUCIANA CAROLINA BAUER

**EFEITO DA INCLUSÃO DE NÍVEIS CRESCENTES DE ORÉGANO DESIDRATADO
SOBRE O CONTEÚDO DE COLESTEROL E SEUS ÓXIDOS EM LEITE BOVINO *IN*
NATURA, PASTEURIZADO E QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Julliana Izabelle Simionato

Co-orientador: Marcelo Franco

**ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL**

2013

636.08	Bauer, Luciana Carolina.
5	Efeito da inclusão de níveis crescentes de orégano
B34e	desidratado sobre o conteúdo de colesterol e seus óxidos em leite bovino in natura, pasteurizado e queijo tipo minas frescal. / Luciana Carolina Bauer. - Itapetinga: UESB, 2013.
	64f.
	Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga. Sob a orientação da Profa. D.Sc. Julliana Izabelle Simionato e co-orientação do Prof. D.Sc. Marcelo Franco.
	1. Produtos lácteos – Análise – Colesterol e óxidos. 2. Ruminantes - Dieta - Orégano. 3. Cromatografia. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. II. Simionato, Julliana Izabelle. III. Franco, Marcelo. IV. Título.
	CDD(21): 636.085

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Produtos lácteos – Análise – Colesterol e óxidos
2. Ruminantes - Dieta - Orégano
3. Cromatografia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

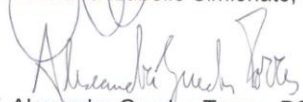
Título: “EFEITO DA INCLUSÃO DE NÍVEIS CRESCENTES DE ORÉGANO DESIDRATADO SOBRE O CONTEÚDO DE COLESTEROL E SEUS ÓXIDOS EM LEITE BOVINO IN NATURA, PASTEURIZADO E QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL.”

Autor: LUCIANA CAROLINA BAUER

Orientadora: Prof^a. JULLIANA IZABELLE SIMIONATO, DSc., UESB

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.


Prof^a. Juliana Izabelle Simionato, DSc., UESB


Prof. Alexandre Guedes Torres, DSc., UFRJ


Prof^a. Simone de Andrade Gualberto, DSc., UESB

Data da Realização: 25 de Fevereiro de 2013.

Praça Primavera, Nº 40, Bairro Primavera – Telefone: (77) 3261-8629 - Fax: (77) 3261-8701
Itapetinga – BA CEP: 45.700-000 – e-mail: ppgeal.uesb@yahoo.com.br

AGRADECIMENTOS

Nossa parece que foi ontem! Eu entrando na universidade carregando sonl tornar-me uma boa profissional, disputar e ganhar uma vaga no mercado de trabalho, uma vida digna e dar orgulho à minha família. Deus! Muito obrigado! O Senhor me proporcionou tudo isso e muito mais! Colocou pessoas maravilhosas em minha vida, que me ajudaram a chegar até aqui e que eu agradeço imensamente!

Ao meu marido, Otavio que esteve sempre ao meu lado, incentivando-me e alegrando-se com cada sucesso que alcancei.

Aos meus pais e irmão que tanto amo, Rosa, Luiz e Thiago, que mesmo longe sempre me apoiaram e acreditaram que eu conseguiria.

À minha amiga Milene, pelo incentivo, sem o conselho dado na hora certa eu não teria me inscrito na seleção do mestrado.

À minha orientadora Julliana Simionato, primeiramente pela amizade, mas especialmente pela orientação e encorajamento. Admiro muito seu amor pela pesquisa, inteligência e determinação.

Às professoras Alexilda Oliveira e Simone Gualberto, integrantes da banca de qualificação, pela colaboração para melhoria deste trabalho.

Às amigonas Débora e Ellen, companheiras queridas que o mestrado me proporcionou, pelas trocas de conhecimento, apoio nas horas de desespero e pelas muitas risadas e momentos de descontração.

À família CEACROM por estar sempre presente, colaborando e torcendo por este trabalho. Levarei todos comigo sempre.

Aos funcionários da UESB, especialmente aos vigias, sempre solícitos e alertas durante as madrugadas de trabalho no laboratório.

A todos que participaram, direta ou indiretamente, desta conquista.

Muito obrigada!

A gente tem que sonhar, senão as coisas não acontecem.

(Oscar Niemeyer)

RESUMO

BAUER, L. C. **Efeito da Inclusão de Níveis Crescentes de Orégano Desidratado sobre o Conteúdo de Colesterol e seus Óxidos em Leite Bovino *In Natura*, Pasteurizado e Queijo Tipo Minas Frescal** Itapetinga – BA: UESB, 2013. 64 p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia de Alimentos – Ciência de Alimentos).*

O escopo deste trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de níveis crescentes de orégano desidratado na dieta de vacas leiteiras sobre o conteúdo de colesterol e óxidos de colesterol no leite e queijo tipo Minas frescal obtidos. Para isto, doze vacas mestiças Holandês x Zebu foram alimentadas com volumoso de cana-de-açúcar adicionado de 1% de uréia e sulfato de amônio e concentrado à base de farelo de soja e trigo, milho, premix vitamínico e mineral, além da inclusão de diferentes níveis de orégano na dieta. Previamente foram desenvolvidas e validadas as metodologias de análise simultânea de colesterol e óxidos, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, tanto para leite como para queijo, por cromatografia líquida de alta eficiência. Os dados obtidos foram avaliados através de análise de variância e regressão ao nível de 5% de significância. Os resultados da validação demonstraram que a metodologia poderia ser empregada para análise de todos os compostos no leite, porém no queijo, somente o conteúdo de colesterol poderia ser analisado com confiabilidade. Os resultados mostraram que a inclusão de orégano na dieta das vacas alterou significativamente o conteúdo de colesterol do leite *in natura*, diminuindo seu conteúdo da dieta controle até o nível contendo 1,6% de orégano. Para as amostras de leite pasteurizado e queijo tipo Minas frescal não houve influência da suplementação. Com relação aos óxidos de colesterol, o 7-cetocolesterol não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas e os conteúdos de 25-hidroxicolesterol dos leites também não foram influenciados pelas dietas. O tratamento térmico de pasteurização lenta influenciou as quantidades de colesterol dos leites, havendo uma redução dos conteúdos de colesterol do leite pasteurizado quando comparado ao leite *in natura*. Para os leites provenientes de vacas alimentadas com orégano essa redução foi menor. Assim, a inclusão de orégano nas dietas das vacas pode ser considerada positiva, uma vez que foi capaz de reduzir o conteúdo de colesterol do leite, além de proteger este composto durante o tratamento térmico.

Palavras-Chave: *Origanum vulgare*, produtos lácteos, cromatografia, dieta animal e ruminantes

*Orientador: Julliana Izabelle Simionato, D.Sc., UESB e Co-orientador: Marcelo Franco, D.Sc., UESB.

ABSTRACT

BAUER, L. C. **Effect of increasing levels of Oregano Dehydrated on Cholesterol Content in Milk and its Oxides Veal In Natura, Pasteurized Cheese and type Minas Frescal** Itapetinga - BA: UESB, 2013. 64 p. (Thesis - Master in Food Engineering - Food Science).*

The aims of this study was to evaluate the effect of increasing levels of dried oregano in the diet of dairy cows on the content of cholesterol and cholesterol oxides in milk and cheese type Minas fresh obtained. For this, twelve crossbred Holstein x Zebu were fed roughage with cane sugar added 1% urea and ammonium sulphate and concentrate based on soybean meal and wheat, corn, vitamin premix and mineral, as well as inclusion different levels of oregano in the diet. Previously been developed and validated methodologies for simultaneous analysis of oxides and cholesterol, 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol, both for milk and for cheese. The samples were analyzed by high performance liquid chromatography. Data were evaluated using analysis of variance and regression to the 5% level of significance. The validation results demonstrated that the methodology could be used for analysis of all compounds in milk, in cheese however, only the cholesterol content could be analyzed reliably. From the evaluation of the results it was found that the inclusion of oregano in the diet of cows significantly alter the cholesterol content of raw milk, while for pasteurized milk and cheese type Minas fresh no influence supplementation. Regarding cholesterol oxides, 7-ketocholesterol was not detected in any of the samples and the contents of 25-hydroxycholesterol in milk were not affected by diet. The heat treatment of pasteurization influence the quantities of cholesterol from milk, thus decreasing the cholesterol content of pasteurized milk when compared to fresh milk. For milk from cows fed a oregano this reduction was smaller. Thus, the inclusion of oregano cows on diets may be considered positive, since it is capable of reducing the cholesterol content of milk and also protects this compound during annealing.

Keywords: *Origanum vulgare*, dairy products, chromatography, and ruminant animal diet

* Adviser: Julliana Izabelle Simionato, *D.Sc.*, UESB e Co-Adviser: Marcelo Franco, *D.Sc.*, UESB.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção mundial de leite	16
Tabela 2. Proporção dos ingredientes da dieta nos concentrados e volumoso, com base na matéria seca (%).	32
Tabela 3. Composição química (%) da cana-de-açúcar e dos concentrados e seus respectivos desvios padrão.	33
Tabela 4. Composição química e de ácidos graxos das dietas utilizadas nos diferentes tratamentos, com base na matéria seca (%).	33
Tabela 5. Precisão do método analítico para determinação de colesterol em leite e queijo, expressa pelo coeficiente de variação.	43
Tabela 6. Precisão do método analítico para determinação de óxidos de colesterol em leite e queijo, expressa pelo coeficiente de variação.	44
Tabela 7. Resultados para recuperação (%) do colesterol e óxidos nas amostras de leite.	46
Tabela 8. Resultados para recuperação (%) do colesterol e óxidos nas amostras de queijo.	47
Tabela 9. Quantidade de colesterol e 25-hidroxicolesterol, em mg por 100 mL de leite e mg por 100g de queijo, presentes nas amostras de leite <i>in natura</i> , pasteurizado e queijo tipo Minas frescal.	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química do (a) colesterol livre e (b) esterificado..... 20
- Figura 2.** Formação dos principais óxidos de colesterol encontrados em leite e produtos lácteos..... 23
- Figura 3.** Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos encontrados no orégano..... 25
- Figura 4.** Fluxograma de produção do queijo tipo Minas frescal..... 34
- Figura 5.** Cromatograma característico das amostras de lácteos e espectros de pureza dos picos referentes aos óxidos e ao colesterol; (1) 25-hidroxicolesterol; (2) 7-cetocolesterol e (3) colesterol..... 40
- Figura 6.** Curvas analíticas dos padrões de colesterol (A), 7-cetocolesterol (B) e 25-hidroxicolesterol (C)..... 41
- Figura 7.** Faixa de aplicação das curvas analíticas de colesterol (A), 7-cetocolesterol (B) e 25-hidroxicolesterol (C)..... 42
- Figura 8.** Efeito da inclusão de orégano desidratado no conteúdo do colesterol do leite *in natura*..... 49
- Figura 9.** Quantidade de colesterol (mg por 100 mL de leite) para os diferentes tratamentos antes e após o tratamento térmico..... 51
- Figura 10.** Diminuição percentual do conteúdo de colesterol no leite pasteurizado em comparação ao leite *in natura*..... 52

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µm	Micrometros
µg.g ⁻¹	Microgramas por grama
µg.mL ⁻¹	Microgramas por mililitro
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kapa
7-ceto	7-cetocolesterol
7-OH	7-hidroxicolesterol
25-OH	25-hidroxicolesterol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Hidroxianisol Butilado
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
CNF	Carboidrato Não Fibrosos
cód	Código
CV%	Coefficiente de Variação
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
di	Diâmetro Interno
EE	Extrato Etéreo
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FDN _{cp}	Fibra Detergente Neutro Livre de Cinzas e Proteínas
g	Gramas
HEM	Hemicelulose
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial
KOH	Hidróxido de Potássio
LD	Limite de Detecção
Lig	Lignina
LGC	Laboratory of the Government Chemist
LQ	Limite de Quantificação
mg	Miligrama
mg.L ⁻¹	Miligrama por litro

mL	Mililitro
mL.min ⁻¹	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
MO	Matéria Orgânica
MS	Matéria Seca
nm	Nanômetro
n.s.	Não significativo
NIST	National Institute of Standards and Technology
OsC	Óxidos de Colesterol
p/v	Peso por volume
P.A.	Pureza Analítica
PB	Proteína Bruta
PG	Galato de Propila
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
R ²	Coefficiente de Determinação
s	Estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação
S	Coefficiente angular da curva analítica
TBHQ	Terc-Butil-Hidroquinona
Triol	Colestanotriol
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Cadeia Produtiva do Leite Bovino.....	16
2.2 Principais Constituintes do Leite.....	17
2.3 Colesterol.....	19
2.4 Óxidos de Colesterol.....	21
2.5 Antioxidantes.....	23
2.6 Orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	24
2.7 Análise do Teor de Colesterol e Óxidos de Colesterol em Alimentos.....	26
2.8 Validação de Métodos Cromatográficos.....	28
3. OBJETIVO.....	30
3.1. Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Local do Experimento.....	31
4.2 Delineamento Experimental para Obtenção do Leite.....	31
4.3 Composição Químico-Bromatológica das Dietas.....	32
4.4 Amostragem.....	34
4.5 Procedimento Experimental.....	35
4.5.1 Extração do Colesterol e Óxidos do Leite e Queijo.....	35
4.5.2 Análise Cromatográfica.....	35
4.5.2.1 Identificação dos Analitos.....	36
4.5.3 Validação do Método Analítico.....	36
4.5.3.1 Seletividade.....	37
4.5.3.2 Linearidade e Faixa de Aplicação.....	37
4.5.3.3 Repetitividade e Precisão Intermediária.....	38
4.5.3.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	38
4.5.3.5 Recuperação.....	38
4.5.4 Quantificação do Colesterol e Óxidos no Leite e Queijo.....	39

4.6 Análises Estatísticas.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Validação.....	40
5.1.1 Seletividade.....	40
5.1.2 Linearidade e Faixa de Aplicação.....	40
5.1.3 Repetitividade e Precisão Intermediária.....	43
5.1.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	45
5.1.5 Teste de Recuperação.....	45
5.2 Análise do Colesterol e Óxidos de Colesterol.....	47
5.2.1 Quantificação do Colesterol e Óxidos no Leite e Queijo tipo Minas frescal.....	47
5.2.2 Influência do Tratamento Térmico sobre o Teor de Colesterol e 25-hidroxicolesterol presentes no Leite.....	50
6 CONCLUSÃO.....	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas a cadeia produtiva do leite tem se mostrado um dos setores agroalimentares brasileiros mais dinâmicos. Nesse período, um conjunto substancial de alterações envolvendo maior abertura ao mercado externo, desregulamentação pública do mercado, crescimento do capital estrangeiro e inovações técnicas e organizacionais provocaram uma verdadeira revolução no setor (CHADDAD, 2007). Este cenário, aliado a busca dos consumidores por alimentos cada vez mais saudáveis e de maior durabilidade e praticidade, obriga os produtores e indústrias a buscarem alternativas que diminuam os custos da produção e agreguem valor ao produto, melhorando suas características e conseqüentemente sua remuneração. O manejo nutricional dos animais é uma alternativa viável para melhoria da qualidade dos lácteos e aumento da competitividade dos produtores e da indústria.

O leite é considerado um dos alimentos mais completos da natureza. Apresenta composição rica em proteínas, vitaminas, gorduras, carboidratos e sais minerais essenciais aos seres humanos (TAMANINI *et al.*, 2007). É produzido na glândula mamária de mamíferos, no período da lactação. Sua síntese ocorre a partir de elementos que passam do sangue para as células especializadas da glândula. Desta forma, sua composição química é fortemente influenciada pela natureza da dieta ingerida pelas vacas, principalmente no que se refere a seu conteúdo em lipídios e proteínas (FREDEEN, 1996).

O colesterol é um lipídio presente nas gorduras de origem animal, inclusive a do leite. Seu conteúdo nos alimentos tem sido considerado maléfico para uma dieta saudável, pois seu consumo em excesso tem sido relacionado principalmente a doenças coronarianas (SCHER & RIBEIRO, 2009).

Além disso, por ser uma molécula insaturada, o colesterol é muito susceptível à oxidação. Os processos oxidativos ocorrem principalmente durante o processamento dos alimentos (SARANTINOS *et al.*, 1993), dando origem aos compostos conhecidos como óxidos de colesterol. Estes óxidos apresentam características aterogênicas, citotóxicas, cancerígenas e mutagênicas (BAGGIO & BRAGAGNOLO, 2004; MORALES-AIZPÚRUA & TENUTA-FILHO, 2002; KENDAL *et al.*, 1992; PENG *et al.*, 1991; SEVANI & PETERSON, 1986; SPORER *et al.*, 1982; PETRAKIS *et al.*, 1981).

Dentre as alternativas alimentares para o manejo nutricional dos animais, visando produtos com melhor qualidade e mais competitivos, encontra-se o uso de antioxidantes naturais na suplementação de sua dieta. Estes compostos podem ser incluídos na alimentação das vacas na tentativa de melhorar as características nutricionais do leite e aumentar sua resistência à oxidação. Além de evitar a oxidação lipídica, a incorporação de compostos com atividade antioxidante nos alimentos pode trazer benefícios aos consumidores quanto à prevenção de doenças degenerativas. Assim, quando o consumidor ingere produtos alimentícios naturalmente ricos nessas substâncias, ou ainda, enriquecidos com essas espécies, pode promover efeitos benéficos para a saúde. Tais perspectivas fazem com que vários pesquisadores venham investigando o enriquecimento nutricional de alimentos a partir de plantas (TORRES *et al.*; 2007; BORNEO & AGUIRRE, 2008; PRABHASANKAR *et al.*, 2009).

O óleo de orégano contém antioxidantes fenólicos que reagem com lipídios e radicais hidroxila e os convertem em produtos estáveis (JADHAV *et al.*, 1996; YANISHLIEVA-MASLAROVE, 2001). Seus efeitos relacionados à proteção oxidativa de lipídios após suplementação animal já foram reportados por diversos autores (BOTSOGLOU *et al.*, 2002; GIANNENAS *et al.*, 2005; GOVARIS *et al.*, 2004; BOTSOGLOU *et al.*, 2004; GÓMEZ, MENDONÇA-JÚNIOR & MANCINI-FILHO, 2003; TRAESEL *et al.*, 2011). Contudo, esta pesquisa é pioneira nos estudos relativos ao efeito da suplementação com orégano desidratado na alimentação de bovinos e a influência sobre a oxidação dos lipídios do leite, em especial o colesterol.

Dessa forma, devido a necessidade de estudos que aprofundem conhecimentos em como a formulação de dietas altera a composição do leite em uma determinada característica, o objetivo deste experimento foi investigar o efeito da inclusão de orégano desidratado na alimentação de vacas leiteiras sobre o conteúdo total de colesterol e dos óxidos de colesterol, 25-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol, em leites, *in natura* e pasteurizado, e no queijo tipo Minas frescal processado a partir deste leite.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cadeia Produtiva do Leite Bovino

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, sendo que em 2010 ocupou o quinto lugar em termos de produção (Tabela 1). No entanto, quando o assunto é produtividade, torna-se evidente a necessidade de técnicas de manejo que coloquem este país em um melhor patamar. No Brasil a produtividade média é de 1.680 kg/vaca/ano contra 9.590 kg/vaca/ano nos Estados Unidos, primeiro colocado do *ranking* (USDA, 2011).

A colocação brasileira no *ranking* de países produtores se deve ao fato do seu extenso rebanho. De acordo com a Pesquisa da Pecuária Municipal, o rebanho bovino brasileiro foi estimado em 209,5 bilhões de cabeças, sendo que deste total, 22,9 milhões eram de vacas que foram ordenhadas no ano de 2010 (IBGE, 2010a).

Tabela 1. Produção mundial de leite.

	Leite Fluido em Mil Toneladas				
	2006	2007	2008	2009	2010*
Canadá	8.041	8.212	8.270	8.280	8.350
México	10.051	10.657	10.907	10.866	11.176
Estados Unidos	82.455	84.211	86.174	85.874	87.450
Argentina	10.200	9.550	10.010	10.350	10.600
Brasil	25.230	26.750	27.820	28.795	29.480
União Européia	132.206	132.604	133.848	133.700	134.200
Rússia	31.100	32.200	32.500	32.600	31.740
Ucrânia	12.890	11.997	11.524	11.370	10.950
Índia	41.000	42.890	44.500	48.160	50.300
China	31.934	35.252	34.300	28.445	29.100
Japão	8.137	8.007	7.982	7.910	7.790
Austrália (1)	10.395	9.870	9.500	9.326	9.400
Nova Zelândia (2)	15.200	15.640	15.141	17.397	16.897
Mundo/Total	420.845	429.847	434.484	435.082	437.433

* Dados preliminares

(1) Dados referentes ao ano terminado em 30 de junho do ano corrente

(2) Dados referentes ao ano terminado em 31 de maio do ano corrente

Fonte: Adaptada de USDA, 2011

A região Sudeste é a maior produtora de leite do Brasil, contribuindo com 35,55% do total de litros produzidos em 2010, seguida pelas regiões Sul (31,29%), Centro-Oeste (14,48%), Nordeste (13,02%) e Norte (5,66%). Com relação à região Nordeste, o estado da Bahia é o que apresenta a maior produção, sendo que no mesmo ano, contribuiu com 1,2 bilhões de litros de leite, o que representou 4% de toda a produção nacional (IBGE, 2010b).

O leite é um dos produtos que apresenta elevadas possibilidades de crescimento dentro do setor agroindustrial, a produtividade brasileira ainda é pequena e pode ser ampliada, o país possui um extenso território destinado a criação de bovinos, que também pode ser utilizado para o gado leiteiro. Segundo projeções da Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura a produção deverá crescer a uma taxa anual de 1,95% e o consumo deverá aumentar 1,98% ao ano pelos próximos 10 anos (AGE/MAPA, 2010). O avanço ano a ano do consumo do leite está diretamente ligado ao aumento de renda. Tradicionalmente, quanto maior a renda de uma família, mais ela consome leite e derivados, sendo que, em média, para cada 1% de aumento da renda, o consumo de lácteos no Brasil aumenta 0,5%. As famílias podem não aumentar a quantidade consumida de leite fluido, mas podem passar a consumir mais derivados (AGRIPOINT, 2011).

Em 2009, segundo dados da Pesquisa de Orçamento Familiar, o consumo médio per capita brasileiro de lácteos foi equivalente a 135,2 litros de leite. Este valor é 32,4% menor ao recomendado, para ingestão deste alimento, pelo Ministério da Saúde. Dos 105 produtos listados na pesquisa, o leite integral foi o 11º alimento mais consumido. Além dele, constavam na lista 10 outros produtos produzidos a partir do leite, entre eles queijos e manteiga, que quando somados representam 6,3% de tudo o que o brasileiro consome durante o dia. Ainda segundo a pesquisa, o leite mais adquirido foi o pasteurizado (25,64 L/habitante/ano) e entre os queijos, o destaque é para o tipo Minas frescal (0,683kg/habitante/ano) (IBGE, 2009).

2.2 Principais Constituintes do Leite

A biossíntese do leite de vaca ocorre na glândula mamária, sob controle hormonal, a partir de nutrientes fornecidos pelo sangue e epitélio glandular. Estes nutrientes são provenientes diretamente da dieta ou são produtos modificados nos tecidos dos animais antes de alcançar a glândula (FRANDSOM *et al.*, 2003; BEHMER,

1991). Alguns componentes do leite, como as proteínas e os ácidos graxos, originam-se, em pequena parte, do plasma sanguíneo em condição pré-formada, sendo a maior proporção sintetizada na glândula mamária, a partir de precursores. As vitaminas e os minerais são obtidos diretamente do plasma sanguíneo, enquanto que a lactose é sintetizada exclusivamente no úbere (WALSTRA *et al.*, 2001).

Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias, das quais algumas estão em emulsão (gorduras), algumas em suspensão (caseínas) e outras em dissolução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro e sais minerais) (GALVÃO JÚNIOR *et al.*, 2010; PEREDA *et al.*, 2005).

A composição média do leite bovino é de 4,8% de lactose, 4,0% de gordura, 3,5% de proteínas, 0,7% de sais minerais e 87% de água (MONTEIRO *et al.*, 2007). Entretanto, segundo Ordóñez (2005), podem haver variações nesta composição, devido a diferenças entre raças, características individuais, intervalos entre as ordenhas, fase da lactação, composição da dieta, além de influências sazonais e climáticas. Por exemplo, a gordura e as proteínas são os componentes mais variáveis, sendo que a alimentação responde por aproximadamente 50% das suas variações, mas praticamente não afeta o conteúdo de lactose (FREDEEN, 1996).

A gordura do leite é secretada das células epiteliais mamárias na forma de glóbulos, que variam em tamanho de 0,1 a 10 μm e em número de aproximadamente 15×10^9 glóbulos por mililitro, rodeados por uma membrana lipoproteica similar à das células epiteliais e que ajuda a estabilizá-los, formando uma emulsão no ambiente aquoso que é o leite. O glóbulo de gordura do leite é composto principalmente de trigliceróis (98%), contendo também outros lipídios, como fosfolipídios (1,11%) e colesterol (0,46%) (MANZI & PIZZOFERRATO, 2010; JENSEN, 2002; BURGESS, 2001).

O colesterol, principal esteróide do leite, situa-se na membrana que envolve o glóbulo de gordura, 85% dele é introduzido no leite durante a pinocitose das gotículas lipídicas, através da membrana plasmática dentro do lúmen do alvéolo, e o restante é produzido durante a *síntese de novo* (CERUTTI *et al.*, 1993; EVERS 2004). Como o colesterol ocorre na membrana dos glóbulos de gordura, sua concentração está relacionada à quantidade de gordura no leite e também ao tamanho das gotículas, sendo que quanto menores elas forem, maior também será a quantidade de colesterol total do leite (SWAISGOOD, 2010). Em média, o conteúdo de colesterol do leite integral é de

12 mg por 100 mL (SOUZA & VISENTAINER, 2011), podendo sofrer variações. Piironem *et al.* (2002) avaliando amostras comerciais finlandesas encontraram valores entre 5,6 e 6,4 mg de colesterol em 100 g de leite; Saldanha, Mazalli e Bragagnolo (2004) avaliando amostras comerciais brasileiras encontraram valores médios para o colesterol de 9,75mg/100g de leite e Manzi e Pizzoferrato (2010), avaliando amostras comerciais italianas encontraram valores entre 10,4 e 11,3 mg por 100 g de leite integral.

O teor de gordura do leite é particularmente importante, tanto economicamente como do ponto de vista dietético. O leite de vaca possui cerca de 440 ácidos graxos diferentes, dos quais aproximadamente 70% dos ácidos graxos são saturados, 25% são monoinsaturados e 5% constituem-se de ácidos graxos poli-insaturados. Quanto ao tamanho da cadeia carbônica pode-se dizer que ao redor de 30% são de cadeia longa e o restante corresponde a ácidos graxos de cadeias curta e média (GRUMMER, 1991).

As proteínas do leite são de fácil digestão e de alto valor biológico, contém os aminoácidos essenciais em quantidade e proporções adequadas. Dentre as proteínas do leite, a mais importante é a caseína (85% do total), sendo que existem vários tipos de caseínas identificados: α , β , γ , κ , todas similares na sua estrutura. As caseínas se agregam formando grânulos insolúveis chamados micelas, essas micelas são compostas, além das caseínas, de minerais, principalmente cálcio e fósforo, que garantem a estabilidade da suspensão coloidal no leite (GONZÁLES, 2001).

Já no soro do leite, as principais proteínas encontradas são a alfa-lactoalbumina e a beta-lactoglobulina (produzidas na glândula mamária), a albumina sérica (produzida pelo fígado) e as imunoglobulinas (produzidas pelos linfócitos). Sendo que a beta-lactoglobulina representa aproximadamente 50% do total das proteínas do soro, é a principal proteína do soro nos ruminantes e não é encontrada no leite de muitas outras espécies, incluindo o leite humano (FARRELL *et al.*, 2004).

2.3 Colesterol

O colesterol é um esteróide de origem animal formado por um núcleo policíclico composto por três anéis de seis carbonos (A, B e C) e um com cinco (D), uma cadeia alifática ligada ao carbono 17 no anel D e um grupo hidroxila ligado ao carbono 3 do anel A (Figura 1a), podendo também estar esterificado a cadeias de ácidos graxos

formando ésteres de colesterol (Figura 1b) (MC CLEMENTS & DECKER, 2010; VOET *et al.*, 2000).

Apresenta múltiplas funções no organismo, é componente da célula, onde desempenha uma importante função estrutural e funcional na membrana plasmática, regulando a fluidez da mesma, é precursor metabólico das várias formas da vitamina D e dos hormônios esteroidais, como por exemplo, estrogênios e androgênios (VOET *et al.*, 2000). Ainda participa da síntese dos ácidos biliares, na digestão e absorção dos lipídios e vitaminas lipossolúveis (LUDKE & LÓPEZ, 1999).

Segundo Souza e Visentainer (2011), a maior parte do colesterol do organismo, aproximadamente 70%, origina-se da biossíntese no fígado (colesterol endógeno), enquanto apenas 30% é fornecido pela dieta (colesterol exógeno), através da ingestão de alimentos de origem animal, como ovos, carnes, leite e derivados. Quando a alimentação é rica em colesterol, ocorre uma inibição de sua síntese endógena, por outro lado, a redução muito acentuada de colesterol no alimento pode aumentar sua síntese (HARPER, 1993).

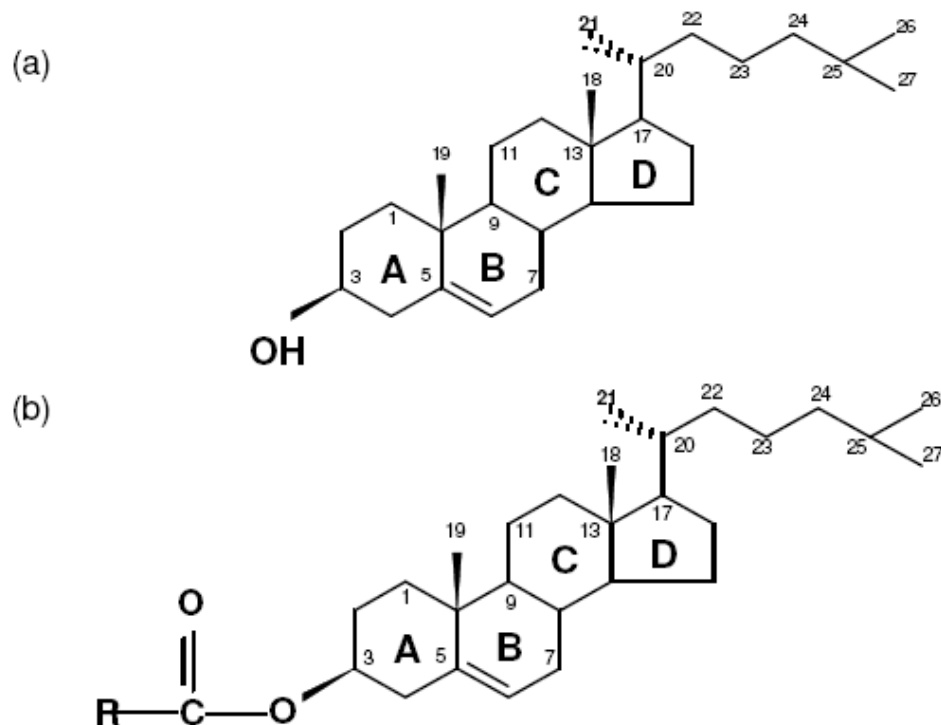


Figura 1. Estrutura química do (a) colesterol livre e (b) esterificado. Fonte: MEDINA, 2009.

Quando em excesso (hipercolesterolemia), o colesterol pode se depositar nas paredes das artérias determinando um processo conhecido como aterosclerose. Além

disso, esse excesso pode levar a formação de cálculos biliares e alterações nas sínteses de hormônios esteroidais (FORNES *et al.*, 2002). Assim, o potencial de uma dieta ou de um alimento em aumentar os níveis de colesterol sérico e em promover aterosclerose está diretamente relacionado ao seu conteúdo de colesterol, havendo correlação entre incidência de doenças ateroscleróticas, níveis de lipídios séricos e hábitos alimentares (SCHER & RIBEIRO, 2009).

2.4 Óxidos de Colesterol

Por ser um composto insaturado, o colesterol é instável e suscetível à oxidação. Os produtos de sua oxidação são comumente conhecidos como óxidos de colesterol (OsC) e podem ser formados tanto de forma endógena, basicamente no fígado e nos tecidos geradores de hormônios esteróides (córtex supra-renal, gônadas), quanto ingeridos na dieta (SALDANHA *et al.*, 2006). As fontes principais de OsC na dieta humana são alimentos processados de origem animal, como ovos em pó ou produtos que tragam em sua formulação este ingrediente, leite em pó, carne e peixe desidratados e gorduras animais aquecidas (SALDANHA *et al.*, 2006; GUARDIOLA *et al.*, 1996), sendo que os produtos lácteos são caracterizados por um baixo conteúdo de OsC, o menor dentre todos os produtos de origem animal (ORCZEWSKA-DUDEK *et al.*, 2012).

A estrutura química dos óxidos de colesterol é semelhante à do colesterol, porém contém um grupo funcional adicional, que pode ser uma cetona, uma hidroxila ou um grupo epóxido, no núcleo do esterol ou na cadeia lateral da molécula (UBHAYASEKERA, VERLEYEN & DUTTA, 2004). Isso faz com que os OsC apresentem propriedades deletérias importantes, com características citotóxicas, cancerígenas, mutagênicas e aterogênicas, possivelmente mais significativas para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas que o próprio colesterol, (SIEBER, 2005; BAGGIO & BRAGAGNOLO, 2004; MORALES-AIZPÚRUA & TENUTA-FILHO, 2002; TAY *et al.*, 1999; HIGLEY & TAYLOR, 1986). Além de serem potentes inibidores da síntese de colesterol (MORIN *et al.*, 1991) e estarem ligados a processos inflamatórios, como artrite reumatóide, e doenças degenerativas, como Parkinson e Alzheimer (SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2010).

Já foram identificados mais de 80 tipos diferentes de OsC, sendo 8 os mais frequentemente encontrados em alimentos. São eles - o 7-Cetocolesterol, o 20-

hidroxicolesterol, o 25-hidroxicolesterol, o 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, os 5,6-colesterol-epóxidos (α e β) e o colestanoetriol (TAY *et al.*, 1999; MORALES-AIZPÚRUA & TENUTA-FILHO, 2002; TENUTA-FILHO *et al.*, 2003).

Entre esses, os óxidos relacionados ao carbono 7 têm sido encontrados em concentrações mais elevadas, sendo por isso considerados como indicadores da oxidação do colesterol nos alimentos (MORALES-AIZPÚRUA & TENUTA-FILHO, 2002). Já o 25-hidroxicolesterol e o colestanoetriol são os agentes considerados causadores da aterosclerose e os 5,6-colesterol-epóxidos são os óxidos com maior atividade carcinogênica (OSADA, 2002).

Alimentos frescos de origem animal simplesmente não apresentam OsC ou apresentam quantidades extremamente pequenas, em nível de traços, destes compostos (PIE *et al.*, 1991; SARANTINOS *et al.*, 1993). Nos alimentos, a oxidação é influenciada principalmente pela presença do oxigênio e outros fatores como a atividade de água, exposição à luz, temperaturas elevadas, radiação ionizante, radicais livres e íons metálicos (SIEBER, 2005; BARRIUSO *et al.*, 2012). Assim, o perfil dos óxidos formados e as suas quantidades correspondentes dependem além destes fatores, da composição e interação entre os componentes do alimento e os produtos de decomposição durante o processamento e/ou estocagem, ocorrendo por mecanismos não-enzimáticos, como autooxidação e oxidação fotoquímica, sendo o primeiro o mais conhecido (MORALES-AIZPÚRUA & TENUTA-FILHO, 2002).

Embora inúmeros OsC já tenham sido identificados, no leite e seus derivados, os óxidos 25-hidroxicolesterol (25-OH), os epímeros de 7-hidroxicolesterol (α e β) (7-OH), o 7-cetocolesterol (7-ceto), os 5,6-colesterol-epóxidos (α e β) e o colestanoetriol (Triol) são os detectados em maior quantidade (PANIANGVAIT *et al.*, 1995; NIELSEN *et al.*, 1995; NIELSEN *et al.*, 1996). A concentração destes compostos é aumentada de acordo com a temperatura e tempo de estocagem dos produtos, principalmente em leite em pó, queijos e manteiga (STATON & DEVERY, 2002). Entretanto, há controvérsias a respeito do assunto, sendo que há relatos sugerindo que os conteúdos de OsC em leite e produtos lácteos são muito pequenos (SIEBER, 2005).

As etapas de formação dos principais OsC encontrados no leite e derivados lácteos estão demonstradas na Figura 2. O mecanismo de oxidação do colesterol é muito semelhante ao dos ácidos graxos. Após abstração de um átomo de hidrogênio, seja pela ação de radiação, calor ou radicais livres, há formação de um radical. Os primeiros radicais livres formados parecem estar localizados nas posições 7 e 25, sendo que os

óxidos formados na posição 7, como 7-OH (α e β) e, após desidratação, o 7-ceto, são os encontrados de forma mais abundante, devido a sua maior estabilidade. Com o avanço da oxidação do alimento, outros óxidos são formados, através de mecanismos de reação bimolecular, onde os 5,6-colesterol-epóxidos (α e β) são formados pela interação do colesterol e um hidroperóxido, e posterior hidratação para formação de Triol (LERCKER & RODRIGUEZ-ESTRADA, 2002).

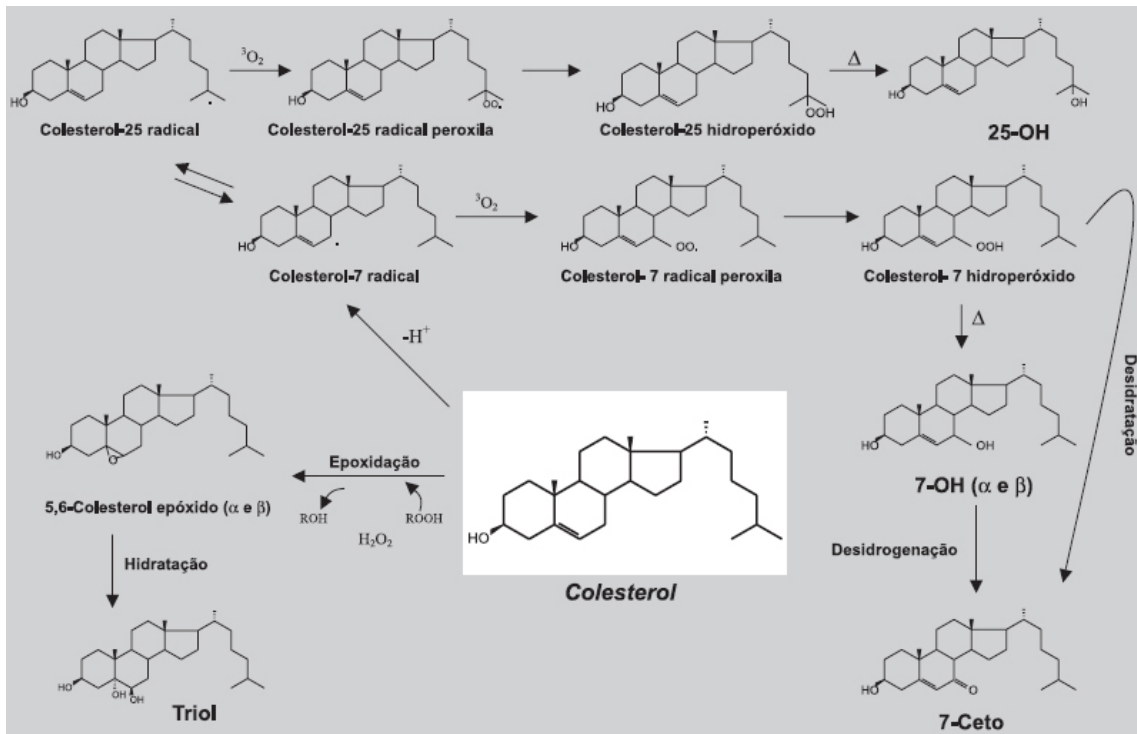


Figura 2. Formação dos principais óxidos de colesterol encontrados em leite e produtos lácteos. Fonte: MORALES-AIZPÚRUA & TENUTA-FILHO, 2002.

2.5 Antioxidantes

Antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES & STAHL, 1995; BIANCHI & ANTUNES, 1999). Existem diferentes mecanismos de ação para compostos com capacidade antioxidante, muitos atuam retardando a oxidação dos lipídios pela remoção de radicais livres, inibindo, portanto, a iniciação e propagação das etapas da oxidação; outros atuam controlando a ação de pró-oxidantes, através da complexação com metais, principalmente ferro e

cobre, ou pelo bloqueio de espécies reativas de oxigênio (MC CLEMENTS & DECKER, 2010).

Os compostos sintéticos tem que atender alguns pré-requisitos para que possam ser usados na indústria de alimentos como antioxidantes. Não devem ser tóxicos, devem apresentar alta atividade em baixas concentrações, se concentrarem na fase graxa do alimento e resistirem às condições de processamento a que o alimento será exposto (REGITANO-d'ARCE, 2006).

O principal tipo de antioxidante utilizado na indústria de alimentos é o sintético, com destaque para o butil-hidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o galato de propila (PG), o terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992; SHAHIDI, 2000). Pesquisadores apontam os possíveis malefícios à saúde decorrentes do efeito acumulativo dos antioxidantes sintéticos. Consequentemente novas alternativas têm sido buscadas para a substituição destes (ARABSHAHI-DELOUEE & UROOJ, 2007; BARLOW, 1990; NAMIKI, 1990).

Há um número crescente de pesquisas para o desenvolvimento e utilização de antioxidantes de fontes naturais, que estão presentes em plantas, microrganismos e tecidos animais. Tais compostos são na sua maioria fenólicos, entre os quais destacam-se os tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

Entre as ervas com capacidade antioxidante comprovada, alecrim e sálvia já foram especialmente estudadas devido à presença de inúmeros compostos com potencial antioxidante (POKORNY, 1991), entretanto outras também tem sido alvo de estudos, como por exemplo o orégano (PIZZALE *et al.*, 2002; GOVARIS *et al.*, 2004; TSIMOGIANNIS *et al.*, 2006; GRÜN *et al.*, 2006).

2.6 Orégano (*Origanum vulgare*)

O orégano (*Origanum vulgare*) é um dos condimentos mais populares do mundo. O gênero *Origanum* possui várias espécies, sendo que sua grande maioria é originária do Mediterrâneo, contudo também são cultivadas por toda Europa, leste e centro da Ásia, até Taiwan. Também é encontrado nas Américas, sendo que na América do Sul o principal produtor é o Chile, seguido pela Bolívia e Peru (CLEFF *et al.*, 2009). O Brasil, apesar de grande consumidor, ainda produz em pequena escala, importando a erva de outros países, como o Chile (CORRÊA *et al.*, 2012).

A importância da pesquisa sobre o orégano não está relacionada somente ao seu uso como condimento, mas às suas propriedades diferenciadas: antifúngicas, antibacterianas (ELGAYYAR *et al.*, 2001), antivirais, anticarcinogênicas, antimutagênicas, anti-inflamatórias, hipolipidêmicas (LAMPE, 2003; SRINIVASAN, 2005; HOSSAIN *et al.*, 2011) e antioxidantes (ECONOMOU *et al.*, 1991; VEKIARI *et al.*, 1993; EXARCHOU *et al.*, 2002; PIZZALE *et al.*, 2002; TSIMOGIANNIS *et al.*, 2006). Tais propriedades estão relacionadas aos compostos fenólicos presentes na planta, principalmente carvacrol, ácido rosmarínico, ácido caféico e timol (Figura 3) (ZHENG & WANG, 2001; EXARCHOU *et al.*, 2002; PIZZALE *et al.*, 2002; TSIMOGIANNIS *et al.*, 2006).

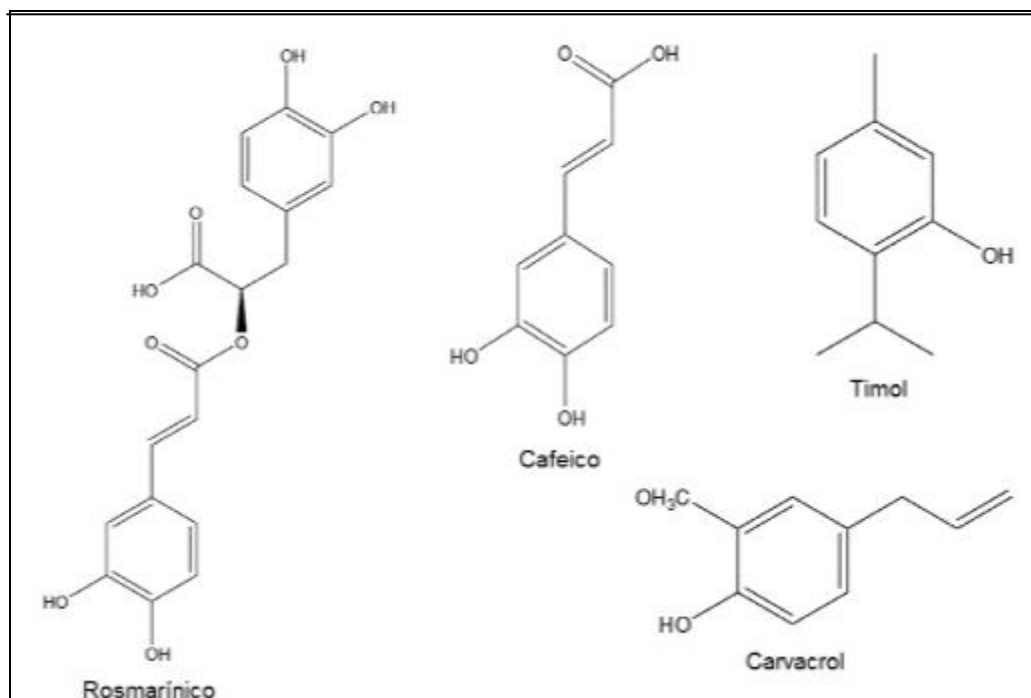


Figura 3. Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos encontrados no orégano. Fonte: DEL RÉ & JORGE, 2012.

Enfatizando-se a proteção antioxidante, diversos estudos reportam os efeitos relacionados à proteção oxidativa de lipídios através da suplementação da dieta de animais monogástricos com orégano. Foram verificados efeitos em frangos de corte, perus e coelhos após estocagem a 4 e 20°C (BOTSOGLOU *et al.*, 2002; GIANNEMAS *et al.*, 2005; GOVARIS *et al.*, 2004; BOTSOGLOU *et al.*, 2004), além do efeito protetor sobre gemas de ovos de galinhas poedeiras e a redução na peroxidação de lipídios plasmáticos de frangos de corte (GÓMEZ *et al.*, 2003; TRAESEL *et al.*, 2011).

2.7 Análise de Colesterol e Óxidos de Colesterol em Alimentos

Segundo revisão realizada por Sieber (2005), diferentes métodos analíticos foram desenvolvidos para quantificação de colesterol e OsC em alimentos, dentre eles os mais utilizados são a cromatografia em fase gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que são também aplicáveis ao leite e derivados lácteos.

A cromatografia gasosa já foi a técnica mais utilizada para análise, no entanto, com o aprimoramento de novas metodologias ela tem sido substituída. A quantificação por CG exige etapas adicionais de purificação e derivatização dos analitos que servem para evitar o aparecimento de picos interferentes e melhorar a estabilidade dos compostos, principalmente do colesterol e hidroxicolesteróis (GUARDIOLA *et al.*, 2002). Além disso, as altas temperaturas utilizadas durante a separação na CG podem também destruir termicamente o colesterol e os hidroperóxidos ou favorecer a formação de artefatos (BAGGIO & BRAGAGNOLO, 2004; YAN & WHITE, 1990). Os artefatos são óxidos originados durante as etapas de preparo e/ou análise da amostra e que não estavam presentes originalmente ou estavam em quantidades inferiores aquelas analisadas (BUSCH & KING, 2010).

Dessa forma, atualmente a maioria dos trabalhos publicados envolvendo a separação, identificação e quantificação de colesterol e óxidos de colesterol utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (PLOZZA *et al.*, 2012; AHN *et al.*, 2012; MANZI & PIZZOFERRATO, 2010; SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2010; DANESHFAR, KHEZELI & LOTFI, 2009). Esta técnica propicia um número menor de etapas de preparo da amostra, minimizando a probabilidade de uma série de erros decorrentes do processo, onde basicamente a saponificação e a escolha adequada do solvente extrator são necessárias para o isolamento dos analitos. Além disso, como comumente a CLAE não utiliza altas temperaturas durante a análise a possibilidade de oxidação e decomposição dos analitos é minimizada (ULBERTH & BUCHGRABER, 2002).

A saponificação dos lipídios tem como objetivos primordiais remover os acilgliceróis do extrato bruto dos lipídios (através da transformação deles em sabão e glicerol livre) e hidrolisar os ésteres de colesterol (ULBERTH & BUCHGRABER, 2002), sendo que a reação pode ser conduzida após a extração dos lipídios (VELARDE & GONZÁLEZ, 2006; RAITH *et al.*, 2005; ESCARABAJAL & TENUTA-FILHO, 2005; MORALES-AIZPURÚA & TENUTA-FILHO, 2005; TENUTA-FILHO *et al.*,

2003; LERCKER & RODRIGUEZ-ESTRADA, 2002) ou pela saponificação direta da amostra (MANZI & PIZZOFERRATO, 2010; SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2010; TALPUR *et al.*, 2006; VISENTAINER *et al.*, 2005; SALDANHA *et al.*, 2004; KATSANIDIS & ADDIS, 1999; NIXDORF, MATSUSHITA & SOUZA, 1997).

As condições em que a reação de saponificação ocorre podem produzir artefatos. Isso leva a maioria dos pesquisadores à preferência de conduzir tal processo à temperatura ambiente (saponificação fria), evitando ou minimizando, assim, a geração desses compostos e a decomposição dos analitos pela exposição às altas temperaturas (SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2010; SALDANHA *et al.*, 2006; VELARDE & GONZÁLEZ, 2006; ESCARABAJAL & TENUTA-FILHO, 2005; MORALES-AIZPURÚA & TENUTA-FILHO, 2005; DIONISI *et al.*, 1998).

Dionisi *et al.* (1998) comparando quatro métodos de extração de OsC em leite em pó, saponificação fria direta das amostras e outros três com extração prévia dos lipídios e posterior saponificação fria, concluíram que o melhor procedimento foi a saponificação direta já que este apresentou boa repetibilidade, precisão, formação mínima de artefatos (<0,05% do colesterol total), além de menor tempo de preparo e consumo de solventes.

Busch e King (2010) estudando a estabilidade do colesterol e 7-cetocolesterol em diferentes condições de saponificação observaram uma perda de cerca de 50% do óxido quando este era exposto às temperaturas mais elevadas (37 e 45°C) em comparação à temperatura ambiente (24°C). além disso, a formação do produto de desidratação colesta-3,5-dieno-7-ona foi até 398% superior quando a saponificação foi realizada nas temperaturas superiores, demonstrando a elevada susceptibilidade térmica do óxido. Para o colesterol, esse demonstrou-se mais estável, havendo perda do composto apenas quando a saponificação foi realizada a 45°C, sendo que nesta condição, a recuperação foi de cerca de 70%.

Com relação ao solvente extrator utilizado, diferentes solventes podem ser empregados, contudo, a maioria dos autores utiliza o n-hexano, que é capaz de extrair tanto o colesterol como os óxidos que possuem um caráter mais polar (SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2010; SALDANHA *et al.*, 2006; ESCARABAJAL & TENUTA-FILHO, 2005; MORALES-AIZPURÚA & TENUTA-FILHO, 2005; SALDANHA *et al.*, 2004; TENUTA-FILHO *et al.*, 2003; DIONISI *et al.*, 1998).

2.8 Validação de Métodos Cromatográficos

A validação de uma metodologia consiste no desenvolvimento e posterior controle das etapas analíticas de uma análise implantada em um laboratório, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios - a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE número 899, de 29/05/2003, com poder de lei, e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 (LANÇAS, 2009).

Existem dois tipos básicos de validação - o primeiro chamado de validação no laboratório, que consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. O segundo denominado validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação (RIBANI *et al.*, 2004).

Seja a validação no laboratório ou a completa, ela deve seguir algumas etapas, que conferem se o método fornece resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas. Os parâmetros analíticos envolvem seletividade, linearidade, intervalo de trabalho ou faixa de aplicação, exatidão, precisão, robustez e os limites de detecção e quantificação (BRITO *et al.*, 2003).

Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância na presença de outras, tais como impurezas, produtos de degradação e outros componentes da matriz (BRASIL, 2003).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação, e a faixa linear dinâmica ou intervalo de trabalho ou faixa de aplicação é o intervalo de massa ou concentração da espécie medida, no qual se pode construir uma curva analítica linear (RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (LANÇAS, 2004). Comumente ela é determinada através da análise de materiais certificados de referência, que são materiais acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada, além de serem fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST (National Institute of Standards and Technology - USA), LGC (Laboratory of the Government Chemist - UK), USP, FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme - UK) (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão consiste em representar a dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 1995; INMETRO, 2003).

A robustez consiste em medir a sensibilidade que o método apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros, como por exemplos pequenas variações de fluxo de solventes, temperatura de análise ou troca de analista (INMETRO, 2003).

Por fim, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são respectivamente, a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, e a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com precisão garantida sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 1995; INMETRO, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da inclusão de orégano desidratado na alimentação de vacas leiteiras sobre o conteúdo total de colesterol e dos óxidos, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, do leite *in natura* e pasteurizado, bem como do queijo tipo Minas frescal produzido a partir dele.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver e validar uma metodologia, com uso da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, para análise simultânea do colesterol e dos óxidos de colesterol no leite;
- b) Desenvolver e validar uma metodologia, com uso da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, para análise simultânea do colesterol e dos óxidos de colesterol em queijo tipo Minas frescal;
- c) Verificar e quantificar o colesterol total e os produtos oxidativos, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, presentes nas amostras de leite *in natura*, leite pasteurizado e queijo tipo Minas frescal obtidas;
- d) Investigar o efeito da inclusão de níveis crescentes de orégano desidratado na alimentação de vacas leiteiras sobre o conteúdo de colesterol e seus óxidos no leite e queijo;
- e) Determinar o efeito da pasteurização lenta sobre o conteúdo do colesterol e de seus óxidos no leite;
- f) Determinar o nível de inclusão de orégano desidratado na alimentação de vacas leiteiras capaz de melhorar a qualidade do leite.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do Experimento

O experimento foi conduzido na fazenda Paulistinha, na cidade de Macarani-BA, no período de outubro de 2010 a janeiro de 2011. Todos os procedimentos experimentais foram realizados na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) no *campus* de Itapetinga-BA.

As análises químico-bromatológicas referentes à alimentação fornecida aos animais foram realizadas no Laboratório de Bovinocultura de Leite. O processamento das amostras, pasteurização dos leites e fabricação dos queijos, foi conduzido no Laboratório de Panificação e Secagem. O desenvolvimento, otimização e validação da metodologia para análise de colesterol e óxidos, bem como a quantificação dos compostos das amostras foram realizados no Centro de Estudos e Análises Cromatográficas.

4.2 Delineamento Experimental para Obtenção do Leite

Foram utilizadas 12 vacas mestiças Holandês x Zebu (grau de sangue variando de $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ de sangue H x Z), de terceira ou quarta lactação, com produção anterior entre 2.500 e 3.000 kg, ajustadas para 300 dias, manejadas a pasto na época das águas, e com 110 dias, em média, de lactação no início do período experimental.

As 12 vacas lactantes foram distribuídas em três Quadrados Latinos 4 x 4. O experimento foi constituído de quatro períodos experimentais, com duração de 21 dias cada, sendo os primeiros 18 considerados de adaptação e os 3 restantes para coleta de dados, conforme recomendado por Oliveira (2000).

Os animais foram alojados em baias individuais, providas de cocho de concreto e bebedouros automáticos, com uma área de quatro metros quadrados. O alimento foi oferecido na forma de mistura completa, duas vezes ao dia, às 6 e às 15 horas, à vontade, de modo a permitir de 5 a 10% de sobras.

Os quatro tratamentos foram constituídos de diferentes níveis de suplementação concentrada, tendo como volumoso a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), variedade RB 72-454, tratada com 1% de uma mistura de uréia e sulfato de amônia (9:1 partes), na fase experimental, após um período de adaptação, de uma semana, de todos

os animais com cana e 0,5% desta mistura. Os níveis de suplementação concentrada foram definidos pelo balanceamento das dietas para conter nutrientes suficientes para manutenção e produção de 15 Kg.dia⁻¹ de leite, de acordo com o NRC (2001), com base nos dados da análise bromatológica da cana-de-açúcar, previamente feita no início do período de adaptação. As proporções estimadas dos ingredientes nos concentrados são apresentadas na Tabela 2, na base de matéria seca (MS). A relação volumoso:concentrado foi de 60:40, na base da MS. Os níveis de inclusão de orégano desidratado foram calculados baseando-se no nível de inclusão do óleo essencial da erva na dieta de cordeiros, 0,055% da dieta, conforme Simitzis *et al.* (2008).

Tabela 2. Proporção dos ingredientes da dieta nos concentrados e volumoso, com base na matéria seca (%).

Item (%)	Níveis de inclusão de orégano			
	0 %	0,8 %	1,6 %	2,4%
Cana-de-açúcar	64,93	64,93	64,93	64,93
Milho	20,96	20,09	19,22	18,35
Soja	12,06	12,08	12,10	12,12
Orégano	0,00	0,84	1,69	2,54
Sal mineral ¹	0,90	0,90	0,90	0,90
Fosfato bicálcico	0,75	0,75	0,75	0,75
Calcário	0,41	0,41	0,41	0,41

¹Composição: Cálcio, 20,5%; Fósforo, 10%; Magnésio, 15 g; Enxofre, 12g; Sódio, 68 g; Selênio, 32mg; Cobre, 1.650 mg; Zinco, 6285 mg; Manganês, 1960 mg; Iodo, 195 mg; Ferro, 560 mg; Cobalto, 200 mg.

Do 19^o ao 21^o dia de cada período experimental, amostras do alimento oferecido foram congeladas. Ao final do período experimental, as amostras do alimento oferecido, cana-de-açúcar e concentrado, foram pré-secas e compostas, por animal e período, na base do peso. Posteriormente, foram moídas, em moinho com peneira de malha de 1 mm, acondicionadas em vidro com tampa e armazenadas para realização das análises.

4.3 Composição Químico-Bromatológica das Dietas

As análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), fibra detergente neutro livre de cinzas e proteínas (FDNcp), carboidratos não fibrosos (CNF), hemicelulose (HEM) e lignina (Lig) das dietas, concentrado e volumoso foram realizadas conforme Silva e Queiroz (2002).

As amostras de alimentos foram acondicionadas em sacos de fibra sintética TNT, gramatura de 100, com dimensão de 7 x 7 cm, na quantidade de 2,5 g de MS/saco, a fim de manter 20 g de MS/cm² de área superficial do saco (NOCEK, 1988) para incubação e determinação da FDN. O teor de carboidratos não fibrosos, devido à presença de uréia nas dietas, foi estimado segundo Hall (2001): CNF = 100 - ((%PB - %PB derivado da uréia + peso da uréia) + %FDN + %EE + %Cinzas). Na Tabela 3 encontram-se apresentadas as composições da cana-de-açúcar e dos concentrados e na Tabela 4 a composição químico-bromatológica das dietas.

Tabela 3. Composição centesimal (g/100g) dos ingredientes da dieta com base na matéria seca (MS).

Componente	Cana-de-açúcar	Milho	Farelo de soja	Orégano
MS	24,81	85,81	86,08	80,45
MO	96,35	98,70	91,20	91,9
PB	13,63	7,11	44,50	10,48
EE	1,36	3,00	3,40	3,27
FDN	56,20	23,40	14,30	38,65
FDA	37,90	6,63	9,65	19,85
HEM	18,29	16,72	4,65	18,78
Lig	7,91	1,12	4,00	6,24

MS- Matéria Seca, MO- Matéria Orgânica, PB- Proteína Bruta, EE- Extrato Etéreo, FDN- Fibra em Detergente Neutro, FDA - Fibra em Detergente Ácido, HEM – Hemicelulose e Lig – Lignina.

Tabela 4. Composição centesimal (g/100g) das dietas utilizadas nos diferentes tratamentos, com base na matéria seca (%).

Componente	Níveis de inclusão de orégano			
	0 %	0,8 %	1,6 %	2,4%
MS	46,20	46,20	46,19	46,22
MO	93,08	93,43	93,56	93,74
FDN	49,92	50,05	50,06	49,98
FDA	27,50	28,01	28,41	27,43
FDNcp	44,09	44,27	44,27	44,13
PB	16,84	16,88	16,80	16,82
EE	2,03	2,12	2,12	2,16
CNF	33,72	34,10	33,42	33,37

MS - Matéria Seca, MO - Matéria Orgânica, FDN - Fibra em Detergente Neutro, FDA - Fibra em Detergente Ácido, FDNcp - Fibra Detergente Neutro Livre de Cinzas e Proteínas, PB - Proteína Bruta, EE - Extrato Etéreo, CNF - Carboidrato Não Fibrosos.

4.4 Amostragem

As coletas de amostras individuais de leite de cada animal foram realizadas no 19º e 20º dias do período experimental. As amostras eram compostas do leite das ordenhas da manhã e da tarde, sendo a proporção determinada pela produção nas respectivas ordenhas.

Após ordenha, alíquotas de leite *in natura* foram imediatamente congeladas e aproximadamente 10 L de leite foram encaminhados para o *campus* da universidade para pasteurização e processamento dos queijos.

O leite foi submetido à pasteurização lenta à 65°C/30 minutos sob agitação constante, sendo em seguida retiradas alíquotas de 500 mL que foram imediatamente resfriadas até ~ 4°C e então congeladas até a realização das análises. Enquanto, o restante do leite pasteurizado foi destinado à elaboração do queijo tipo Minas frescal.

O leite utilizado para elaboração do queijo foi resfriado até 42°C, esta temperatura foi mantida até a adição do cloreto de cálcio (CaCl) e após alguns minutos adicionou-se o coagulante enzimático (coalho). Após a coagulação do leite (45-50 min), foram realizados cortes transversais e horizontais na massa para liberação do soro, sendo realizada a dessoragem parcial, salga e enformagem do queijo. Após 30 minutos foram realizadas viragens do queijo e, então, este permaneceu em repouso, sob refrigeração, por 24h. Os queijos tipo Minas frescal dos leites provenientes de cada vaca foram embalados em embalagem de polipropileno e congelados até o momento das análises. O fluxograma do processamento do queijo está apresentado na Figura 4.

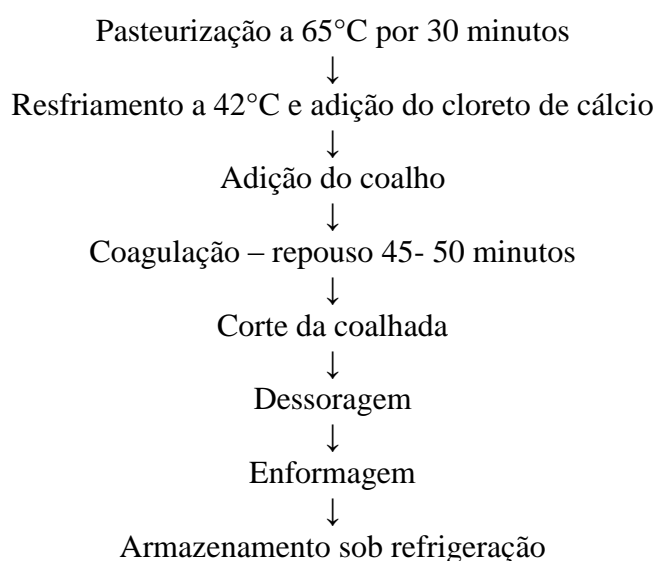


Figura 4. Fluxograma de produção do queijo tipo Minas frescal.

4.5 Procedimentos Experimentais

4.5.1 Extração do Colesterol e Óxidos do Leite e Queijo

Após diferentes testes para verificação da melhor condição para extração dos analitos, a extração do colesterol e óxidos foi realizada, em duplicata, através da saponificação direta das amostras e posterior extração com hexano, segundo Saldanha, Mazalli e Bragagnolo (2004), com modificações no tipo e tempo da saponificação baseadas em Saldanha *et al.* (2006).

Para extração da matéria insaponificável das amostras de leite, tomou-se 10 mL de leite e adicionou-se 8 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 50% (p/v) e 12 mL de álcool etílico P. A. Após agitação em vórtex por 1 minuto, a mistura permaneceu em repouso durante 22 h, no escuro e à temperatura ambiente, para que se completasse a reação de saponificação. Decorrido este período, foram adicionados 10 mL de água destilada e 10 mL de hexano P. A., e a mistura foi novamente agitada em vórtex (5 minutos). Após completa separação de fases, a fase hexânica foi coletada, evaporada a temperatura ambiente em evaporador rotativo e o resíduo obtido diluído em 2,5 mL de acetonitrila e isopropanol na proporção de 95:5 (fase móvel).

O resíduo diluído na fase móvel foi filtrado através de uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro do poro de 0,45 µm e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD).

Para extração da matéria insaponificável das amostras do queijo, foram pesados cerca de 0,5 g de amostra e adicionados 4 mL de solução aquosa de KOH a 50% (p/v) e 6 mL de álcool etílico P. A., conforme recomendado por Saldanha, Mazalli e Bragagnolo (2004) para extração de amostras de carne, seguindo-se então, as mesmas etapas de preparo descritas anteriormente para o leite.

4.5.2 Análise Cromatográfica

Para a análise das amostras, foi utilizado um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu, equipado com um sistema quaternário de bombas, degaseificador, válvula de injeção com alça de amostragem de 20 µL, forno de coluna e detector de arranjo de diodos. O colesterol e os óxidos, 25-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol, foram

separados em coluna analítica de fase reversa C₁₈ (15 cm x 6 mm d.i. x 5µm) da marca Restek. Como fase móvel foram utilizados os solventes, de grau cromatográfico, acetonitrila e isopropanol na proporção de 95:5 (v/v), sendo que antes da realização das corridas cromatográficas estes eram filtrados e degaseificados.

Os parâmetros de funcionamento do cromatógrafo foram estabelecidos após verificação da condição de melhor resolução, sendo a vazão ajustada para 2 mL.min⁻¹, a temperatura do forno de 35°C e tempo de corrida de 15 minutos. As injeções foram realizadas em duplicata e as áreas dos picos do colesterol e óxidos foram determinadas através do *software* LCSolution[®].

4.5.2.1 Identificação dos Analitos

A identificação do colesterol e dos óxidos foi realizada tentativamente através da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com o tempo de retenção dos picos dos padrões, colesterol (*Cholesterol*, cód. C8667), 7-cetocolesterol (*5-Cholesten-3β-ol-7-one*, cód. C2394) e 25-hidroxicolesterol (*25-Hydroxycholesterol*, cód. H1015), todos da Sigma-Aldrich[®] e também pelo comprimento de onda característico de cada substância. Os cromatogramas foram processados a 202 nm para o colesterol e 25-hidroxicolesterol e a 227 nm para o 7-cetocolesterol.

4.5.3 Validação do Método Analítico

A validação do método proposto foi realizada segundo Ribani *et al.* (2004) através dos seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, repetitividade, precisão intermediária, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação. A avaliação dos resultados foi realizada conforme recomendado pela Resolução ANVISA RE número 899, de 29/05/2003 (BRASIL, 2003).

Para o processo de validação, foram adquiridos, na cidade de Itapetinga-BA, produtos comerciais de leite pasteurizado desnatado e queijo tipo Minas frescal *ligh*t. Foram escolhidos produtos com baixo teor de gordura para que se conseguisse uma matriz semelhante aquela das amostras, porém com o mínimo de quantidade do analito foco, a fim de minimizar interferências durante as etapas do processo.

4.5.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada, em triplicata, com o auxílio do detector de arranjo de diodos, através da comparação dos picos dos produtos com os picos dos padrões dos analitos, verificando-se a resolução e a separação dos compostos puros.

Primeiramente os produtos foram enriquecidos com colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, homogeneizados, extraídos e, então, injetados no cromatógrafo para obtenção dos cromatogramas e espectros de pureza dos picos. Essas informações foram utilizadas para comparação com os cromatogramas e espectros de pureza de cada composto, obtidos através da injeção de soluções dos padrões dos analitos.

4.5.3.2 Linearidade e Faixa de Aplicação

Para avaliação da linearidade e faixa de aplicação do método foram utilizados os dados obtidos das curvas analíticas. A construção destas foi realizada através da injeção de soluções dos padrões do colesterol e dos óxidos de colesterol dissolvidos na fase móvel, nas seguintes concentrações: 1, 10, 20, 100, 200, 1000 e 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o colesterol e 0,1; 1, 10, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol. Estas soluções foram analisadas em duas repetições, em quatro réplicas cada, em três dias não consecutivos, sendo as soluções armazenadas em *freezer* a -18°C durante o intervalo dos dias.

A linearidade foi avaliada segundo o coeficiente de correlação de Pearson (R^2) para regressão linear. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva e deve apresentar valor próximo a 1,0, que indica menor dispersão dos pontos experimentais e maior confiabilidade aos coeficientes de regressão estimados.

A faixa de aplicação da curva analítica foi obtida pelo método da resposta relativa. Neste método, um gráfico é construído com as respostas relativas no eixo das ordenadas e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo das abscissas. A faixa de aplicação é definida como a faixa compreendida entre os pontos onde a resposta relativa intercepta as linhas de intervalo de confiança, 95 e 105%, da faixa linear.

4.5.3.3 Repetitividade e Precisão Intermediária

A precisão, tanto para repetitividade (intradia) quanto para precisão intermediária (interdias), também foi avaliada pelos dados obtidos das curvas analíticas de cada composto, sendo para isso, calculados, ponto a ponto, a estimativa das médias e os Coeficientes de Variação (CV).

4.5.3.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram calculados considerando-se as relações de sinal-ruído aceitas para cada limite e os parâmetros estimados para curva analítica, conforme as Equações 1 e 2:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

Onde: LD é o limite de detecção, LQ é o limite de quantificação, s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação e S é o coeficiente angular da curva analítica.

4.5.3.5 Recuperação

A recuperação foi avaliada, em triplicata, através da fortificação dos produtos com quantidades suficientes de soluções dos padrões de colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, para obtenção das seguintes concentrações após análise: 75, 150 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o colesterol e 50, 75 e 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para os óxidos de colesterol no leite; e 100, 1000 e 2000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para o colesterol e 100, 200 e 300 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para os óxidos de colesterol no queijo. Além da injeção de amostras controle, sem a fortificação com o padrão. Após a quantificação dos analitos nas amostras fortificadas e no controle o percentual de recuperação (% REC) foi calculado de acordo com a Equação 3.

$$\% \text{ REC} = \frac{(\text{Conc. Obtida} - \text{Conc. Controle})}{\text{Conc. Esperada}} \times 100 \quad (3)$$

4.5.4 Quantificação do Colesterol e Óxidos no Leite e Queijo

A quantificação do colesterol e dos OsC foi feita através de padronização externa (RIBANI *et al.*, 2004).

Inicialmente, as amostras comerciais de leite desnatado e queijo *ligh* foram extraídas para obtenção das matrizes de cada produto, essas matrizes foram enriquecidas com quantidades suficientes de solução dos padrões para obtenção das seguintes concentrações: 5, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os óxidos e 10, 75, 150, 225, 300, 500 e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o colesterol no leite; e, 5, 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os óxidos e 10, 100, 1000, 2000 e 3000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o colesterol no queijo.

As curvas de quantificação foram construídas através dos dados obtidos pela injeção destas soluções e dos controles (sem fortificação) e as quantidades de colesterol e óxidos das amostras foram calculadas utilizando-se as equações das retas.

4.6 Análises Estatísticas

Os dados obtidos a partir das análises de colesterol e óxidos de colesterol foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA) e análise de regressão, utilizando-se Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 9.1 (RIBEIRO JÚNIOR, 2007). Os modelos estatísticos foram escolhidos de acordo com a significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o Teste F a nível de 5%, e de determinação (R^2). Para comparação do teor de colesterol e óxidos entre os tratamentos térmicos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 12 repetições para cada um dos níveis de orégano, os dados foram submetidos à ANOVA e teste Tukey a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação

5.1.1 Seletividade

As condições cromatográficas escolhidas mostraram-se adequadas para separação do colesterol e dos óxidos de colesterol tanto para as amostras de leite como de queijo tipo Minas frescal. A seletividade do método foi comprovada, com auxílio do *software* LCSolution[®], através da boa resolução dos picos e da separação dos compostos puros (Figura 5), confirmando que nos tempos de retenção do colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol não houve coeluição de outro composto, definindo a capacidade do método em detectar os analitos de interesse dentro da matriz dos lácteos.

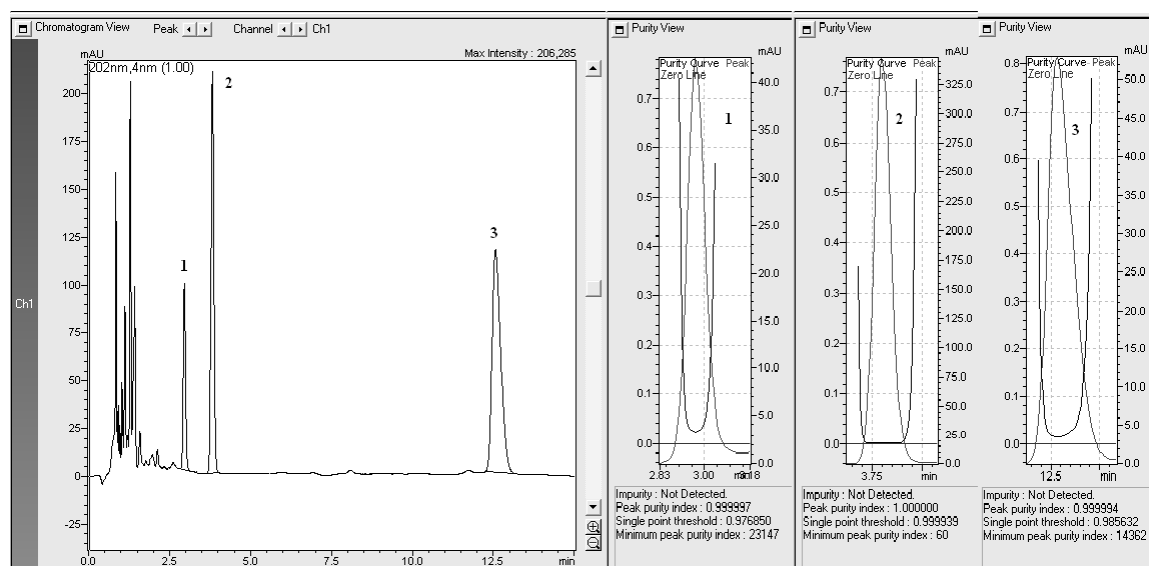


Figura 5. Cromatograma característico das amostras de lácteos e espectros de pureza dos picos referentes aos óxidos e ao colesterol; (1) 25-hidroxicolesterol; (2) 7-cetocolesterol e (3) colesterol.

5.1.2 Linearidade e Faixa de Aplicação

Os dados relativos à linearidade demonstram que há correlação fortíssima entre as concentrações do colesterol e dos óxidos na faixa estudada e as respectivas áreas. Os coeficientes de determinação superiores a 0,999 encontrados para todas as curvas

(Figura 6) confirmam que o método gera resultados proporcionais à concentração das substâncias em análise, dentro de uma faixa específica, sendo possível relacionar a medida da área como dependente da concentração. Além disso, esses resultados encontram-se em conformidade com as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), que recomendam um coeficiente de correlação igual a 0,99 ou um valor acima de 0,90, respectivamente (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

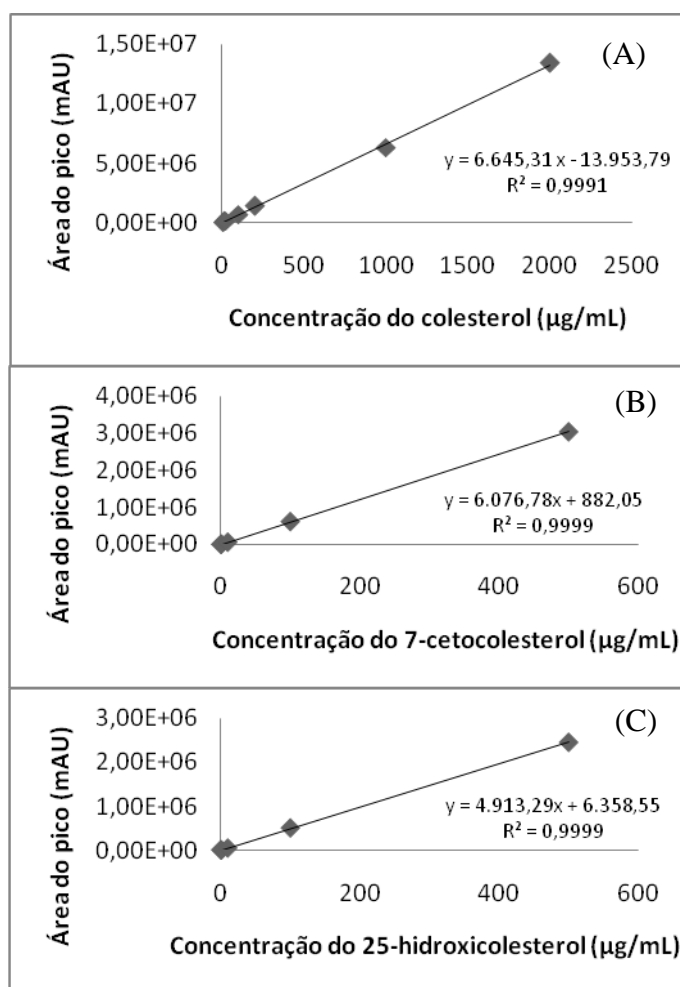


Figura 6. Curvas analíticas dos padrões de colesterol (A), 7-cetocolesterol (B) e 25-hidroxicolesterol (C).

Para avaliação da faixa de aplicação das curvas analíticas obtidas foram plotados gráficos relacionando o logaritmo da concentração dos padrões com a resposta relativa do equipamento (área do pico dividida pela concentração respectiva do analito). Para esses foram admitidos intervalos de confiança inferior e superior a 5% entre o valor

médio das injeções. Foram considerados como faixa de aplicação aceitável todos os pontos onde a resposta relativa esteve entre os intervalos de confiança (Figura 7).

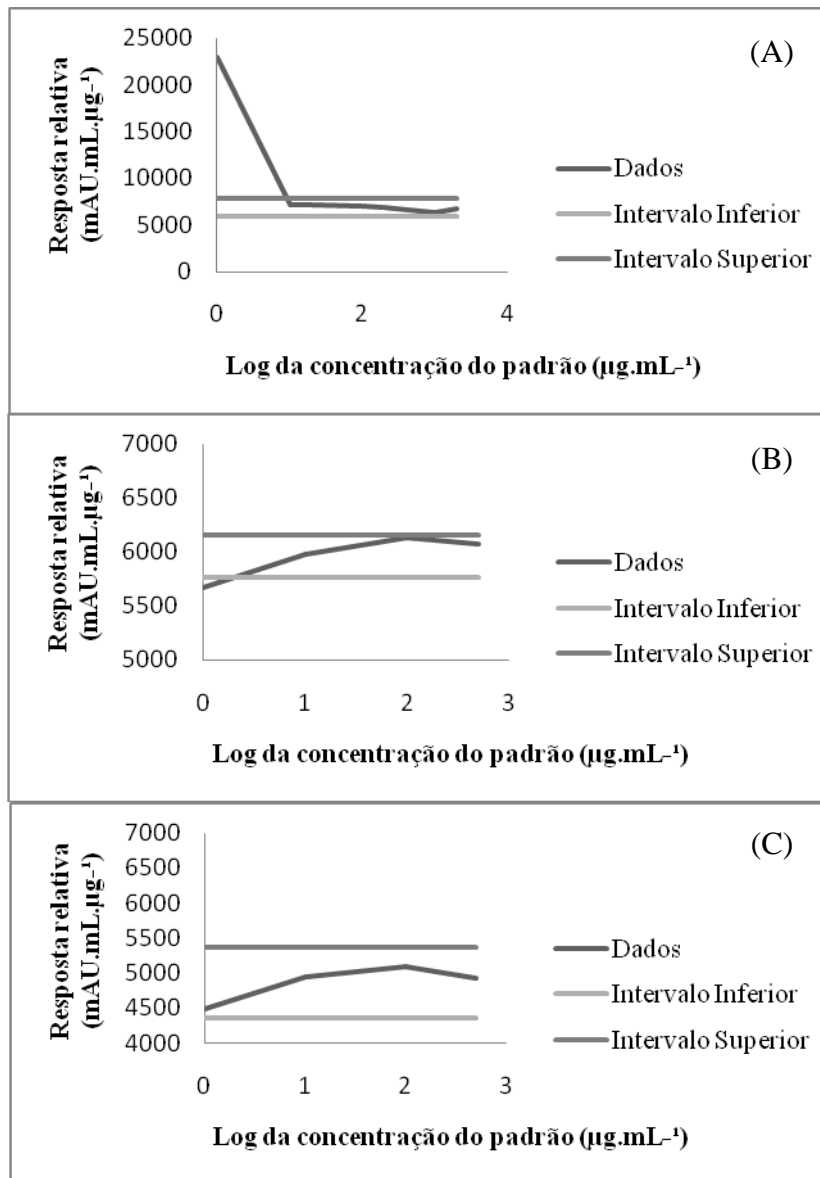


Figura 7. Faixa de aplicação das curvas analíticas de colesterol (A), 7-cetocolesterol (B) e 25-hidroxicolesterol (C).

Além do método da resposta relativa, a faixa de aplicação pode ser obtida pelos dados de precisão, em que, a faixa de concentração onde a precisão for garantida é considerada como a faixa de aplicação da metodologia proposta para extração e análise dos analitos de interesse (RIBANI *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2003). Os resultados da precisão do método, que são apresentados a seguir, confirmam a faixa de aplicação obtida.

A legislação brasileira especifica que os pontos da curva analítica dentro da faixa de aplicação devem compreender uma faixa de concentração entre 80–120% do valor esperado (BRASIL, 2003). Esta exigência também foi atendida pelo método para todas as curvas obtidas, uma vez que estas foram construídas com um intervalo amplo de concentrações, variando de muito inferiores até muito superiores aos valores esperados para as amostras.

5.1.3 Repetitividade e Precisão Intermediária

Os coeficientes de variação obtidos no estudo da repetitividade e precisão intermediária foram adequados para todas as concentrações de colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, exceto para a concentração mais baixa do colesterol, segundo o critério de aceitação para o coeficiente de variação da legislação brasileira. A legislação vigente considera aceitáveis valores de CV de até 15%, no entanto, recomenda uma variação máxima de 5% para macroconstituintes, enquanto para microconstituintes, como os óxidos de colesterol, admitem CV de até 20%, dependendo da complexidade da matriz (BRASIL, 2003). Os valores obtidos para precisão do método analítico para os analitos encontram-se nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Precisão do método analítico para determinação de colesterol em leite e queijo, expressa pelo coeficiente de variação.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Colesterol	
	Repetitividade*	Precisão Intermediária**
	CV (%)	CV (%)
1	16,99	72,56
10	5,41	5,04
20	5,03	4,70
100	2,07	1,95
200	1,20	1,09
1000	2,44	4,44
2000	1,18	1,21

* n = 8; **n = 24.

Tabela 6. Precisão do método analítico para determinação de óxidos de colesterol em leite e queijo, expressa pelo coeficiente de variação.

Concentração (µg/mL)	7-cetocolesterol		25-hidroxicolesterol	
	Repetitividade*	Precisão Intermediária**	Repetitividade *	Precisão Intermediária**
	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
1	10,56	20,28	10,27	12,41
10	2,20	12,52	3,44	3,53
100	1,20	12,11	1,27	1,34
500	1,81	12,95	2,61	2,20

* n = 8; **n = 24.

Resultados semelhantes para precisão foram encontrados por outros autores e contribuem para a confirmação da precisão da metodologia proposta para análise de colesterol e óxidos nas amostras de leite e queijo. Daneshfar, Khezeli e Lotfi (2009) em validação de metodologia para quantificação do colesterol em amostras de leite por CLAE-UV obtiveram CV inferiores a 5% e Morales-Aizpúrua e Tenuta-Filho (2005), também utilizando um sistema CLAE-DAD, obtiveram CV de 7,25 a 9,29% para repetitividade avaliando o conteúdo de colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol em maionese.

De acordo com os resultados apresentados para precisão intermediária, nota-se uma diminuição da precisão para o 7-cetocolesterol ao longo dos dias, o que pode estar relacionado com a estabilidade deste composto durante a análise ou estocagem, como demonstrado por Busch, Gross e King (2011). Os autores observaram que a estabilidade deste óxido diminuiu ao longo do período estudado de 7 dias, além de também, decrescer de acordo com o número de injeções realizadas. Como no presente estudo as mesmas soluções padrão foram utilizadas para injeção nos diferentes dias, totalizando 6 dias de estocagem, sugere-se que possa ter ocorrido algum tipo de alteração nestas soluções, como por exemplo, transformação do 7-cetocolesterol em colest-3,5-dieno-7-ona, que no entanto, não prejudica o processo de validação do método, uma vez que mesmo sendo diminuída, a precisão foi garantida durante todo período.

5.1.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) obtidos, foram, respectivamente, 11,10 e 33,65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o colesterol; 1,35 e 4,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o 7-cetocolesterol; e 2,35 e 7,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o 25-hidroxicolesterol.

Resultados diferentes foram encontrados por outros autores. Stroher *et al.* (2012), utilizando sistema CLAE, semelhante ao utilizado nesta pesquisa, para análise de colesterol em produtos cárneos encontraram limite de detecção equivalente a 0,005 mg.g^{-1} e limite de quantificação de 0,016 mg.g^{-1} . Baggio e Bragagnolo (2004) obtiveram respectivamente, LD de 4,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e LQ de 16 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para análises de colesterol e LD de 0,09 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e LQ de 0,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para análises de 7-cetocolesterol.

Estas diferenças, provavelmente decorrentes dos diferentes métodos empregados para preparo das amostras, diferentes sistemas CLAE utilizados para análise das amostras, quanto distintas formas para o cálculo dos limites, não prejudicaram os resultados da análise de colesterol das amostras deste trabalho, uma vez que leite e queijo apresentam concentrações mais elevadas desta substância.

Com relação aos óxidos, esses limites podem ser diminuídos melhorando-se as condições operacionais durante a realização das análises, principalmente com relação à estabilidade elétrica do sistema cromatográfico, uma vez que isto interfere diretamente na relação sinal-ruído do equipamento, influenciando também nos desvios das respostas analíticas.

Além disso, segundo Denobile e Nascimento (2004), o limite de quantificação corresponde à menor concentração do analito que se pode determinar com precisão adequada, levando-se este aspecto em consideração e o fato de que para analitos em baixa concentração o coeficiente de variação admitido é de até 20%, pode-se também considerar como LQ a menor concentração estudada, 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, conforme Tabela 6.

5.1.5 Teste de Recuperação

Os resultados do teste de recuperação para as amostras de leite e queijo tipo Minas frescal estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. Os resultados obtidos comprovam a eficiência do método proposto para análise do colesterol e dos óxidos no leite e para a análise do colesterol no queijo. A recuperação dos óxidos de

colesterol nas amostras de queijo foi inadequada, uma vez que os valores encontrados ficaram abaixo dos aceitáveis, dentro da faixa 70-120% (LANÇAS, 2004). Porcentagens de recuperação do analito próximas a 100% são ideais, porém admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa (BRASIL, 2003), sendo aceito um coeficiente de variação de até 5%.

Resultados semelhantes aos encontrados para a análise de colesterol foram encontrados por Saldanha, Mazzali e Bragagnolo (2004), comparando dois métodos para sua análise em leite, sendo um método enzimático e outro por cromatografia líquida de alta eficiência. Outros autores também obtiveram recuperações semelhantes para o colesterol estudando métodos de extração para diferentes amostras, como peixes (VISENTAINER *et al.*, 2005), maionese (MORALES-AIZPURÚA & TENUTA FILHO, 2005), ovo (MAZALLI, SALDANHA & BRAGAGNOLO, 2003) e camarão rosa (BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Tabela 7. Resultados para recuperação (%) do colesterol e óxidos nas amostras de leite.

Colesterol adicionado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%) \pm DP*	CV (%)*
75	100,63 \pm 0,56	0,55
150	100,77 \pm 1,63	1,62
300	103,90 \pm 1,68	1,62
25-hidroxicolesterol adicionado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%) \pm DP*	CV (%)*
50	80,40 \pm 1,54	1,92
75	78,94 \pm 2,11	2,67
100	72,32 \pm 2,58	3,57
7-cetocolesterol adicionado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%) \pm DP*	CV (%)*
50	70,76 \pm 0,003	0,005
75	72,57 \pm 2,32	3,20
100	72,69 \pm 0,50	0,68

*n=9; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Embora nenhuma explicação tenha sido encontrada na literatura para baixa recuperação dos óxidos de colesterol nas amostras de queijo, tais resultados podem estar relacionados às características do produto. Durante o processamento do queijo o soro é removido e com isso diminui-se a umidade e aumenta-se a concentração de lipídios e

proteínas havendo uma maior interação entre estes componentes e os óxidos de colesterol presentes no alimento prejudicando a recuperação dos mesmos.

Tabela 8. Resultados para recuperação (%) do colesterol e óxidos nas amostras de queijo.

Colesterol adicionado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%) \pm DP*	CV (%)*
100	108,87 \pm 0,76	0,70
1000	118,51 \pm 3,25	2,74
2000	95,31 \pm 4,62	4,85
25-hidroxicolesterol adicionado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%) \pm DP*	CV (%)*
100	60,57 \pm 0,95	1,56
200	59,68 \pm 2,70	4,52
300	56,85 \pm 4,39	7,72
7-cetocolesterol adicionado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%) \pm DP*	CV (%)*
100	32,40 \pm 2,26	6,97
200	38,22 \pm 3,19	8,34
300	39,46 \pm 1,87	4,74

*n=9; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Com relação aos óxidos de colesterol, Saldanha *et al.* (2006), utilizando o mesmo método de extração que o presente trabalho, encontraram resultados superiores para amostras de peixe (bacalhau salgado e merluza fresca), entre 95 e 104% de recuperação para óxidos de polaridade moderada, onde se incluem o 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, o que pode estar relacionado às diferenças na matriz dos alimentos estudados.

5.2 Análise do Colesterol e Óxidos de Colesterol

5.2.1 Quantificação do Colesterol e Óxidos no Leite e Queijo tipo Minas frescal

O óxido 7-cetocolesterol não foi detectado em nenhuma amostra analisada, sendo identificados apenas o colesterol e o 25-hidroxicolesterol nas amostras de leite *in natura*, pasteurizado e queijo tipo Minas frescal. Os valores médios obtidos e os coeficientes de variação (CV) para esses compostos podem ser observados na Tabela 9,

com exceção para as quantidades do óxido nas amostras de queijo, pois uma vez que a recuperação foi inadequada, não é possível quantificá-lo com confiabilidade.

Tabela 9. Quantidade de colesterol e 25-hidroxicolesterol, em mg por 100 mL de leite e mg por 100g de queijo, presentes nas amostras de leite *in natura*, pasteurizado e queijo tipo Minas frescal

Compostos	Níveis de Orégano				CV (%) ¹	Valor de P ²		
	0%	0,8%	1,6%	2,4%		L	Q	C
Leite <i>in natura</i>								
Colesterol ³	7,06	5,03	4,94	5,64	27,85	Ns	0,013	ns
25-hidroxicolesterol	0,21	0,22	0,22	0,22	10,93	Ns	ns	ns
Leite Pasteurizado								
Colesterol	3,91	3,99	3,71	4,08	21,07	Ns	ns	ns
25-hidroxicolesterol	0,20	0,20	0,21	0,21	10,93	Ns	ns	ns
Queijo Minas frescal								
Colesterol	45,52	42,03	47,30	45,15	9,39	Ns	ns	ns

¹Coefficiente de Variação; ²ns: não significativo (P > 0,05); L, Q e C: efeitos de ordem linear, quadrática e cúbica para a inclusão de orégano na dieta; ³y=10651x²-310,2x+7,004 (R²=0,98).

Com relação a não detecção do 7-cetocolesterol, isto pode ser aceito como um resultado positivo, uma vez que este óxido é considerado um indicador da oxidação do colesterol em alimentos e um produto secundário da reação de oxidação (BUSCH & KING, 2009; OTAEGUI-ARRAZOLA *et al.*, 2010). Estes resultados indicam que as condições de processamento e armazenamento, tanto para o leite quanto para o queijo, não contribuíram significativamente para oxidação do colesterol, concordando com Orezewska-Dudek *et al.* (2012). Estes autores acreditam que o leite seja mais resistente à autooxidação do colesterol, mesmo em condições desfavoráveis de armazenamento, porque contém metais de baixa valência (Fe, Cu e Co), alto teor de gorduras saturadas e substâncias antioxidantes naturais, como vitaminas e grupos sulfidrilas.

Com relação à quantidade de colesterol no leite pasteurizado e queijo tipo Minas frescal e a quantidade de óxidos no leite *in natura* e pasteurizado, não foi observado efeito significativo (P > 0,05) para inclusão de orégano nas dietas. Resultados que podem ser resultado da degradação do colesterol após o processamento dos alimentos.

O colesterol do leite *in natura* apresentou efeito quadrático para a inclusão de orégano, ocorrendo redução no seu teor da dieta controle até o nível de 1,6%, seguido de um aumento para o maior nível de inclusão de orégano (2,4%), conforme Figura 8. Esses resultados indicam uma possível modificação no metabolismo animal, nas vias que envolvem a produção de lipídios. Diferentes trabalhos chamam atenção para as

modificações que óleos essenciais de plantas, inclusive o orégano, podem trazer para o metabolismo animal, especialmente na microbiota do rúmen. Estes óleos tem sido pesquisados na tentativa de melhorar o desempenho e produção animal.

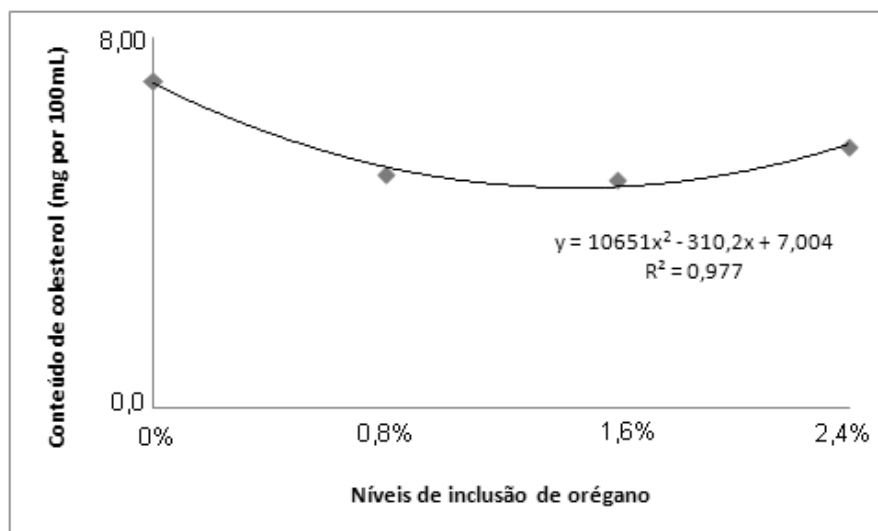


Figura 8. Efeito da inclusão de orégano desidratado no conteúdo do colesterol do leite *in natura*.

Calsamiglia *et al.* (2007), destacam, em artigo de revisão, que os óleos essenciais podem interagir com a membrana das células microbianas inibindo o crescimento de certas bactérias do rúmen. Como resultado ocorre uma modificação no metabolismo, com inibição da metanogênese e desaminação, resultando em baixas concentrações de nitrogênio amoniacal, metano e acetato e em concentrações mais elevadas de butirato e propionato, extremamente benéficas para produção de leite. Além disso, os autores destacam que como os microrganismos degradam nutrientes para produzir ácidos graxos e proteínas microbianas como forma de fornecimento de energia e proteínas para o ruminante, essas modificações podem levar a mudanças em todo metabolismo animal, não somente no ecossistema ruminal.

Castillejos *et al.*, (2008) realizaram estudos *in vitro* sobre a influência de diferentes óleos essenciais, entre eles o óleo de orégano, sobre a fermentação ruminal. Eles inocularam, durante 24 h, o líquido ruminal com três concentrações diferentes de óleo essencial (5, 50 e 500 mg.L⁻¹), observando que, as concentrações mais baixas do óleo essencial de orégano foram capazes de aumentar entre 39-56% a concentração de ácidos graxos voláteis, enquanto a concentração mais elevada inibiu a fermentação microbiana do rúmen. Resultados que demonstraram que o óleo de orégano é capaz de

modificar a fermentação ruminal e permitir sua manipulação para melhorar o desempenho animal.

Embora trabalhos como os citados acima demonstrem a capacidade do orégano em influenciar o metabolismo ruminal, nenhum trabalho foi realizado *in vivo*, dessa forma acredita-se que as modificações nas concentrações do colesterol possam ter sido resultado da suplementação com a erva, mas ainda são necessárias maiores investigações para comprovação.

Outro ponto relevante, é que a concentração do colesterol está intimamente ligada à concentração de gordura e/ou ao tamanho dos glóbulos de gordura do leite (SWAISGOOD, 2010). Segundo Lacerda (2012) a suplementação, com orégano das dietas de vacas leiteiras não influenciou na quantidade média de gordura do leite, assim, supõe-se que a diminuição na concentração de colesterol no leite *in natura* observada neste trabalho pode estar relacionada ao tamanho dos glóbulos de gordura, que podem ou não ter sido influenciados pela suplementação da dieta, mas como o tamanho das gotículas de gordura não foi medido, não é possível chegar a esta confirmação.

Para as amostras de queijo tipo Minas frescal não foram encontrados dados na literatura para comparação, entretanto a tabela de composição centesimal de alimentos brasileiros elaborada pela Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, indica um conteúdo total de colesterol para este tipo de queijo de 62mg/100g (TACO, 2012), resultado superior ao apresentado neste trabalho, diferença esperada, já que o leite utilizado para o processamento também apresentou resultado inferior ao descrito na tabela, igual a 12 mg por 100 mL .

5.2.2 Influência do Processamento Térmico sobre o Teor de Colesterol e 25-hidroxicolesterol presentes no Leite

Os métodos de conservação, que utilizam o calor, visam principalmente a eliminação dos microrganismos indesejáveis, que se encontram no alimento. A intensidade e o tempo de exposição ao calor, além de sua ação sobre os microrganismos, podem alterar também o valor nutritivo do alimento, através da promoção da oxidação de nutrientes, como gorduras e vitaminas lipossolúveis (SILVA, 2000). As alterações do leite submetido ao aquecimento estão relacionadas não somente a temperatura alcançada, mas também com a duração do aquecimento, sendo que

quanto maior a temperatura ou o tempo de exposição, maiores também serão as alterações.

Nesta pesquisa, não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) da pasteurização lenta sobre a quantidade de 25-hidroxicolesterol, sendo estatisticamente diferentes apenas os teores de colesterol para todas as amostras de leite das vacas submetidas à suplementação com orégano. A quantidade de colesterol diminuiu no leite pasteurizado quando comparado ao leite *in natura* (Figura 9), mostrando que o tratamento térmico foi capaz de causar a degradação do lipídio no alimento.

Observando-se os resultados nota-se, após a pasteurização, uma diminuição mais acentuada do conteúdo de colesterol no tratamento controle (0%) (Figura 10) o que sugere um efeito protetor do orégano com relação à degradação do colesterol nas amostras de vacas suplementadas com a erva. O orégano possui em sua composição compostos antioxidantes, principalmente ácidos fenólicos, que podem ter sido incorporados ao leite através da alimentação das vacas e, assim, ter protegido o colesterol da oxidação durante o tratamento e posterior armazenamento do leite, semelhante ao que demonstraram MC Cluskey *et al.* (1997) avaliando a suplementação de vacas leiteiras com outro antioxidante natural, vitamina E.

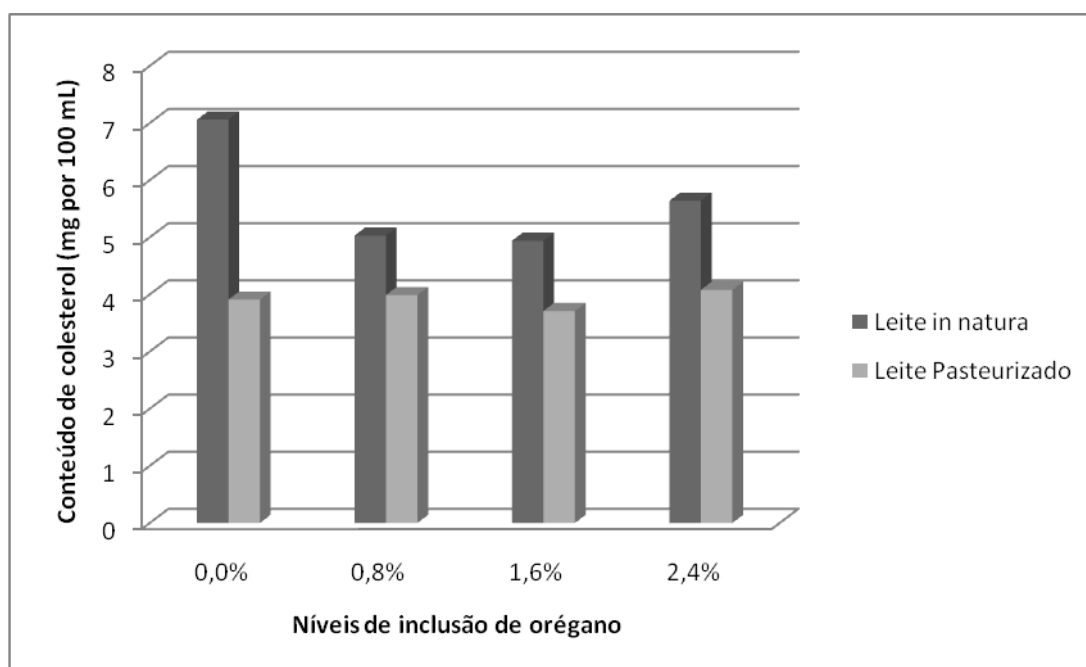


Figura 9. Quantidade de colesterol (mg por 100mL de leite) para os diferentes tratamentos antes e após o tratamento térmico.

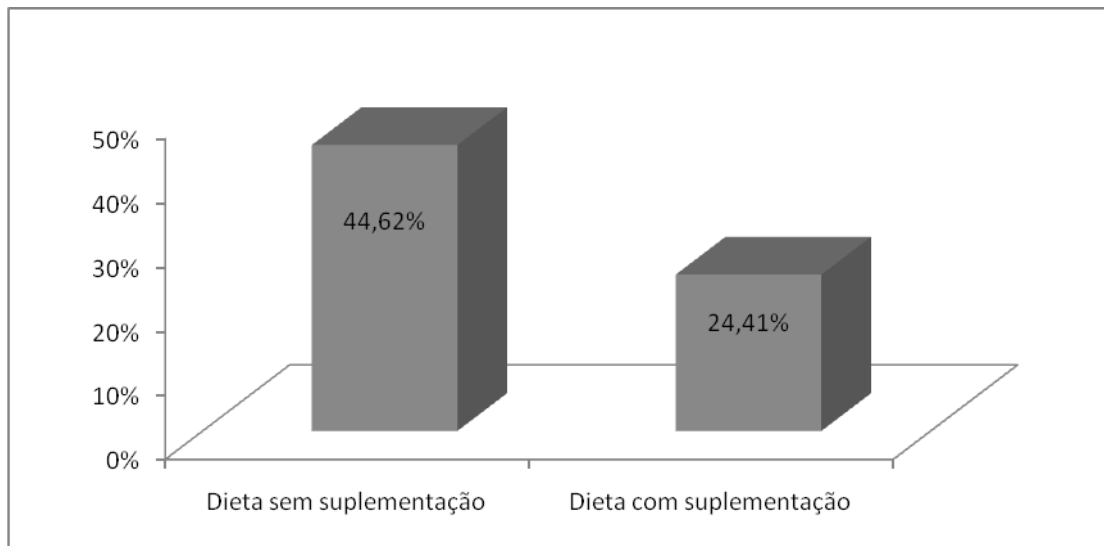


Figura 10. Diminuição média percentual do conteúdo de colesterol no leite pasteurizado em comparação ao leite *in natura*.

6 CONCLUSÃO

A metodologia proposta para extração simultânea de colesterol e dos óxidos de colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, mostrou-se completamente satisfatória para as amostras de leite. Para queijo tipo Minas frescal, a metodologia pode ser aplicada somente para análise do conteúdo de colesterol, isso porque, para análise de queijo, o percentual de recuperação dos óxidos foi baixo, considerado inadequado.

O óxido 7-cetocolesterol não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas, sendo detectados, identificados e quantificados apenas o colesterol e o 25-hidroxicolesterol.

A inclusão de orégano desidratado na dieta de vacas leiteiras alterou significativamente o conteúdo de colesterol do leite *in natura*, o qual apresentou decréscimo nos seus teores a partir da dieta controle para o nível de 1,6% com pequeno aumento até o nível de 2,4% de suplementação.

As quantidades de colesterol no leite pasteurizado e queijo tipo Minas frescal e as quantidades de 25-hidroxicolesterol nos leites *in natura* e pasteurizado, não foram influenciadas pela inclusão de orégano nas dietas das vacas.

O tratamento térmico de pasteurização lenta influenciou nas quantidades de colesterol dos leites. Houve uma redução dos conteúdos de colesterol do leite pasteurizado quando comparado ao leite *in natura*, sendo que para os leites provenientes de vacas alimentadas com orégano essa redução foi menor, evidenciando um possível efeito protetor do colesterol pela erva aromática.

Assim, a inclusão de 1,6% de orégano desidratado na dieta de vacas leiteiras pode ser considerada positiva, uma vez que é capaz de diminuir o conteúdo de colesterol do leite e proteger este lipídio durante o tratamento térmico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGE/ MAPA – Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura. **Projeções do Agronegócio Brasil 2009/10 a 2019/20**. Brasília, 2010, 50p.

AGRIPOINT – Empresa de Consultoria. A renda do brasileiro e seus gastos com lácteos. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/mercado/espaco-aberto/a-renda-do-brasileiro-e-seus-gastos-com-lacteos-312n.aspx>> Acesso: abr. de 2011.

AHN, J. H.; JEONG, I. S.; KWAK, B. M.; LEEM, D.; YOON, T.; YOON, C.; JEONG, J.; PARK, J. M.; KIM, J. M. Rapid determination of cholesterol in milk containing emulsified foods. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2411-2417, 2012.

ARABSHAHI-DELOUEE, S. & UROOJ, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1233-1240, 2007.

BAGGIO, S. R.; BRAGAGNOLO, N. Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 64-70, 2004.

BARLOW, S. M. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In: HUDSON, B. J. F. **Food Antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990.

BARRIUSO, B.; OTAEGUI-ARRAZOLA, A.; MENÉNDEZ-CARREÑO, M.; ASTIASARÁN, I. Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. **Food Chemistry**, v. 135, p. 706-712, 2012.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite**. São Paulo: Nobel, 15 ed., 1991.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BORNEO, R., & AGUIRRE A. Chemical composition, cooking quality, and consumer acceptance of pasta made with dried amaranth leaves flour. **Food Science and Technology**, v. 41, n.10, p.1748–1751, 2008.

BOTSOGLU, N. A.; CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI P.; GIANNENAS I.; PAPAGEORGIOU, G.; SPAIS, A. B. The effect of a mixture of herbal essential oils or alfa tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. **South African Journal of Animal Science**, v. 34, p. 52-61, 2004.

BOTSOGLU, N. A.; FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. **British Poultry Science**, v.43, p.223-230, 2002.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Otimização da determinação de colesterol por CLAE e teores de colesterol, lipídios totais e ácidos Graxos em camarão

rosa (*Penaeus brasiliensis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, 1997.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, 02 de junho de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília: 2003.

BRITO, N. M.; AMARANTE JÚNIOR, O. P. de; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, 129-146, 2003.

BUSH, T. P.; GROSS, H. B.; KING, A. J. Stability of 7-ketocholesterol, 19-hydroxycholesterol, and cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol during storage: Derivatization issues. **Journal of Chromatography Separation Techniques**, v. 2, n. 1, p. 107-111, 2011.

BUSH, T. P.; KING, A. J. Stability of Cholesterol, 7-Ketocholesterol and b-Sitosterol during Saponification: Ramifications for Artifact Monitoring of Sterol Oxide Products. **Journal of American Oil Chemistry Society**, n. 87, p. 955-962, 2010.

BURGESS, K. J. Milk fat as ingredients. **International Journal of Dairy Technology**, v.54, n. 2, p. 56–60, 2001.

CASALMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, E. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CASTILLEJOS, L.; CASALMIGLIA, S.; MARTÍN-TERESO, J.; TER WIJLEN, H. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1-4, p. 259-270, 2008.

CERUTTI, G.; MACHADO, M. A.; RIBALZI, L. Sulla distribuzione del colesterolo in latte e derivati. **Il latte**, v.11, p.1102–1108, 1993.

CHADDAD, F. Cooperativas no agronegócio do leite: mudanças organizacionais e estratégicas em resposta à globalização. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, v. 9, p. 69-78, 2007.

CLEFF, M. B.; MEINERZ A. R. & LUND, R. G. Fitoterapia aplicada a Medicina Veterinária. In: Meireles, M. C. A. & Nascente, P. S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Universitária/UFPel, p. 385-400, 2009.

CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B.; REIS, E. S.; MOREIRA, C. M. Crescimento de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de folhas de orégano sob malhas coloridas. **Global Science And Technology**, v. 5, n. 1, p. 11-22, 2012.

DANESHFAR, A.; KHEZELI, T.; LOFTI, H. J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. **Journal of Chromatography B**, n. 877, p. 456-460, 2009.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DENOBILE M., NASCIMENTO, S.E. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004.

DIONISI, F.; GOLAY, P. A.; AESCHLIMANN, J. M.; FAY, L. B. Determination of Cholesterol Oxidation Products in Milk Powders: Methods Comparison and Validation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, n. 46, p. 2227-2233, 1998.

ECONOMOU, K.D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C.D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family *Labiatae*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, n. 2, p. 109-113, 1991.

ELGAYYAR, M.; DRAUGHON, F. A.; GOLDEN, D. A.; MOUNT, J. R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, n. 64, p. 1019, 2001.

ESCARABAJAL, C.; TENUTA-FILHO, A. Estabilidade oxidativa do colesterol em ovo integral em pó. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 4, p. 483-490, 2005.

EVERS, J. M. The milkfat globule membrane—Compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 661-674, 2004.

EXARCHOU, V.; NENADIS, N.; TSIMIDOU, M.; GEROTHANASSIS, J. P.; TROGANIS, A.; BOSKOU, D. Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5294-5299, 2002.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FORNES, N. S.; MARTINS, I. S.; VELASQUEZ-MELENDZ, G.; LATORRE, M. R. D. O. Escores de consumo alimentar e níveis lipêmicos em população de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. 12-18, 2002.

FRANDSOM, R.D.; WILKE, W.L. & FAILS, A.D. **Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª ed., 454 p., 2003.

FREDEEN, A. H. Considerations in the nutritional modification of milk composition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 59, p. 185-197, 1996.

GALVÃO JÚNIOR, J. G. B.; RANGEL, A. H. N., DE MEDEIROS, H. R.; DA SILVA, J. B. A.; DE AGUIAR, E. M.; MADRUGA, R. C.; DE LIM JÚNIOR, D. M. Efeito da produção diária e da ordem de parto na composição físico-química do leite de vacas de raças zebuínas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.1, p.25-30, 2010.

GIANNENAS, I. A.; FLOROU-PANERI, P.; BOTSOGLOU, N. A.; CHRISTAKI, E.; SPAIS, A. B. Effect of supplementing feed with oregano and(or) alpha-tocopheryl acetate on growth of broiler chickens and oxidative stability of meat. **Journal Animal Science**, v. 14, p. 521–535, 2005.

GÓMEZ, M. E. B.; MENDONÇA-JÚNIOR, C. X.; MANCINI-FILHO, J. Estabilidade oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidants naturais. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 39, n. 4, p. 425-432, 2003.

GONZÁLES, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. *In: Usos do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

GOVARIS, A.; BOTSOGLOU, N.; PAPAGEORGIOU, G.; BOTSOGLOU, E.; AMBROSIADIS, I. Dietary versus post-mortem use of oregano oil and(or) alpha-tocopherol in turkeys to inhibit development of lipid oxidation in meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Sciences Nutrition**, v. 55, p. 115–123, 2004.

GRUMMER, R.R. Effect of Feed on the Composition of Milk Fat. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 9, p. 3244-3257, 1991.

GRÜN, I. U.; AHN, J.; CLARKE, A. D.; LORENZEN, C. L. Reducing Oxidation of Meat. **Food Technology**, v. 60, n. 1, p. 37-43, 2006.

GUARDIOLA, F.; BOATELLA, J.; CODONY, R. Determination of Cholesterol Oxidation Products by Gas Chromatography. *In: GUARDIOLA, F.; DUTTA, P. C.; CODONY, R.; SAVAGE, G. P. Cholesterol e Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*, Champaign: AOCS Press, 2002. 394 p.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P. B.; REFECAS, M.; BOATELLA, J. Biological effects of oxysterols: Current status. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 34, p. 193-211, 1996.

HALL, M.B. Recent advanced in non-ndf carbohydrates for the nutrition of lactating cows, *In: Simpósio Internacional em Bovinos de Leite*, 2, 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA-FAEPE, p.139-148, 2001.

HARPER, A. E. Dietary guidelines challenge animal product consumption. **Feedstuffs**, v. 2, p. 13-17, 1993.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; PONCE-ALQUICIRA, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; LEGARRETA, I. G. Antioxidante effect rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*)

and oregano (*Origanum vulgare L.*) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, v.82, n. 2, 410-417, 2009.

HIGLEY, N. A.; TAYLOR, S. L. Cholesterol oxides in processed meats. **Meat Science**, Oxford, v. 16, p. 175-188, 1986.

HOSSAIN, M. B.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. P. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidants compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*), marjoram (*Origanum majorana L.*) and oregano (*Origanum vulgare L.*) using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 126, p. 339-346, 2011.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Pecuária Municipal. **IBGE**, Rio de Janeiro, v. 37, p.1-55, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Efetivo dos rebanhos de grande porte em 31.12, segundo as Grandes Regiões e as Unidades da Federação. Pesquisa Pecuária Municipal (2010a). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab03.pdf>. Acesso em: nov. 2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de leite no período de 01.01 a 31.12, segundo as Grandes Regiões e as Unidades da Federação. Pesquisa Pecuária Municipal (2010b). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab06.pdf>. Acesso em: nov. 2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Aquisição alimentar domiciliar *per capita* anual, por Grandes Regiões, segundo os produtos - período 2008-2009. Pesquisa de Orçamentos Familiares (2009). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/tabelas_pdf/tab111.pdf>. Acesso em: nov. 2012.

ICH - International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JADHAV, S.J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHAVI, D. L. Lipid Oxidation in Biological and Food System. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S. S. and Salunkhe, D.K. Eds. **Food Antioxidants**. London and New York: Elsevier Applied Science, p. 5-63, 1996.

JENSEN, R. G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 295–350, 2002.

KATSANIDIS, E.; ADDIS, P. B. Novel hplc analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 11/12, p. 1137–1140, 1999.

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

LACERDA, E. C. Q. **Efeito da Inclusão de Orégano na Dieta de Vacas Leiteiras sobre a Qualidade do Leite**. 2012. 80 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

LAMPE, J. W. Spicing up a vegetarian diet: Chemopreventive effects of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 5795-5835, 2003.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida Moderna CLAE/HPLC**. Campinas: Atomo Editora, 2009. 384 p.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: Ed. RiMa, 2004. 62 p.

LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. Cholesterol Oxidation: Presence of 7-ketocholesterol in Different Food Products. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 13, p. 625-631, 2002.

LUDKE, M. C. M. M.; LÓPEZ, J. Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n.1, p. 181-187, 1999.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Cholesterol and Antioxidant Vitamins in Fat Fraction of Whole and Skimmed Dairy Products. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 234-238, 2010.

MC CLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Componentes principais dos alimentos: Lipídeos. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

MC CLUSKEY, 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. **Journal of Food Science**, n. 62, p. 331-337, 1997.

MEDINA, M. K. J. **Efeito da radiação ionizante e do armazenamento sobre a estabilidade oxidativa do colesterol em ovos crus e processados**. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo.

MONTEIRO, A. A.; PIRES, A. C. S.; ARAÚJO, E. A. **Tecnologia de Produção de Derivados de Leite**. Viçosa: UFV, 2007. 81p.

MORALES-AIZPÚRUA, I. C.; TENUTA-FILHO, A. Colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol em maionese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.3, p. 495-499, 2005.

MORALES-AIZPÚRUA, I. C.; TENUTA-FILHO, A. Óxidos de colesterol: ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n.4, p. 431-432, 2002.

MORIN, R. J.; HU, B.; PENG, S. K.; SEVANI, A. Cholesterol oxidation and cancer. In: PENG, S. K.; MORIN, R. J. **Biological effects of cholesterol oxides**. London: CRC Press, 1991.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 273-300, 1990.

NIELSEN, J. H.; OLSEN, C. E.; DUEDAHL, C.; SKIBSTED, L. H. Isolation and Quantification of Cholesterol Oxides in Dairy Products by Selected Ion Monitoring Mass Spectrometry. **Journal of Dairy Research**, v. 62, p. 101–113, 1995.

NIELSEN, J. H.; OLSEN, C. E.; JENSEN, C.; SKIBSTED, L. H. Cholesterol Oxidation in Butter and Dairy Spread During Storage. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 159–163, 1996.

NIXDORF, S. L.; MATSUSHITA, M.; DE SOUZA, N. E. Colesterol em refeições comerciais consumidas na cidade de Londrina (PR), Brasil. **B.CEPPA**, v. 15, n. 2, p. 149-158, 1997.

NOCEK, J. E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. **Journal of dairy science**, v. 71, n. 5, p. 2069, 1988.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. Washington: Ed. National Academy Press, 7^a ed., 387p., 2001.

OLIVEIRA, A. S. **Consumo, digestibilidade, produção e composição do leite, produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações contendo diferentes teores de uréia**. 2000, 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa.

ORCZEWSKA-DUDEK, S.; BEDERSKA-ŁOJEWSKA, D.; PIESZKA, M.; PIETRAS, M. P. Cholesterol and lipid peroxides in animal products and health implications – a review. **Annals of Animal Science**, v. 12, n. 1, p. 25-52, 2012.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de alimentos - Alimentos de origem animal**, v. 2, Porto Alegre: Artmed, 2005. 280 p.

OSADA, K. Cholesterol Oxidation Products: Other Biological Effects In: GUARDIOLA, F.; DUTTA, P. C.; CODONY, R.; SAVAGE, G. P. **Cholesterol e Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects**, Champaign: AOCS Press, 2002. 394 p.

OTAEGUI-ARRAZOLA, A.; MENENDEZ-CARREÑO, M.; ANSORENA, D.; ASTIASARAN, I. Oxysterols: A world to explore. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 48, p. 3289–3303, 2010.

PANIANGVAIT, P.; KING, A. J.; JONES, A. D.; GENNAN, B. G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 1159-1174, 1995.

PENG, S.-K.; HU, B.; MORIN, R. J. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v.5, p.144-152, 1991.

PEREDA, J. A. O.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de alimentos**. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

PETRAKIS, N. L.; GRUENKE, L. D.; CRAIG, J. L. Cholesterol and cholesterol epoxides in nipple aspirates of human breast fluid. **Cancer Research**, Philadelphia, v.41, p.2563-2565, 1981.

PIIRONEN, V.; TOIVO, J.; LAMPI, A. M. New Data for Cholesterol Contents in Meat, Fish, Milk, Eggs and Their Products Consumed in Finland. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 705–713, 2002.

PIZZALE, L.; BORTOLOMEAZZI, S. V.; ÜBEREGGER, E.; CONTE, L. S. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1645-1651, 2002.

PLOZZA, T.; CRAIG, V.; TRENNERY, A.; CARIDI, D. The simultaneous determination of vitamins A, E and β-carotene in bovine milk by high performance liquid chromatography–ion trap mass spectrometry (HPLC–MSn). **Food Chemistry**, v. 134, p. 559-563, 2012.

POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 223-227, 1991.

PRABHASANKAR, P., GANESAN, P., BHASKAR, N.; HIROSE, A., NIMISHMOL S.; GOWDA, L. R.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. **Food Chemistry**, v. 115, n.2, p.501–508, 2009.

RAITH, K.; BRENNER, C.; FARWANAH, H.; MÜLLER, G.; EDER, K.; NEUBERT, R. H. H. A new LC/APCI-MS method for the determination of cholesterol oxidation products in food. **Journal of Chromatography A**, n. 1067, p. 207-211, 2005.

REGITANO-d'ARCE, M. A. Deterioração de lipídeos – Rango. In: OETTERER, M.; REGITANO-d'ARCE, M. A.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, 2006. 612 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27, 771-780, 2004.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. *Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG)*; Versão 9.1; Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2007.

SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N. Effects of grilling on cholesterol oxide formation and fatty acids alterations in fish. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 385-390, 2010.

SALDANHA, T.; MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p. 109-113, 2004.

SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC Separation and Determination of 12 Cholesterol Oxidation Products in Fish: Comparative Study of RI, UV, and APCI-MS Detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p. 4107-4113, 2006.

SARANTINOS, J.; O'DEA, K.; SINCLAIR, A. J. Cholesterol oxides in Australian foods identification and quantification. **Food Australia**, v. 45, n. 10, p. 485-490, 1993.

SCHER, C.; RIBEIRO, J. P. Colesterol e gorduras em alimentos brasileiros: implicações para a prevenção da aterosclerose. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.92, n.3, p.190-195, 2009.

SEVANIAN, A.; PETERSON, A. R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.24, n.10/11, p.1103-1110, 1986.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**, v. 44, p. 158-163, 2000.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SIEBER, R. Oxidised cholesterol in milk and dairy products. **International Dairy Journal**, n. 15, p. 191-206, 2005.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, J. A. **Tópicos da tecnologia dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 325 p., 2000.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3 ed. Viçosa: UFV, 235p., 2002.

SIMITZIS, P. E., DELIGEORGIS, S. G., BIZELIS, J. A., DARDAMANI, A., THEODOSIOU, I.; FEGEROS, K. Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. **Meat Science**, v.79, n.2, p. 217-223, 2008.

SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Colesterol da mesa ao corpo. Maringá: Eduem, 2011. 117p.

SPORE, A.; BRILL, D. R.; SCHAFFNER, C. P. Epoxycholesterols in secretions and tissue of normal, benign, and cancerous human prostate glands. **Urology**, New York, v.20, p.244-250, 1982.

SRINIVASAN, K. Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. **Food Research International**, v. 38, n. 1, p. 77-86, 2005.

STATON, C.; DEVERY, R. Formation and Content of Cholesterol Oxidation Products in Milk and Dairy Products In: GUARDIOLA, F.; DUTTA, P. C.; CODONY, R.; SAVAGE, G. P. **Cholesterol e Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects**, Champaign: AOCS Press, 2002. 394 p.

STROHER, G. L.; RODRIGUES, A. C.; DIAS, L. F.; PEDRÃO, M. R.; PAULA, L. N. de; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E. de. Comparative Analysis and Validation Methodologies of GC and HPLC for Analysis of Cholesterol in Meat Products. **American Journal of Analytical Chemistry**, n. 3, p. 306-311, 2012.

SWAISGOOD, H. E. Características do leite. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos**. 4 ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011. 161p.

TALPUR, F. H.; BHANGER, M. I.; KHUHAWAR, M. Y. Comparison of fatty acids and cholesterol content in the milk of Pakistani cow breeds. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 698–703, 2006.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.3, p.449-454, jul/set, 2007.

TAY, C. Y.; CHEN, Y. C.; CHEN, B. H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in food: An overview (Part I). **Journal of Food Drug Analytical**, Nankang, v. 7, n. 4, p. 243-257, 1999.

TENUTA-FILHO, A.; MORALES-AIZPURÚA, I. C.; MOURA, A. F. P. de; KITAHARA, S. E. Óxidos de colesterol em alimentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 319-325, 2003.

TORRES, A.; FRIAS, J.; GRANITO, M.; VIDAL-VALVERDE, C. Germinated *Cajanus cajan* seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v.101, n.1, p. 202–211, 2007.

TRAESEL, C. K.; LOPES, S. T. A.; WOLKMER, P.; SCHMIDT, C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de

crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 278-284, 2011.

TSIMOGIANNIS, D.; STAVRAKAKI, M.; OREOPOULOU, V. Isolation and characterization of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 39-48, 2006.

UBHAYASEKERA, S. J. K. A.; VERLEYEN, T.; DUTTA, P. C. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. **Food Chemistry**, v. 84, p. 149-157, 2004.

ULBERTH, F.; BUCHGRABER, M. Extraction and Purification of Cholesterol Oxidation Products. In: GUARDIOLA, F.; DUTTA, P. C.; CODONY, R.; SAVAGE, G. P. **Cholesterol e Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects**, Champaign: AOCS Press, 2002. 394 p.

USDA (United States Department of Agriculture) – Dairy: World Markets and Trade/ December 2010 (2011). Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/estatisticas/estatisticas-do-leite-milkpoint-80417n.aspx>> Acesso em: nov. de 2012.

VEKIARI, S.A.; OREOPOULO, V.; TZIA, C.; THOMOPOULOS, C.D. Oregano flavonoids as lipid antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 6, p. 483-487, 1993.

VELARDE, E.; GONZÁLEZ, A. Colesterol y Óxidos de Colesterol en Carne de Pollo. **Revista de Química**, jan-dez, p. 11-20, 2006.

VISENTAINER, J. V.; SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N.; FRANCO, M. R. B. Relação entre teores de colesterol em filés de tilápias e níveis de óleo de linhaça na ração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 310-314, 2005.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

YAN, P. S.; WHITE, P. Cholesterol Oxidation in Heated Lard Enriched with Two Levels of Cholesterol. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 67, p. 927-931, 1990.

YANISHLIEVA-MASLAROVE, N.V. Inhibiting oxidation. In: Pokorny, J., Yanishliera, N. & Gordon M. Eds. **Antioxidant in Food: Practical Application**. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd. Abington, p. 331-372, 2001.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M. A. J. S. **Ciência de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 729 p., 2001.

ZHENG, W. & WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.