

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO DO PROJETO: “Efeito da irradiação e do armazenamento em ovos crus e processados sobre a estabilidade oxidativa do colesterol”.

PESQUISADORA: Marliz Klaumann Julca Medina

ORIENTADOR: Alfredo Tenuta Filho

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA: Marliz Klaumann Julca Medina
Alfredo Tenuta Filho
Júlia Maria Pavan Soler
Lúcia Pereira Barroso
Edilene F. N. Gomes
Lourrine Faria
Karen Elisa do Vale Nogueira
Tatiana Terabayashi Melhado

DATA: 10/05/05

FINALIDADE DA CONSULTA: Apoio estatístico aos resultados do projeto

RELATÓRIO ELABORADO POR: Edilene F. N. Gomes
Lourrine Faria

1. Introdução

O colesterol é um lipídeo monoinsaturado, sendo passível de oxidação com a influência de uma série de fatores como luz, temperatura, radiações, radicais livres e íons metálicos entre outros. Neste experimento, os fatores controlados foram a temperatura e tempo. Os óxidos de colesterol têm sido estudados por interesse toxicológico e clínico devido à sua relação com os processos citotóxicos, mutagênicos, aterogênicos e carcinogênicos (Maercker, 1987). Estudos sobre a determinação de óxidos de colesterol em vários alimentos provenientes de origem animal têm sido realizados. Em particular, o efeito de métodos e períodos de Estocagem ou tipo de Processamento executado no nível de oxidação do colesterol têm sido analisados.

Entre alimentos provenientes de origem animal, o ovo foi selecionado para o estudo por ser muito rico em colesterol e por conter fontes de proteínas animal. O 7-cetocolesterol, um dos óxidos com maior presença nos alimentos de origem animal, será utilizado como indicador da oxidação do colesterol.

Objetivos do estudo:

- ❖ Avaliar o efeito da irradiação em 0, 1, 2 e 3 kGy durante o armazenamento dos ovos em 1 e 30 dias após a irradiação (tempos 0 e 30), mantidos em temperatura de refrigeração (1 a 2°C);
- ❖ Avaliar o efeito da fritura e cozimento em água de ovos irradiados com 3 kGy no tempo 0.

2. Descrição do Estudo

Para a Estocagem foram escolhidos 2 períodos de análise: 0 e 30 dias. Foram compradas 20 dúzias de ovos para cada Realização, que consiste na repetição do experimento (total de Realizações=3). Destas 20 dúzias foram aleatoriamente retiradas 12 dúzias. Cada tratamento (0, 1, 2, 3 kGy) continha 3 dúzias de ovos e delas foram aleatoriamente retirados 18 ovos, sendo que 15 ovos foram utilizados para compor a amostra final. Foi obtida uma mistura homogênea com os 15 ovos e dela foram

retiradas 3 alíquotas (triplicata). Os ovos foram irradiados com 0 (sem irradiação), 1, 2 e 3 kGy e analisados no dia seguinte (tempo 0); os restantes foram estocados por 30 dias permanecendo em temperatura refrigerada (1 a 2°C) durante esta Estocagem, (vide Apêndice A, Figura 1).

Para o Processamento temos os ovos: cru, cozido por 10 minutos ou frito por 6 minutos. Os ovos foram irradiados com 3 kGy e analisados no tempo 0 (1 dia após a irradiação). Foram compradas 7 dúzias de ovos para cada Realização (total de Realizações=3) e destas 7 dúzias foram aleatoriamente retiradas 3 dúzias. Cada tratamento continha 1 dúzia de ovos, dos quais foram utilizados 10 ovos para compor a amostra final (vide Apêndice A, Figura 2). Os ovos crus foram colocados em um béquer e misturados com uma espátula, de maneira a transformá-los numa mistura líquida e homogênea. Os ovos cozidos foram passados por um processador de alimentos, resultando em uma massa de ovos cozidos. Para os ovos fritos, foi utilizada apenas a gema para análise.

As 3 alíquotas foram utilizadas para medir a oxidação do colesterol por meio das variáveis: Colesterol (mg/100g), 7-cetocolesterol ($\mu\text{g/g}$), 7- α hidroxicolesterol ($\mu\text{g/g}$), 7- β hidroxicolesterol ($\mu\text{g/g}$), 25-hidroxicolesterol ($\mu\text{g/g}$), todas medidas por HPLC (indicador da oxidação do colesterol). A necessidade destas 3 alíquotas deve-se a possíveis diferenças na quantificação das variáveis medidas se caso for coletada mais gema ou mais clara. A pesquisadora optou por coletar também 3 alíquotas para o Processamento frito, apesar de ter utilizado somente a gema.

3. Descrição das Variáveis

- Variáveis independentes
 - ❖ **Estocagem:** Período de Estocagem dos ovos (0 dia; 30 dias);
 - ❖ **Processamento:** Manipulação e transformação dos ovos, dividido em três níveis: cru – 1º. nível, cozido por 10 minutos – 2º. nível e frito por 6 minutos – 3º. nível;
 - ❖ **Irradiação:** medido em 0, 1, 2 e 3 kGy.

- Variáveis resposta

- ❖ **Colesterol (mg/100g)**: Lipídeo monoinsaturado, obtido por HPLC;
- ❖ **7-cetocolesterol (μg/g)**: óxido proveniente da oxidação do colesterol, obtido por HPLC;
- ❖ **7-α hidroxicolesterol (μg/g)**: óxido proveniente da oxidação do colesterol, obtido por HPLC;
- ❖ **7-β hidroxicolesterol (μg/g)**: óxido proveniente da oxidação do colesterol, obtido por HPLC;
- ❖ **25-hidroxicolesterol (μg/g)**: óxido proveniente da oxidação do colesterol, obtido por HPLC.

4. Situação do Projeto

O planejamento deste projeto foi realizado no CEA (Centro de Estatística Aplicada) em 05/08/2003. Esta nova fase requer um estudo de várias variáveis, porém pela limitação do tempo serão analisadas as variáveis: Colesterol (mg/100g) e 7-cetocolesterol (μg/g).

5. Sugestões do CEA

Recomendamos que os dados sejam organizados como no formato da Tabela 1. Esse arquivo pode ser construído, por exemplo, em programas como o Microsoft Excel.

Tabela 1: 7-Cetocolesterol dos ovos irradiados e estocados por 30 dias.

Realização	Estocagem (dias)	Irradiação (dose)	Alíquota	7-cetocolesterol (µg/g)
1	0	0	1	20,707
1	0	0	2	22,213
1	0	0	3	19,960
1	0	1	1	20,164
1	0	1	2	21,443
1	0	1	3	22,960
1	0	2	1	27,918
1	0	2	2	30,245
1	0	2	3	24,245
...
2	30	0	2	25,421
2	30	0	3	25,722
2	30	1	1	20,805
2	30	1	2	21,322
2	30	1	3	22,802
2	30	2	1	34,987
2	30	2	2	36,637
...
3	0	0	1	21,590
3	0	0	2	20,771
3	0	0	3	22,523
3	0	1	1	21,707
...
3	0	1	3	24,462
3	0	2	2	23,857

5.1 Análise Descritiva

Estatísticas descritivas das variáveis 7-cetocolesterol e Colesterol divididas entre Estocagem e Processamento estão apresentadas no Apêndice B.

Por meio das tabelas de medidas descritivas para a variável 7-cetocolesterol (Tabela B.1) e para a variável Colesterol (Tabela B.4), considerando as médias e os desvios padrão, notamos que, as concentrações de 7-cetocolesterol e Colesterol apresentaram-se maiores no nível de Irradiação 2.

Observando os níveis de Irradiação na Estocagem 30 para as variáveis 7-cetocolesterol (Tabela B.2) e Colesterol (Tabela B.5), considerando as médias e os

desvios padrão, houve maior concentração de 7-cetocolesterol e Colesterol no nível de Irradiação 3.

Analisando o 7-cetocolesterol (Tabela B.3) e o Colesterol (Tabela B.6) para o níveis de Processamento, considerando as médias e os desvios padrão, as concentrações de 7-cetocolesterol e Colesterol apresentaram-se maiores no ovo Frito.

Gráficos de perfis de médias e Box-plot encontram-se no Apêndice C. Observando o gráfico de perfis de médias do 7-cetocolesterol (Gráfico C.1), em geral, observamos que, as médias de 7-cetocolesterol aumentam à medida que temos maior tempo de Estocagem, exceto para a Irradiação 1 kGy, onde a média diminuiu. A partir do Gráfico C.2, notamos que a média do Processamento Cru é menor do que a média dos Processamentos Cozido e o Frito. A variabilidade entre os níveis do fator Processamento são diferentes, sendo maior para o Processamento Frito.

Observando o gráfico de perfis de médias do Colesterol (Gráfico C.3), em geral, observamos que, as médias de Colesterol aumentam à medida que temos maior tempo de Estocagem, exceto para a Irradiação 1 kGy que, aparentemente, manteve-se constante. A partir do Gráfico C.4, notamos que a média do Processamento Cru é menor que as médias dos Processamentos Cozido e Frito. A variabilidade entre os níveis do fator Processamento são diferentes, sendo menor para o Processamento Cru.

5.2 Análise Inferencial

Como citado na Seção 2, se apenas uma alíquota fosse coletada de uma mistura, poderia haver uma quantidade maior de clara ou gema que influenciaria nos resultados da análise. Para contornar esse problema, a pesquisadora coletou três alíquotas de uma mesma mistura a fim de obter uma melhor precisão. Desta forma, foram calculadas as médias dessas três alíquotas para análise.

No primeiro experimento, há o interesse em verificar os efeitos dos fatores Estocagem, Irradiação e um possível efeito de interação entre esses dois fatores sobre o Colesterol presente nos ovos e sobre a variável 7-cetocolesterol, um dos óxidos de

colesterol mais preocupantes, segundo a pesquisadora, no sentido de ser altamente prejudicial à saúde. No segundo experimento, há o interesse em verificar o efeito de fator Processamento sobre as mesmas variáveis supracitadas.

Foi fixada uma probabilidade de 10% para a tomada de decisões desta análise.

5.2.1 Variável 7-cetocolesterol na Estocagem

Primeiramente, ajustamos um modelo de Análise de Variância com dois fatores fixos (Neter et al.,1996, p.795-825), onde as fontes de variação são: Estocagem, Irradiação e a interação entre Estocagem e Irradiação.

O modelo obtido apresenta significância apenas dos efeitos do fator Estocagem, pois os efeitos da interação entre os fatores Estocagem e Irradiação e do fator Irradiação foram considerados não significantes ($p > 0,10$). Além disso, verificamos que para cada grupo de Estocagem e Irradiação, as variâncias dos resíduos do modelo ajustado eram diferentes, assim utilizamos o inverso da variância do 7-cetocolesterol para a combinação de cada nível de Estocagem e de Irradiação, obtendo um ajuste ponderado. Desta forma, as suposições do modelo estão satisfeitas.

Tabela 2: Análise de variância para o 7-cetocolesterol na Estocagem.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>G.L</i>	<i>Soma de quadrados ajustados</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>teste</i>	<i>p-valor</i>
Estoc	1	3,08	3,08	3,08	0,01
Irrad	3	7,16	2,38	2,39	0,11
Estoc * Irrad	3	6,30	2,10	2,10	0,14
Resíduo	16	21,99	1,00		
Total	23	24,82			

Na Tabela 3 estão apresentadas as estimativas das médias para cada nível do fator Estocagem e seus respectivos erros-padrão.

Tabela 3: Médias de 7-cetocolesterol na Estocagem e respectivos erros - padrão.

<i>Estocagem (dias)</i>	<i>Estimativa</i>	<i>Erro - padrão</i>
0	21,616	0,763
30	24,920	1,810

Por meio da Tabela 3, podemos considerar que há diferença entre as médias de 7-cetocolesterol na Estocagem (0, 30 dias). A média de 7-cetocolesterol é significativamente maior para o tempo 30 dias, ou seja, o tempo de Estocagem aumenta a oxidação do 7-cetocolesterol.

5.2.2 Variável 7-cetocolesterol no Processamento

Ajustamos um modelo de Análise de Variância com um fator fixo, (Neter et al.,1996, p.671-729).

Além disso, verificamos que para cada grupo de Processamento as variâncias dos resíduos do modelo ajustado eram diferentes, assim utilizamos o inverso da variância do 7-cetocolesterol para cada nível de Processamento obtendo um ajuste ponderado. Desta forma, as suposições do modelo estão satisfeitas.

Tabela 4: Análise de variância para a média de 7-cetocolesterol no Processamento

<i>Fonte de Variação</i>	<i>G.L</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>teste</i>	<i>p-valor</i>
Processamento	2	3,64	1,82	1,82	0,24
Resíduo	6	6,00	1,00		
Total	8	9,64			

Conclui-se que não há efeito de Processamento ($p = 0,24$) cuja probabilidade é maior do que 10%.

Na Tabela 5 estão apresentados a estimativa da média comum e seu respectivo erro-padrão.

Tabela 5: Média estimada do 7-cetocolesterol no Processamento e erro - padrão.

Média	Erro-padrão
22,73	1,21

5.2.3 Variável Colesterol na Estocagem

Ajustamos um modelo de Análise de Variância com dois fatores fixos (Neter et al., 1996, p.795-825), onde as fontes de variação são: Estocagem, Irradiação e a interação entre Estocagem e Irradiação.

Por meio do modelo obtido abaixo, há efeito de interação entre os fatores Irradiação e Estocagem ($p = 0,08$), além disso, verificamos que para cada grupo de Estocagem e de Irradiação, as variâncias dos resíduos do modelo ajustado eram diferentes, assim utilizamos o inverso da variância do colesterol para cada combinação entre os níveis do fator Estocagem e Irradiação, obtendo um ajuste ponderado. Desta forma, as suposições do modelo estão satisfeitas.

Tabela 6: Análise de variância para a média de Colesterol na Estocagem

<i>Fonte de Variação</i>	<i>G.L</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>teste</i>	<i>p-valor</i>
		<i>ajustados</i>			
Estoc	1	10,49	10,48	10,49	0,005
Irrad	3	9,19	3,06	3,06	0,058
Estoc* Irrad	3	8,10	2,69	2,70	0,080
Resíduo	16	15,99	0,99		
Total	23				

No Apêndice D, comparamos as médias do Colesterol entre os níveis de Estocagem e de Irradiação por meio do teste simultâneo de Tukey. Conclui-se que, a única diferença significativa entre as médias de Colesterol é para Estocagem no tempo 0 dias e Irradiação 0 kGy (sem irradiação) e do tempo 30 dias e Irradiação 3 kGy, ou seja, há diferença de médias entre os ovos que não receberam irradiação e foram analisados no início do experimento (não foram estocados) e os ovos que receberam 3 kGy de irradiação e foram medidos após 30 dias de Estocagem.

5.2.4 Variável Colesterol no Processamento

Ajustamos um modelo de Análise de Variância com um fator fixo (Neter et al.,1996, p.671-729).

Além disso, verificamos que para cada grupo de Processamento as variâncias dos resíduos do modelo ajustado eram diferentes, assim utilizamos o inverso da variância do colesterol para cada nível de Processamento obtendo um modelo ponderado. Desta forma, as suposições do modelo estão satisfeitas.

Tabela 7: Análise de variância para a média de Colesterol no Processamento

<i>Fonte de Variação</i>	<i>G.L</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>teste</i>	<i>p-valor</i>
Processamento	2	8,5017	4,2509	4,25	0,071
Resíduo	6	5,9987	0,9998		
Total	8	14,5004			

Conclui-se que há efeito de Processamento ($p = 0,071$) e, desta forma, comparamos as médias do Colesterol entre os níveis de Processamento por meio de comparações múltiplas de Tukey (Neter et al.,1996, p.725-732), obtendo-se os intervalos com coeficiente de confiança de 85% apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Intervalos de Confiança para as médias de Colesterol no Processamento

<i>Processamento</i>	<i>Estimativa diferença</i>	<i>Intervalo de confiança de 85%</i>
Cozido - Cru	5,653	[-1,966; 13,272]
Frito - Cozido	2,173	[-5,446; 9,792]
Frito - Cru	7,826	[0,207; 15,445]

Por meio dos intervalos apresentados, podemos considerar que a única diferença significativa entre as médias de Colesterol foi para os Processamentos Cru e Frito, onde a média de Colesterol para o Processamento Frito foi maior que para o Processamento Cru. As médias de Colesterol para os Processamentos Cru e Cozido e Frito e Cozido, não apresentaram diferenças significativas.

6. Referências Bibliográficas

NETER, J.; KUTNER, M. H.; NASCHTSHEIN, C. J. and WASSERMAN, M. **Applied linear statistical models**. 3rd ed. Chicago: Irwin. 1408p. 1996.

MAERCKER, G. Cholesterol autoxidation – current status. **Journal of American Oil Chemistry Society**, 61, 388-392. 1987.

APÊNDICE A

APÊNDICE B
Tabelas

Tabela B.1: Medidas descritivas da variável **7-cetocolesterol** na Estocagem 0 para os níveis de Irradiação.

Irradiação	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
0	9	20,175	1,853	17,765	18,023	20,707	21,902	22,523
1	9	21,193	1,664	19,595	19,720	20,963	22,334	24,462
2	9	22,570	4,450	17,830	18,010	21,690	26,080	30,250
3	9	22,524	2,198	19,500	20,858	21,838	24,355	26,459

Tabela B.2: Medidas descritivas da variável **7-cetocolesterol** na Estocagem 30 para os níveis de Irradiação.

Irradiação	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
0	9	23,116	2,186	19,785	21,075	23,494	25,397	25,722
1	9	19,962	2,089	17,564	17,753	20,805	21,681	22,802
2	9	27,430	7,230	18,330	19,310	27,910	35,030	36,640
3	9	29,170	6,830	21,340	22,190	27,360	36,680	38,590

Tabela B.3: Medidas descritivas da variável **7-cetocolesterol** para os níveis de Processamento.

Proc.	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Cozido	9	23,710	3,250	20,160	20,590	22,950	27,080	28,950
Cru	9	20,369	1,129	18,980	19,318	20,139	21,413	22,031
Frito	9	24,100	4,360	18,210	18,770	25,380	27,980	29,070

Tabela B.4: Medidas descritivas da variável **colesterol** na Estocagem 0 para os níveis de Irradiação.

Irradiação	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
0	9	35,536	1,623	32,813	33,843	36,134	36,794	37,473
1	9	37,624	2,332	34,917	36,152	36,832	39,358	42,429
2	9	40,160	5,110	33,350	34,170	42,260	43,850	47,450
3	9	37,705	2,724	33,291	35,938	36,888	40,277	41,933

Tabela B.5: Medidas descritivas da variável **colesterol** na Estocagem 30 para os níveis de Irradiação.

Irradiação	N	Média	desvio padrão	mínimo	Q1	mediana	Q3	máximo
0	9	41,400	3,770	35,740	37,450	42,940	44,860	45,170
1	9	38,210	2,285	33,917	36,832	38,023	40,407	41,133
2	9	46,620	6,660	39,300	40,450	44,670	54,240	56,450
3	9	48,420	5,260	40,870	42,190	49,670	53,240	53,830

Tabela B.6: Medidas descritivas da variável **colesterol** para os níveis de Processamento.

Proc.	N	média	desvio padrão	Mínimo	Q1	mediana	Q3	máximo
Cozido	9	42,880	4,200	37,300	37,990	43,810	46,83	48,000
Cru	9	37,230	1,716	34,626	35,303	37,686	38,569	39,291
Frito	9	45,060	4,620	39,140	39,400	46,240	48,85	51,210

APÊNDICE C

Gráficos

Gráfico C.1: Gráfico de perfis de médias do 7-cetocolesterol na Estocagem

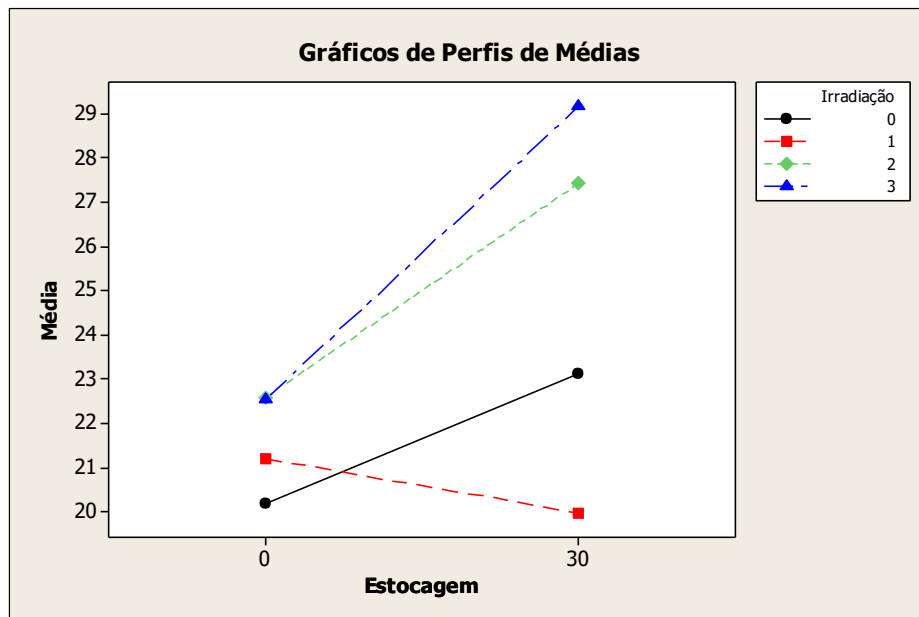


Gráfico C.2: Boxplot do 7-cetocolesterol vs Processamento

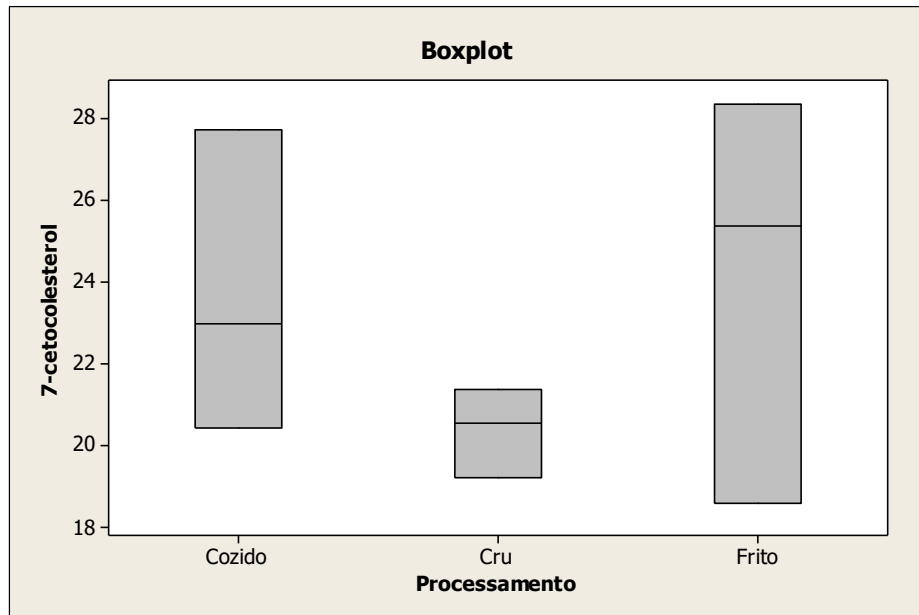


Gráfico C.3: Gráfico de perfis de médias do Colesterol na Estocagem

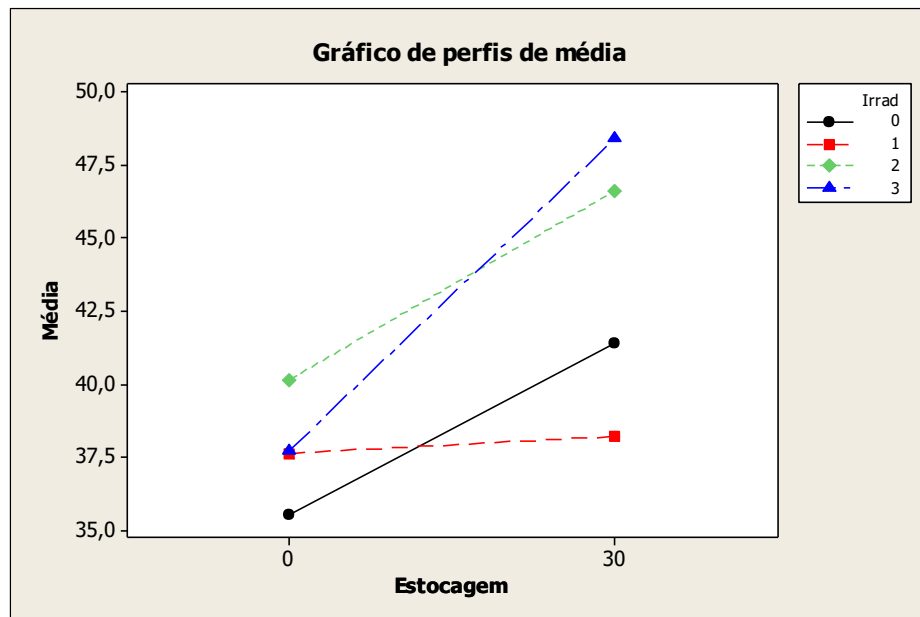
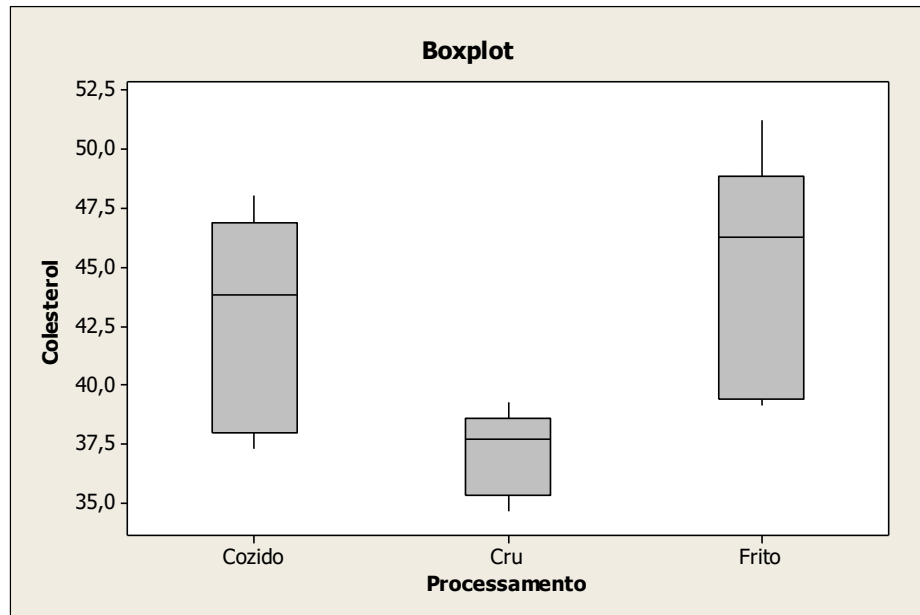


Gráfico C4: Boxplot do Colesterol vs Processamento



APÊNDICE D
Tabela de comparação entre médias

Tabela D1. Teste simultâneo de Tukey para a comparação entre médias das combinações entre os níveis Estocagem e Irradiação.

X		Y		X-Y	Desvio-padrão da diferença	Estatística t	p-valor ajustado
Estoc.	Irrad.	Estoc.	Irrad.				
0	0	0	1	2,088	1,496	1,395	0,847
0	0	0	2	4,622	3,409	1,356	0,864
0	0	0	3	2,169	1,975	1,098	0,948
0	0	30	0	5,867	2,559	2,293	0,354
0	0	30	1	2,675	1,582	1,691	0,693
0	0	30	2	11,080	4,522	2,450	0,283
0	0	30	3	12,885	3,550	3,629	0,037
0	1	0	2	2,534	3,412	0,743	0,994
0	1	0	3	0,081	1,980	0,041	1,000
0	1	30	0	3,779	2,563	1,474	0,810
0	1	30	1	0,587	1,588	0,369	1,000
0	1	30	2	8,992	4,524	1,987	0,518
0	1	30	3	10,797	3,553	3,039	0,108
0	2	0	3	-2,453	3,647	-0,673	0,997
0	2	30	0	1,244	3,994	0,312	1,000
0	2	30	1	-1,948	3,450	-0,565	0,999
0	2	30	2	6,457	5,464	1,182	0,926
0	2	30	3	8,262	4,691	1,761	0,652
0	3	30	0	3,698	2,869	1,289	0,890
0	3	30	1	0,506	2,046	0,247	1,000
0	3	30	2	8,911	4,705	1,894	0,573
0	3	30	3	10,716	3,780	2,835	0,154
30	0	30	1	-3,192	2,614	-1,221	0,914
30	0	30	2	5,213	4,978	1,047	0,959
30	0	30	3	7,018	4,115	1,705	0,684
30	1	30	2	8,405	4,553	1,846	0,602
30	1	30	3	10,210	3,590	2,844	0,151
30	2	30	3	1,805	5,553	0,325	1,000