

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO DO PROJETO: “Efeito do armazenamento e processamentos sobre a estabilidade oxidativa do colesterol em ovos”.

PESQUISADORA: Marliz Klaumann Julca Medina

ORIENTADOR: Alfredo Tenuta Filho

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

FINALIDADE DO PROJETO: Mestrado

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA: Alfredo Tenuta Filho

Marliz Klaumann Julca Medina

Carlos Alberto de Bragança Pereira

Danielle Daffre Carvalho

Émerson Daniel de Almeida

Eliane Shizue Miyashiro

Fabíola Rocha de Santana Giroldo

Levindo David dos Santos

DATA: 05/08/2003

FINALIDADE DA CONSULTA: Planejamento do experimento

RELATÓRIO ELABORADO POR: Danielle Daffre Carvalho

Émerson Daniel de Almeida

1. Introdução

O colesterol é um lipídeo monoinsaturado, sendo passível de oxidação com a influência de uma série de fatores como a luz, a temperatura, as radiações, os radicais livres entre outros. 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). Evidências mostram que esses óxidos são mais potentes que o próprio colesterol na produção de dano endotelial, induzindo assim a formação da placa ateromatosa (Imai et al., 1976). Devido a estes fatos, 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.

Neste estudo, serão utilizados ovos, que constituem importantes fontes de proteína animal na dieta e são muito ricos em colesterol. O 7-cetocolesterol, um dos óxidos com maior presença nos alimentos de origem animal será utilizado como indicador da oxidação do colesterol.

Os objetivos do estudo são:

- Avaliar o efeito do tempo de armazenamento (0, 15 e 30 dias) na variação da oxidação do colesterol em ovos mantidos em temperatura ambiente (25°C) e sob refrigeração (4 a 7°C);
- Avaliar o efeito da fritura (gema mole) e cozedura em água na casca (ovo cozido) na variação da oxidação do colesterol, considerando o ovo cru como controle.

2. Descrição do estudo

Para que haja mais de uma observação por situação a ser estudada (auxiliando a análise estatística posterior) dentro das condições financeiras disponíveis foi definida a execução de três realizações do seguinte processo: 180 ovos serão comprados em supermercado e divididos em dois blocos de 90 ovos cada, sendo um deles estocado a

temperatura ambiente (25°C) e o outro refrigerado (4 a 7°C). Os 90 ovos de cada bloco formarão três grupos de 30 ovos, sendo cada um armazenado por um determinado período de tempo (0, 15 ou 30 dias) e dividido em três lotes de 10 ovos. Cada lote sofrerá um dos três tipos de processamento (cru, cozido por 10 minutos ou frito com gema mole). Após essa etapa, o lote de ovos crus será colocado em um “becker” e misturado com uma espátula, de maneira a transformá-lo numa mistura líquida e homogênea. Os lotes de ovos cozidos e fritos serão passados por um processador de alimentos, resultando em uma massa de ovos cozidos e uma pasta de ovos fritos. A Figura A.1 ilustra o planejamento.

Em seguida, para cada variável de interesse, serão colhidas 3 amostras de 3g das misturas provenientes dos lotes. Para cada lote, teremos então:

- 3 amostras de 3g utilizadas para medir a oxidação do colesterol através do indicador 7-cetocolesterol ($\mu\text{g/g}$);
- 3 amostras de 3g utilizadas para medir o colesterol ($\text{mg}/100\text{g}$).

A utilização de 3 amostras deve-se a possíveis diferenças na quantificação das variáveis medidas se nas alíquotas for coletada mais gema ou mais clara. Para a análise inferencial, a média destas três medidas será utilizada como variável resposta.

3. Descrição das variáveis

- **Temperatura:** Temperatura de estocagem dos lotes de ovos (25°C; 4 a 7°C);
- **Período:** Período de estocagem dos lotes de ovos em cada temperatura de estocagem (0 dia; 15 dias; 30 dias);
- **Processamento:** Tipo de processamento das amostras da mistura dos ovos (cru, cozido por 10 minutos e frito com a gema mole);
- **Oxidação ($\mu\text{g/g}$):** Nível de oxidação do colesterol, utilizando o óxido 7-cetocolesterol como indicador, obtida por cromatógrafo a líquido de alto desempenho (HPLC);
- **Colesterol ($\text{mg}/100\text{g}$):** Obtido por HPLC.

4. Situação do projeto

O projeto encontra-se em fase de planejamento para futura coleta dos dados.

5. Sugestões do CEA

O primeiro problema a ser considerado no planejamento refere-se ao número de ovos que devem ser colocados nas misturas. Para podermos tomar uma decisão otimizada, teríamos de obter resultados com diferentes quantidades de ovos para termos idéia da variação da medida quando o número de ovos é modificado. Contudo, esse tipo de estudo não pode ser realizado em função do elevado custo das análises laboratoriais. A quantidade de ovos em cada mistura foi, então, fixada em 10 unidades. Este número foi definido porque a pesquisadora acredita que ele é representativo da dúzia vendida. Sabe-se, também, que uma quantidade maior de ovos nas misturas, além do alto custo, poderia atrapalhar a coleta das alíquotas devido, principalmente, à viscosidade da mistura.

Outro ponto importante a ser destacado se refere ao período de estocagem. Foram definidos três períodos (0, 15 e 30 dias). Sugerimos que o número de períodos seja aumentado para quatro (0, 10, 20 e 30 dias) para que a forma da curva de oxidação do colesterol ao longo do tempo possa ser avaliada com maior precisão. A Figura A.2 ilustra este planejamento.

Recomendamos que os dados sejam organizados como na Tabela 5.1, pois este é o modelo de entrada dos programas estatísticos mais utilizados. Esse arquivo pode ser construído, por exemplo, em programas como o Microsoft Excel (Catapult, 2000).

Tabela 5.1: Dados

| Realização | Temperatura (°C) | Período (dias) | Processamento | Réplica | Oxidação (µg/g) | Colesterol (mg/100g) |
|------------|------------------|----------------|---------------|---------|-----------------|----------------------|
| 1 | 25 | 0 | cru | 1 | | |
| 1 | 25 | 0 | cru | 2 | | |
| 1 | 25 | 0 | cru | 3 | | |
| 1 | 25 | 0 | cozido | 1 | | |
| 1 | 25 | 0 | cozido | 2 | | |
| 1 | 25 | 0 | cozido | 3 | | |
| 1 | 25 | 0 | frito | 1 | | |
| 1 | 25 | 0 | frito | 2 | | |
| 1 | 25 | 0 | frito | 3 | | |
| ... | ... | ... | ... | ... | | |
| 1 | 25 | 30 | cru | 1 | | |
| 1 | 25 | 30 | cru | 2 | | |
| 1 | 25 | 30 | cru | 3 | | |
| ... | ... | ... | ... | ... | | |
| 1 | 25 | 30 | frito | 1 | | |
| 1 | 25 | 30 | frito | 2 | | |
| 1 | 25 | 30 | frito | 3 | | |
| 1 | 4 a 7 | 0 | cru | 1 | | |
| 1 | 4 a 7 | 0 | cru | 2 | | |
| 1 | 4 a 7 | 0 | cru | 3 | | |
| ... | ... | ... | ... | ... | | |
| 1 | 4 a 7 | 0 | frito | 1 | | |
| 1 | 4 a 7 | 0 | frito | 2 | | |
| 1 | 4 a 7 | 0 | frito | 3 | | |
| ... | ... | ... | ... | ... | | |
| 1 | 4 a 7 | 30 | cru | 1 | | |
| 1 | 4 a 7 | 30 | cru | 2 | | |
| 1 | 4 a 7 | 30 | cru | 3 | | |
| ... | ... | ... | ... | ... | | |
| 1 | 4 a 7 | 30 | frito | 1 | | |
| 1 | 4 a 7 | 30 | frito | 2 | | |
| 1 | 4 a 7 | 30 | frito | 3 | | |
| ... | ... | ... | ... | ... | | |
| 3 | 4 a 7 | 30 | cru | 1 | | |
| 3 | 4 a 7 | 30 | cru | 2 | | |
| 3 | 4 a 7 | 30 | cru | 3 | | |
| ... | ... | ... | ... | ... | | |
| 3 | 4 a 7 | 30 | frito | 1 | | |
| 3 | 4 a 7 | 30 | frito | 2 | | |
| 3 | 4 a 7 | 30 | frito | 3 | | |

A coluna “Realização” da Tabela 5.1 refere-se ao número da realização do experimento, podendo variar de 1 a 3 e a coluna “Réplica”, ao número da triplicata medida, também variando de 1 a 3.

Assumindo que a variância não é afetada pelos tratamentos, o objetivo é comparar níveis médios de colesterol. Para isso, consideraremos uma Análise de Variância com três fatores fixos cruzados em blocos (Neter et al., 1996). Os blocos serão utilizados com o intuito de controlar a interferência de algum fator desconhecido ou desprezado ao se executar o experimento. Caso a análise indique que há efeito do

fator bloco (algo não esperado), deverá ser feita uma investigação a fim de tentar encontrar a razão para isso (por exemplo, ovos providos de diferentes granjas).

Como fatores (e seus níveis) deverão ser considerados:

- Temperatura de estocagem (ambiente e refrigerado);
- Período (0, 10, 20 e 30 dias);
- Processamento (cru, cozido e frito).

Como fator bloco deverão ser consideradas as realizações. Assim, este fator terá três níveis (Realização 1, Realização 2, Realização 3).

As variáveis resposta utilizadas serão: Oxidação ($\mu\text{g/g}$) e Colesterol ($\text{mg}/100\text{g}$).

A Tabela 5.2 apresenta informações sobre a ANOVA resultante da análise proposta.

Tabela 5.2: Tabela de ANOVA com três fatores fixos e cruzados.

| Fonte de Variação | gl | SQ | QM | F |
|-----------------------------------|----|----|----|---|
| Bloco | 2 | | | |
| Temperatura | 1 | | | |
| Período | 3 | | | |
| Processamento | 2 | | | |
| Temperatura*Período | 3 | | | |
| Temperatura*Processamento | 2 | | | |
| Período*Processamento | 6 | | | |
| Temperatura*Período*Processamento | 6 | | | |
| Resíduo | 46 | | | |
| Total | 71 | | | |

Essa sugestão de análise deverá ser aplicada para as duas variáveis resposta.

6. Referências Bibliográficas

Catapult, Inc. (2000). **Microsoft Excel 2000 passo a passo**. São Paulo: Catapult, Inc./Makron. 416 p. + 1 disquete.

IMAI, H., WERTHESSEN, N. T., TAYLOR, C. B. and LEE, K. T. (1976). Angiotoxicity and atherosclerosis due to contaminants of USP - grade cholesterol. **Archives of**

Pathology and Laboratory Medicine, **100**, 565 – 572. Apud: IMAI, H., WERTHESSEN, N. T., SUBRMANYAM, V., LEQUESNE, P. W., SOLOWAY, A. H. and KANISAWA, M. (1980). Angiotoxicity of oxygenated sterols and possible precursors. **Science**, **207**, 651-653.

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

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

Apêndice A

Figura A.1: Esquema de realização do experimento.

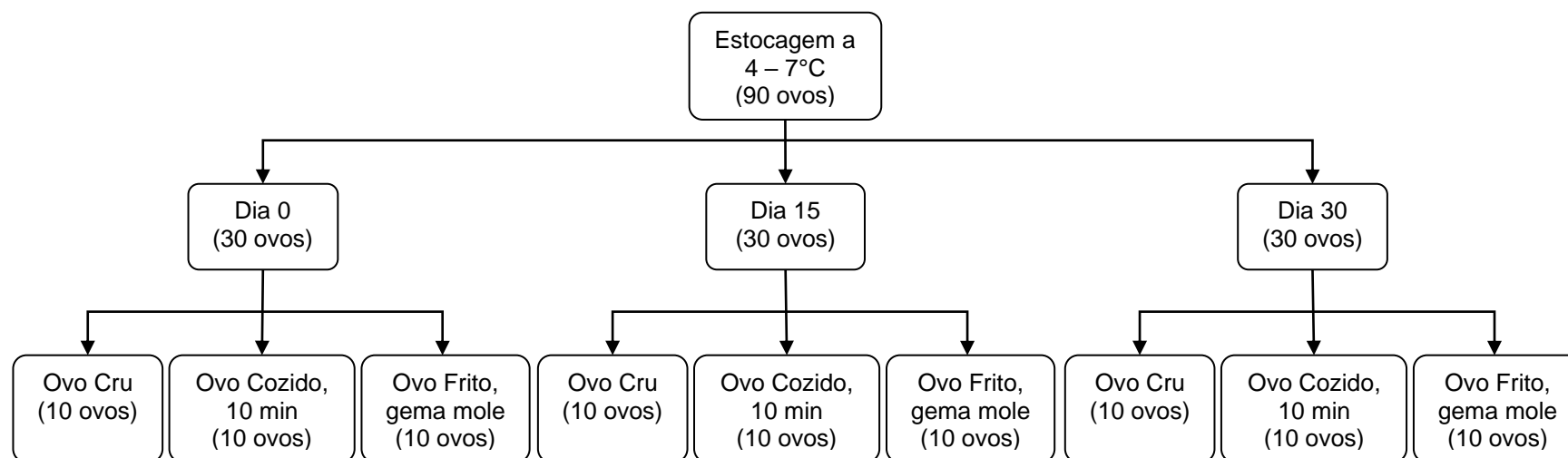
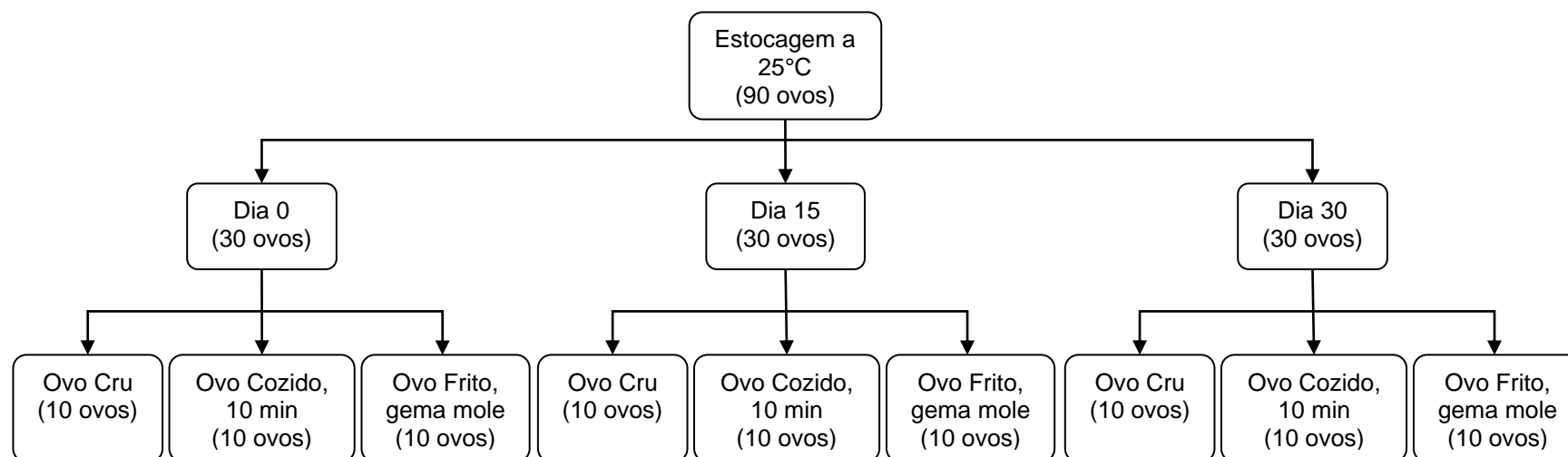


Figura A.2: Esquema de realização do experimento sugerido pelo CEA.

