

TARSO DA COSTA ALVIM

**REDUÇÃO *IN VITRO* DO TEOR DE COLESTEROL DE ÓLEO
DE MANTEIGA UTILIZANDO FARELOS DE TRIGO,
AVEIA E SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A475r
2002

Alvim, Tarso da Costa, 1962-

Redução *in vitro* do teor de colesterol de óleo de man-
teiga utilizando farelos de trigo, aveia e soja / Tarso da
Costa Alvim. – Viçosa : UFV, 2002.

106p. : il.c

Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa

1. Gordura do leite - Colesterol - Redução. 2. Colesterol
- Análise. 3. Química analítica quantitativa. 4. β -glucano.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 664.3

CDD 20.ed. 664.3

TARSO DA COSTA ALVIM

**REDUÇÃO *IN VITRO* DO TEOR DE COLESTEROL DE ÓLEO
DE MANTEIGA UTILIZANDO FARELOS DE TRIGO,
AVEIA E SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de "Doctor Scientiae".

APROVADA: 29 de outubro de 2002.



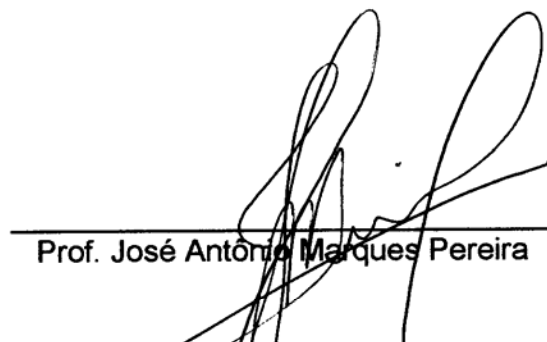
Prof. Marco Túlio Coelho Silva
(Conselheiro)



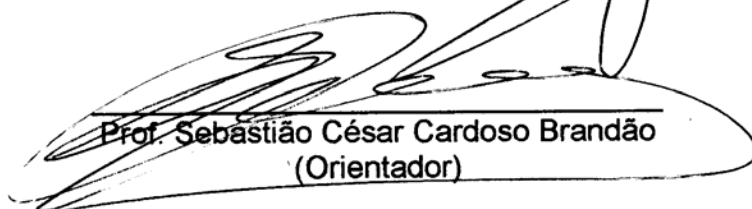
Prof.ª Helena Maria P. Sant'Anna



Prof.ª Elizabeth Maria Talá de Souza



Prof. José Antônio Marques Pereira



Prof. Sebastião César Cardoso Brandão
(Orientador)

*Aos meus pais, Darcy e Cynira, pelo amor incondicional
e pelo exemplo profissional.*

Aos meus irmãos, à Judite e ao Marcos, pelo carinho, apoio e incentivo.

*À minha companheira, Heloisa, por tamanha dedicação e
paciência, sempre em amor.*

Aos nossos queridos filhos, Jonas, Breno e Marcel.

AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus, por me conceder a esperança, a saúde e a perseverança para empreender este trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, à Comissão de Aperfeiçoamento do Ensino superior (CAPES) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

Ao Professor Sebastião César Cardoso Brandão, pela orientação, pela amizade, pela confiança transmitida e pelo estímulo.

Aos Professores Conselheiros, Nélio José de Andrade e Marco Túlio Coelho Silva, pelo apoio e sugestões.

Aos membros da banca examinadora.

Aos colegas Sérgio Eduardo e Vivian, pelo auxílio na execução dos experimentos.

Aos amigos e colegas de curso, pela colaboração, pela amizade e pela convivência.

Aos meus sogros, Geraldo e Dulce, que, de diferentes maneiras, tanto me ajudaram.

Enfim, a todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

TARSO DA COSTA ALVIM, filho de Darcy Alvim Pereira e de Cynira Amaral Costa Alvim, nasceu em 9 de fevereiro de 1962, em Pirajuí-SP.

Em dezembro de 1988, graduou-se em Zootecnia e em junho de 1991 concluiu o Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ambos pela Universidade Federal de Viçosa.

Em abril de 1999, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, e em 29 de outubro de 2002 submeteu-se aos exames finais de defesa de tese.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Metabolismo do colesterol.....	4
2.1.1. Biossíntese do colesterol	5
2.1.2. Mecanismo regulador da síntese do colesterol	6
2.1.3. Usos, transporte e aproveitamento do colesterol	8
2.1.4. Síntese e utilização de ácidos biliares.....	8
2.1.4.1. Significado clínico da biossíntese de ácidos biliares	9
2.1.5. Lipoproteínas de transporte	9
2.1.5.1. Lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs).....	9
2.1.5.2. Lipoproteínas de densidade intermediária (IDLs).....	10
2.1.5.3. Lipoproteínas de baixa densidade (LDLs).....	10
2.1.5.4. Lipoproteínas de alta densidade (HDLs)	12

	Página
2.1.5.5. Quilomícrons	12
2.1.6. Manifestações clínicas do metabolismo de lipoproteínas.....	14
2.1.7. Intervenção farmacológica	16
2.1.7.1. Outras drogas capazes de reduzir colesterol plasmático .	17
2.1.7.2. Substâncias funcionais encontradas em alimentos e capazes de controlar o colesterol sanguíneo	18
2.2. Os esteróis	20
2.2.1. Esteróis livres	20
2.2.2. Esterol ésteres	22
2.2.3. Esteril glicosídeos	23
2.2.4. Esteril glicosídeos acilados	23
2.2.5. Colesterol sulfato.....	24
2.3. O colesterol e as gorduras saturadas em alimentos	24
2.3.1. FDA (<i>Food and Drug Administration</i>) e o colesterol	25
2.4. As fibras dietéticas e o colesterol – mecanismos de interação	26
2.4.1. Fibra dietética – caracterização	26
2.4.2. Fontes de fibra dietética	27
2.4.3. O colesterol e as fibras dietéticas	28
2.4.5. Mecanismos de redução do colesterol sanguíneo	28
2.4.6. O β -glucano	30
2.4.6.1. Estrutura molecular	33
2.4.6.2. Funcionalidade	33
2.4.7. Os heteroxilanos	34
2.5. Métodos para análise quantitativa de colesterol	35
2.5.1. Métodos espectrofotométricos	35
2.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	36
2.5.2.1. CLAE por adsorção em sílica gel	37
2.5.2.2. CLAE por partição em fase reversa (CLAE-FR).....	37
2.5.3. Cromatografia gasosa (CG)	39
2.5.4. Métodos enzimáticos.....	40
2.5.5. Outros métodos.....	41
2.6. Tecnologias para redução do colesterol em alimentos	41
2.6.1. Limitação à produção de alimentos “sem colesterol”	42

	Página
2.6.2. Métodos biológicos.....	42
2.6.3. Métodos químicos	44
2.6.3.1. Reações de complexação	44
2.6.3.2. Extrações com solventes	46
2.6.4. Métodos físicos	48
2.6.4.1. Extrações utilizando CO ₂ supercrítico	49
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1. Preparação do óleo de manteiga	51
3.2. Aparato experimental e fluxograma do processo	51
3.3. Preparo dos farelos	52
3.4. Extração de colesterol do óleo de manteiga	52
3.4.1. Técnica de separação	52
3.5. Delineamento experimental.....	54
3.6. Análise quantitativa de colesterol do óleo de manteiga	54
3.6.1. Obtenção das amostras	54
3.6.2. Saponificação das amostras e extração dos insaponificáveis	57
3.6.3. Análise de colesterol e de fitosteróis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	57
3.6.4. Análise do teor de colesterol por espectrofotometria	58
3.6.5. Análise de colesterol e de fitosteróis por cromatografia de fase gasosa (GC)	58
3.6.5.1. Determinação do índice de recuperação do colesterol	59
3.6.5.2. Determinação do índice de recuperação dos fitosteróis...	59
3.7. Determinação do modelo matemático da redução do colesterol .	60
3.8. Determinação da concentração de β -glucano nos farelos de aveia, trigo e soja.....	60
3.9. Análises estatísticas.....	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. Análise quantitativa do colesterol em óleo de manteiga	62
4.1.1. Análise do óleo de manteiga por espectrofotometria UV-VIS	62
4.1.2. Análise do óleo de manteiga por CLAE.....	63
4.1.3. Análise do colesterol e de fitosteróis por cromatografia de fase gasosa (GC)	65
4.1.4. Seleção da técnica analítica para quantificação do colesterol em óleo de manteiga.....	68

	Página
4.2. Teores de β -glucano nos farelos de aveia, trigo e soja	69
4.3. Curvas de redução do colesterol.....	70
4.3.1. Efeito da temperatura	70
4.3.2. Efeito do teor de água	75
4.3.3. Efeito da granulometria	78
4.4. Influência das variáveis na quantidade máxima de redução de colesterol	82
5. RESUMO E CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE QUADROS

	Página
1 Principais desordens hiperlipoproteinêmicas	15
2 Principais desordens hipolipoproteinêmicas.....	16
3 Concentração de colesterol em diferentes alimentos	25
4 Métodos para remoção do colesterol de gorduras	43
5 Esquema do delineamento experimental empregado	55
6 Quantidade de colesterol e de fitosteróis no óleo de manteiga e índices de recuperação determinados na fração insaponificável.....	68
7 Teores médios de β -glucano nos farelos de aveia, trigo e soja.	69
8 Equações resultantes do modelo de regressão. Relação entre a porcentagem de colesterol reduzido (Z) e as variáveis temperatura (X) e porcentagem de água (Y).....	83
9 Máximos efeitos da temperatura e do percentual de água na redução de colesterol do óleo de manteiga, utilizando-se farelos de aveia, trigo e soja.....	89

LISTA DE FIGURAS

	Página
1	Fórmula estrutural do colesterol..... 4
2	Esquema metabólico de captação da LDL plasmática e seu catabolismo, conforme visto por BROWN e GOLDSTEIN (1976)..... 11
3	Composições químicas e dimensões proporcionais das diferentes classes de lipoproteínas do soro sanguíneo humano 13
4	Estratégias para inibição da biossíntese de colesterol pelo uso de inibidores competitivos da HMG-CoA redutase 17
5	Fórmula estrutural dos principais fitosteróis 22
6	O β -Glucano. Consiste numa cadeia polissacarídica, não-ramificada, linear, contendo unidades de β -(1-3) e β -(1-4)-D-glicopirranose 31
7	Esquema do aparato utilizado para processo em batelada..... 52
8	Fluxograma do processo utilizado para remoção do colesterol do óleo de manteiga 53
9	Fluxograma da metodologia utilizada para análise do colesterol 53

	Página
10 Cromatograma, obtido por CLAE-FR, da amostra de óleo de manteiga, após saponificação. Coluna Hypersil ODS-C18 (HP); fase móvel acetonitrila e isopropanol (80:20 em volume); vazão de 1,0 mL/min e detecção a 210 nm com atenuação 0,5.....	63
11 Cromatogramas (RP-HPLC) da curva-padrão de colesterol. Coluna Hypersil ODS (HP); fase móvel acetonitrila:isopropanol (80:20); vazão de 1,0 mL/min e detecção a 210 nm com atenuação 0,5 (a) 0,03 mg/mL; (b) 0,14 mg/mL; (c) 0,28 mg/mL; e (d) 0,5 mg/mL	64
12 Cromatograma (RP-HPLC) da fração insaponificável do óleo de manteiga adicionado dos fitosteróis campesterol (2), stigmasterol (3) e β -sitosterol (4); colesterol (1). Coluna Hypersil ODS (HP); fase móvel acetonitrila:isopropanol (80:20); vazão de 1,0 mL/min e detecção a 210 nm com atenuação 0,5.....	65
13 Cromatograma (CG) da fração insaponificável do óleo de manteiga. Cromatógrafo HP 5890, coluna CP-TAP CB (CHROMPACK), detector de ionização de chama; hidrogênio como gás de arraste a 15 lb.pol ⁻² . A temperatura da coluna foi programada para 280 °C. O injetor e o detector foram mantidos a 360 °C e 370 °C, respectivamente	66
14 Cromatograma (CG) da fração insaponificável do óleo de manteiga adicionado dos fitosteróis campesterol (2), stigmasterol (3) e β -sitosterol (4); colesterol (1). Cromatógrafo HP 5890, coluna CP-TAP CB (CHROMPACK), detector de ionização de chama; hidrogênio como gás de arraste a 15 lb.pol ⁻² . A temperatura da coluna foi programada para 280 °C. O injetor e o detector foram mantidos a 360 °C e 370 °C, respectivamente	67
15 Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de trigo, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura	71
16 Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de trigo, granulometria G2, em função do teor de água e da temperatura	71
17 Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de soja, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura	72

	Página
18	Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de aveia, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura 74
19	Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de aveia, granulometria G2, em função do teor de água e da temperatura 74
20	Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de trigo, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura 76
21	Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de trigo, granulometria G2, em função do teor de água e da temperatura 76
22	Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de aveia, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura 77
23	Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de aveia, granulometria G2, em função do teor de água e da temperatura 77
24	Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de soja, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura 78
25	Influência da granulometria do farelo de trigo na porcentagem de redução de colesterol do óleo de manteiga, em tratamentos contendo entre 8% e 50% de água e com temperaturas entre 35 °C e 75 °C. Médias e desvios-padrão de três repetições 79
26	Influência da granulometria do farelo de aveia na porcentagem de redução de colesterol do óleo de manteiga, em tratamentos contendo entre 8% e 50% de água e com temperaturas entre 35 °C e 90 °C. Médias e desvios-padrão de três repetições 80
27	Efeitos da temperatura e da porcentagem de água na redução de colesterol do óleo de manteiga tratado com 20% (p/v) de farelo de aveia (granulometria G1); equação 4 84
28	Efeitos da temperatura e da porcentagem de água na redução de colesterol do óleo de manteiga tratado com 20% (p/v) de farelo de aveia (granulometria G2); equação 5 85

	Página
29	Efeitos da temperatura e da porcentagem de água na redução de colesterol do óleo de manteiga tratado com 20% (p/v) de farelo de trigo (granulometria G1); equação 6..... 86
30	Efeitos da temperatura e da porcentagem de água na redução de colesterol do óleo de manteiga tratado com 20% (p/v) de farelo de trigo (granulometria G2); equação 7..... 87
31	Efeitos da temperatura e da porcentagem de água na redução de colesterol do óleo de manteiga tratado com 20% (p/v) de farelo de soja (granulometria G1); equação 8 88

RESUMO

ALVIM, Tarso da Costa, D.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2002. **Redução *in vitro* do teor de colesterol de óleo de manteiga utilizando farelos de trigo, aveia e soja.** Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão. Conselheiros: Nélio José de Andrade e Marco Túlio Coelho Silva.

No Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa foram realizados experimentos para avaliação *in vitro* do processo de redução do colesterol de óleo de manteiga pela reação deste com farelos de aveia, trigo e soja, em função das concentrações e das granulometrias desses farelos, da temperatura e da quantidade de água. Também foram avaliadas as técnicas de Espectrofotometria, de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e de Cromatografia Gasosa, para análise quantitativa de colesterol e de fitosteróis no óleo de manteiga. Concluiu-se que, para esses analitos e neste produto, as técnicas cromatográficas apresentaram sensibilidade, resolução e taxas de recuperação satisfatórias e suficientes. O método espectrofotométrico também pode ser adotado para análise de colesterol, desde que em produtos isentos de outros esteróis, por ser um método simples, de baixo custo e de boa sensibilidade. Usando óleo de manteiga com uma concentração inicial média de 247 mg de colesterol por 100 g de óleo, obtiveram-se reduções entre 12 e 41% no teor inicial de colesterol. Pelo uso do farelo de aveia, foi possível obter-se redução de 41% com a fração de menor granulometria e de 38,5% com a

maior granulometria. Utilizando-se o farelo de trigo, foi possível obter-se redução de 37% com a fração de menor granulometria e de 36% com a maior granulometria. Nos experimentos em que se empregou o farelo de soja, verificou-se efeito redutor na concentração inicial de colesterol de, no máximo, em torno de 12%. Foram verificados efeitos significativos ($p < 0,05$) da elevação da temperatura, e do aumento na porcentagem de água adicionada, com relação ao percentual de redução de colesterol. Com os resultados obtidos nesse trabalho, pode-se considerar que existe potencial favorável à utilização de farelos de cereais para redução de colesterol em alimentos.

ABSTRACT

ALVIM, Tarso da Costa, D. S., Universidade Federal de Viçosa, October 2002.
***In vitro* cholesterol reduction of butter oil by using wheat bran, oat bran and soy bran.** Adviser: Sebastião César Cardoso Brandão. Committee members: Nélio José de Andrade and Marco Túlio Coelho Silva.

The *in vitro* cholesterol reduction of butter oil was evaluated on the Food Science and Technology Department of The Universidade Federal de Viçosa by their reaction with wheat bran, oat bran and soy bran, and in functions of concentration, particle size, temperature and water amount. They were also appraised colorimetric determination, the High Performance Liquid Chromatography and the Gas Chromatography methods for quantitative analysis of cholesterol and of phytosterols in the butter oil. The chromatographic techniques presented good sensibility, resolution and recovery yields, for those analytes and in this product. Equally, the colorimetric method can be adopted for cholesterol analysis, in products free of other sterols, being a simple method, of low cost and of good sensibility. Using butter oil with a medium initial concentration of 247 mg of cholesterol for 100 g of oil, they were obtained between 12 and 41% of cholesterol reduction. For oat bran, it was obtained reduction of 41% by the use of smaller particle size fraction, and of 38.5% by the largest particle size fraction. Using wheat bran, the cholesterol reduction was of 37% by the use of smaller particle size fraction and of 36% by the largest

particle size fraction. In the soy bran experiments the observed reducer effect was, at the most, around 12%. Significant effects were verified ($p < 0,05$) of the elevation of the temperature, and of the increase in the percentage of added water, regarding the percentile of cholesterol reduction. With the results obtained in that work, it can be considered that favorable potential exists to the use of cereals brans for cholesterol reduction in foods.

1. INTRODUÇÃO

O colesterol, desde que foi isolado de cálculos biliares em 1784, é a substância que mais demandou atenção das diversas áreas da ciência e, em particular, da medicina. Cresce a cada dia a preocupação do consumidor com a quantidade de colesterol ingerido via alimentação. Nos últimos anos, os americanos mudaram drasticamente seus hábitos alimentares em função do colesterol; na década de 90, 60% de uma população entrevistada eliminaram manteiga de sua dieta implicando em redução de, aproximadamente, 1,5 kg *per capita* por ano nas vendas. Nessa década, as estatísticas indicaram 70% para o consumo de margarina e 30% para o consumo de manteiga (SCHRODER e BAER, 1991). A redução no consumo de manteiga esteve associada à adoção de novos hábitos alimentares, caracterizados pela busca por alimentos com teores reduzidos ou isentos de colesterol (AHA, 1996).

A concentração de colesterol sanguíneo que pode ser considerada benéfica à saúde humana não deve ultrapassar 200 mg/dL de sangue. Boa parte da população mundial apresenta elevada concentração de colesterol no sangue, caracterizando um quadro de hiperlipoproteinemia, condição na qual as concentrações plasmáticas de lipoproteínas transportadoras de colesterol ou triglicérides excedem o limite normal. Disso podem decorrer complicações tais como: o desenvolvimento acelerado de aterosclerose, enfarto e trombose (Van HORN, 1997).

No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por milhares de óbitos anuais, incidindo como elevados custos para a Previdência Social, resultantes de licenças e aposentadorias. Essas doenças também causaram diversos óbitos na faixa etária de 15 anos a 44 anos, atingindo pessoas jovens e produtivas (BRASIL, 1994).

Medidas dietéticas isoladas são, freqüentemente, insuficientes, tornando necessário sua associação com o uso de drogas hipolipidêmicas. Entretanto, deste uso, podem incidir efeitos colaterais indesejáveis além do custo associado ser elevado. São estes fatores que têm motivado a procura por novas estratégias nutricionais e, ou, farmacológicas, para prevenção da aterosclerose.

Como as principais fontes alimentares de colesterol são de origem animal (o ovo, os produtos cárnicos e o leite e seus derivados), tem-se verificado tendência de mudança nos hábitos de consumo, alternando-se de lipídeos de origem animal para aqueles de origem vegetal: manteiga por margarina, carne vermelha por carne branca e carne de pescado, leite integral por leite desnatado ou com baixos teores de gordura. Reconhece-se o desejo de reduzir o conteúdo de colesterol de gorduras animais, inclusive gordura de leite. Se o colesterol fosse extraído, ou reduzido significativamente, nesses alimentos, facilitar-se-ia recomendar a ingestão deste tipo de alimento frente à manutenção das propriedades nutricionais e sensoriais originais. Porém, qualquer método sugerido para tal, deve proporcionar que as propriedades sensoriais do produto resultante não difiram significativamente das propriedades típicas do produto natural. Por exemplo, fatores como a sensação tátil bucal, o ponto de derretimento, ou as cores, podem ser alteradas significativamente em função do tipo de técnica empregada para remoção de colesterol.

Portanto, sob esse contexto, atualmente supõe-se que é desejável a produção de laticínios, ovoderivados e produtos cárnicos substancialmente reduzidos em colesterol. Um processo satisfatório maximizaria esta redução, sem que a funcionalidade de proteínas ou outras propriedades dessas matérias primas fossem afetadas, resultando em um produto com baixo teor de colesterol, indistinguível do produto original. Um processo apropriado deveria ser simples de executar e minimizaria equipamentos e exigências de matéria-

prima. Além disso, o uso de substâncias potencialmente prejudiciais à saúde humana, como por exemplo, solventes polares orgânicos, seria preferivelmente evitado.

1.1. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi a avaliação *in vitro* da redução do teor de colesterol de óleo de manteiga através da interação do mesmo com farelos de aveia, trigo e soja, levando-se em consideração as variáveis temperatura, o teor de água do óleo e a granulometria dos farelos.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Avaliação das técnicas Espectrofotometria UV/VIS, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia de Fase Gasosa para quantificação de colesterol e de fitosteróis em óleo de manteiga.
- Quantificação do teor de β -glucano nos farelos de trigo, aveia e soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Metabolismo do colesterol

O colesterol (Figura 1) é uma molécula biológica extremamente importante, sendo componente da estrutura da membrana celular e precursor na síntese de hormônios esteróis e ácidos biliares (LEHNINGER et al., 1995). Praticamente todos os tecidos animais sintetizam colesterol, incluindo o fígado, o trato intestinal, o córtex adrenal, as paredes arteriais, entre muitos outros. Segundo CABRERA-VIVAS (*in press*), biologicamente, o colesterol exerce importante função na membrana celular ao controlar sua fluidez e sua arquitetura, neste caso compatibilizando as proteínas da membrana e o correto arranjo das cadeias fosfolipídicas.

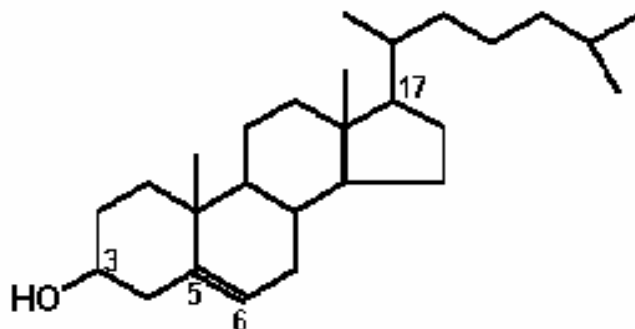


Figura 1 – Fórmula estrutural do colesterol.

Tanto o colesterol dietético, quanto aquele proveniente de síntese *de novo*, são transportados através da circulação sanguínea por partículas lipoprotéicas. O mesmo ocorre com os colesterol ésteres, forma como o colesterol é estocado nas células (HARPER et al., 1982).

Em indivíduos saudáveis, quanto ao metabolismo do colesterol, a síntese e a utilização do colesterol pode ser fortemente regulada no sentido de se prevenir seu acúmulo e deposição anormal no organismo. Clinicamente, é de particular importância a deposição irregular de colesterol, e de lipoproteínas ricas em colesterol, nas artérias coronárias. Este fato, eventualmente, pode conduzir à aterosclerose, uma doença que é o principal fator dentre os que contribuem para a ocorrência de doenças coronarianas (HARPER et al., 1982; LEHNINGER et al., 1995).

2.1.1. Biossíntese do colesterol

Segundo HARPER et al. (1982), pouco menos que a metade do colesterol corpóreo deriva da biossíntese *de novo*. A biossíntese no fígado contribui com aproximadamente 10%, e os intestinos com em torno de 15% do total de colesterol (de 500 mg a 1000 mg) produzido por dia. Esta síntese se dá no citoplasma e nos microsomas a partir do grupo metil da acetilcoenzima A (Ac-CoA).

São cinco as principais etapas deste processo:

- 1 - A Ac-CoA se converte em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA);
- 2 - HMG-CoA é convertida em mevalonato;
- 3 - O Mevalonato é convertido em isopentenil pirofosfato (IPP);
- 4 - IPP se resume a esqualeno; e
- 5 - Esqualeno é convertido em colesterol.

A síntese inicia com o transporte de Ac-CoA da mitocôndria para o citosol. A catálise exercida pela HMG-CoA redutase limita a taxa de ocorrência deste passo. A Ac-CoA é a fonte de todos os átomos de carbono do colesterol, sendo oriunda de uma reação de oxidação (por exemplo, de ácidos graxos ou de piruvato) na mitocôndria, podendo também derivar da oxidação do etanol

pela acetil-CoA sintetase, no citoplasma. Todas essas reações de redução utilizam NADPH como cofator (BANKS et al., 1976; HARPER et al., 1982).

A reação catalisada pela HMG-CoA redutase é um ponto crítico, pois limita a taxa de biossíntese do colesterol, estando esta enzima submetida à complexos controles regulatórios (GOLDSTEIN e BROWN, 1990).

Após 19 reações adicionais, lanosterol é convertido em colesterol, não se conhecendo a ordem exata dessas fases, podendo mais de uma via estar operando simultaneamente (CABRERA-VIVAS et al., in press).

2.1.2. Mecanismo regulador da síntese do colesterol

Segundo RUDNEY e SEXTON (1986), indivíduos adultos, normais e saudáveis, sintetizam colesterol a uma taxa de aproximadamente 1g/dia de colesterol e consomem, aproximadamente, 0,3 g/dia. Um nível relativamente constante de colesterol corpóreo (150 a 200) mg/dL é mantido pelo controle do nível da síntese *de novo*. Parte desta síntese é regulada pela taxa de ingestão diária de colesterol. Tanto o colesterol sintetizado quanto aquele ingerido será utilizado para formação de membranas, síntese de hormônios esteróis e para síntese de ácidos biliares, esta representando a maior demanda.

Ainda, conforme esses autores, o suprimento celular de colesterol é mantido num nível básico mediante três diferentes mecanismos:

1. Regulação do nível e da atividade da HMG-CoA redutase.
2. Regulação do excesso de colesterol livre, intracelular, por meio da atividade da acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT).
3. Regulação do nível de colesterol plasmático via captação mediada por receptor LDL, e por transporte reverso mediado por receptor HDL.

Contudo, segundo GEELLEN et al. (1986), o controle da biossíntese do colesterol primeiramente se dá pelo comando do nível e da atividade da HMG-CoA redutase e que envolve três mecanismos distintos. São eles: controle da expressão gênica, taxa de degradação enzimática e fosforilação-defosforilação (fosforilase e lipase hormônio-sensível). Os dois primeiros são exercidos pelo colesterol propriamente. Este atua reprimindo a síntese de nova HMG-CoA redutase, ou pela indução da síntese de enzimas desdobladoras de redutase pré-existente. Adicionalmente, quando há colesterol em excesso, diminui a

quantidade de mRNA disponível para síntese de HMG-CoA redutase, como resultado de expressão gênica diminuída. Este mecanismo ainda não foi totalmente esclarecido.

O controle da HMG-CoA redutase, por modificação covalente, ocorre como resultado de fosforilação e defosforilação, conforme demonstrado por NORDSTROM (1977). Como a atividade desta enzima é maior na sua forma nativa, a fosforilação pela enzima AMP-dependente proteína-quinase (AMPRK) irá reduzir significativamente sua atividade. A AMPRK, por si, sofre fosforilação mediada pela enzima quinase-quinase. Segundo STERIN-SPEZIALE et al. (1992), esses mecanismos foram descritos como operantes na síntese de colesterol num fígado normal. Entretanto, os controles de retroinibição são perdidos quando as células hepáticas sofrem distúrbios patogênicos malignos.

A administração de hormônios, como glucagônio e epinefrina, ou os glicocorticóides, afetam negativamente a biossíntese de colesterol, ao inibirem a atividade da HMG-CoA redutase, porque incrementam a atividade do inibidor fosfoproteína-fosfatase 1 (PPI-1). Por outro lado, a administração de insulina, e de alguns hormônios tireoidais (removem fosfatos), estimulam a síntese de HMG-CoA redutase, conforme relatado por CHAN-KI et al. (1995).

Experimentos *in vitro*, conduzidos por RUDNEY e SEXTON (1986), demonstraram que a síntese de colesterol era inibida por AMPcíclico (cAMP). A insulina provocou decréscimo no nível de cAMP, que por outro lado, ativou a síntese de colesterol. Alternativamente, glucagônio e epinefrina, que majoram o nível de cAMP, inibiram essa síntese. Portanto, como o nível intracelular de cAMP foi passível de controle por estímulo hormonal, a síntese de colesterol passou a ser hormonalmente controlada. A habilidade da insulina para estimular, e do glucagônio para inibir a atividade da HMG-CoA redutase, é consistente com os efeitos destes hormônios em outras rotas metabólicas. LEHNINGER et al. (1995) citam que a função básica desses dois hormônios é controlar a disponibilidade e o fornecimento de energia a todas as células corpóreas.

O controle em longo prazo da atividade de HMG-CoA redutase é exercido, principalmente, sobre as taxas de síntese e de degradação da enzima. Quando o nível de colesterol é alto, reduz-se o nível de expressão do gene para HMG-CoA redutase. Reciprocamente, níveis reduzidos de colesterol

ativam a expressão do gene. Ao promover a elevação do nível de síntese de HMG-CoA redutase, a insulina também pode provocar controle a longo prazo do metabolismo de colesterol. Segundo LEHNINGER et al. (1995), a taxa de reversão de HMG-CoA também pode ser regulada pelo suprimento de colesterol, pois quando o colesterol for abundante, elevar-se-á a taxa de degradação de HMG-CoA redutase.

2.1.3. Usos, transporte e aproveitamento do colesterol

No plasma sanguíneo, o colesterol é predominantemente transportado como colesterol éster, associado a lipoproteínas. Do intestino delgado ao fígado, o colesterol dietético é transportado incorporado aos quilomícrons e às lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs). O colesterol sintetizado pelo fígado, como também qualquer colesterol dietético que exceder as necessidades hepáticas, será transportado no soro sanguíneo associado às lipoproteínas de baixa densidade (LDLs). O fígado sintetiza VLDLs, sendo estas convertidas a LDLs pela ação de lipases lipoprotéicas endoteliais.

As HDLs podem extrair o colesterol presente em membranas plasmáticas, assim como a enzima HDL-associada (LCAT) pode esterificá-lo. Colesterol captado de tecidos periféricos, por HDLs, podem ser transferidos por VLDLs, e por LDLs, pela ação de proteína transferidora de colesterol ésteres (apo-D), que está associada com HDLs. O transporte reverso permite que colesterol periférico retorne ao fígado em LDLs. O fígado pode então converter colesterol livre em sais biliares. Por fim, o colesterol é excretado na bÍlis como colesterol livre, ou como sais biliares (HARPER et al., 1982).

2.1.4. Síntese e utilização de ácidos biliares

Os produtos finais da utilização de colesterol são os ácidos biliares, cuja síntese ocorre no fígado. A síntese de ácidos biliares é o principal mecanismo para a excreção de colesterol excedente. Porém, essa forma de excreção é, em muitos casos, insuficiente para compensar um excesso de entrada de colesterol dietético. Os ácidos quenodeoxicólico (45%) e cólico (31%), são os mais abundantes na bÍlis humana. Por uma ligação amino, o grupo carboxílico

desses ácidos pode se conjugar a glicina ou à taurina, antes de ser secretado nos canalículos biliares. Estas reações de conjugação rendem ácido glicocólico e ácido taurocólico, respectivamente. Os canalículos biliares se unem aos dutos biliares, formando-se, então, os tubos de bÍlis. Por esses tubos, os ácidos biliares são levados do fÍgado para a vesÍcula biliar, onde são armazenados para uso futuro. O destino dos ácidos biliares é o intestino delgado, onde ajudarão a emulsificar lipÍdios dietéticos. No intestino, dar-se-á a remoção da glicina, dos resÍduos taurinos e a subsequente excreção dos ácidos remanescentes (só uma porcentagem pequena), ou sua reabsorção ao fÍgado. Determina-se este processo como circulação enterohepática (HARPER et al., 1982).

2.1.4.1. Significado clÍnico da biossíntese de ácidos biliares

LEHNINGER et al.(1995) e HARPER et al. (1982) afirmam que os ácidos biliares executam quatro significativas funções fisiológicas:

1. A síntese desses ácidos e sua subsequente excreção nas fezes representam o único mecanismo para eliminação significativa do excesso de colesterol.
2. Ácidos biliares e fosfolipÍdios solubilizam o colesterol na bÍlis, o que previne sua precipitação na vesÍcula.
3. A ação desses ácidos como agentes emulsificantes facilita a digestão de triacilgliceróis dietéticos, tornando as gorduras acessÍveis para as lipases pancreáticas.
4. Facilitam a absorção intestinal de vitaminas lipossolúveis.

2.1.5. LipoproteÍnas de transporte

2.1.5.1. LipoproteÍnas de densidade muito baixa (VLDLs)

No organismo humano, a entrada de gordura e carboidrato pela dieta, em quantidades além das necessidades corpóreas, conduzirá à conversão destes em triacilgliceróis, no fÍgado. Estes triacilgliceróis serão “empacotados” em VLDLs e, posteriormente, liberados na circulação para suprir os vários

tecidos (principalmente muscular e adiposo), sendo então armazenados ou oxidados para produção de energia. Portanto, VLDLs são moléculas responsáveis pelo transporte de triacilgliceróis, endogenamente derivados, aos tecidos extra-hepáticos (HARPER et al., 1982; LEHNINGER et al., 1995).

2.1.5.2. Lipoproteínas de densidade intermediária (IDLs)

HARPER et al. (1982) e LEHNINGER et al. (1995) citam que todas as IDLs que se formarem como triacilgliceróis serão provenientes de moléculas de VLDLs. O destino dessas IDLs será sua conversão a LDLs, ou sua captação direta pelo fígado. A conversão em LDLs acontecerá sempre que mais triacilgliceróis forem removidos. O fígado irá captar mais IDLs, assim que elas interagirem com o receptor de LDL para formação de um complexo a ser “endocitosado” pela célula.

2.1.5.3. Lipoproteínas de baixa densidade (LDLs)

O requerimento celular por colesterol, como componente das membranas, poderá ser satisfeito através de dois modos: por síntese *de novo*, no interior celular, ou por fontes extracelulares, isto é, por quilomícrons e LDLs. Assim, o colesterol dietético será enviado ao fígado pela interação de sobras de quilomícrons com o receptor de sobra (Figura 2). Além disso, colesterol sintetizado pelo fígado poderia ser transportado a tecidos extra-hepáticos, caso estivessem “empacotados” em VLDLs. Na circulação, VLDLs se convertem em LDLs por ação da lipase lipoprotéica. Sob esse contexto, as LDLs serão as principais carreadoras de colesterol do plasma sanguíneo para todos os tecidos (HARPER et al., 1982; LEHNINGER et al., 1995).

Insulina e triiodotironina (T3) aumentam a ligação de LDLs às células hepáticas, enquanto que glicocorticóides (p. e. dexametasona), têm efeito oposto. Ainda é obscuro o preciso mecanismo para estes efeitos, entretanto, sabe-se que este pode ser mediado pelo controle da degradação de apolipoproteína B. Os efeitos resultantes da ligação de insulina e de T3 à LDL hepática, podem explicar a hipercolesterolemia, ao aumentarem a taxa de risco

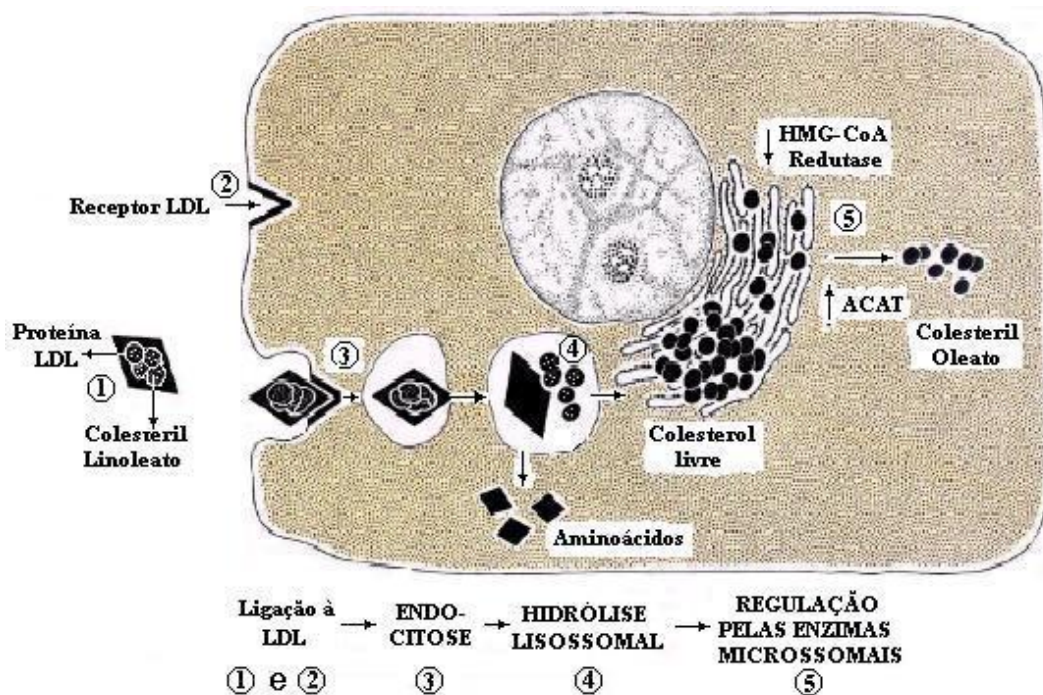


Figura 2 – Esquema metabólico de captação da LDL plasmática e seu catabolismo, conforme visto por BROWN e GOLDSTEIN (1976).

de desenvolvimento da aterosclerose. Mostrou-se que esta doença está intimamente associada com diabetes descontrolada ou hipotireoidismo (STEINER, 2001).

As lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (OxLDL) são tóxicas às células da parede arterial. Segundo GURR (1984), o colesterol é um composto bastante estável, sendo muito pouco provável que ocorra oxidação durante sua estocagem. Contudo, segundo o autor, já se detectaram alguns derivados oxidados do colesterol em preparações comerciais de alimentos. Ainda, quando estes compostos foram purificados e inseridos em dietas para cobaias verificou-se que a velocidade de ocorrência de lesões arteriais foi muito maior, concluindo-se que existe consistente probabilidade de que metabólitos oxigenados de colesterol, formados a nível corpóreo, atuem como agentes tóxicantes. Segundo STEINER (2001), a droga *Simvastatin*, um inibidor da HMG-CoA redutase, poderia aumentar a toxicidade de OxLDL (300 g de proteína/mL) de uma maneira dose-dependente. Segundo PIRILLO et al. (1997), o mevalonato, produto resultante da catálise exercida pela HMG-CoA redutase, poderia recuperar esta elevação citotóxica. Resultados obtidos por este autor sugeriram que, na biogênese do colesterol, um dos pontos críticos

desta via metabólica estaria localizado entre o mevalonato e a formação de esqualeno.

2.1.5.4. Lipoproteínas de alta densidade (HDLs)

A síntese *de novo* das HDLs (partículas esféricas e de natureza protéica) ocorre no fígado e no intestino delgado, principalmente. As HDLs recém formadas são praticamente destituídas de colesterol e dos seus ésteres.

Segundo HARPER et al. (1982) e LEHNINGER et al. (1995), HDLs são convertidas em partículas lipoprotéicas esféricas pela acumulação de colesterol ésteres. Este acúmulo converte HDLs nascentes a HDL₂ e HDL₃. Quaisquer colesterolis livres, presentes em quilomícrons remanescentes e em sobras de VLDL (IDLs), podem ser esterificados pela enzima HDL-associada, aciltransferase de lecitina:colesterol (LCAT). As HDLs, ricas em colesterol, retornam ao fígado onde sofrem endocitose. Os ésteres de colesterol também podem ser transferidos de HDLs, à VLDLs, e à LDLs, pela enzima HDL-associada - proteína transferidora de éster de colesterol (CETP). HOCHGRAFA et al. (2000), relataram que isto tem o efeito adicional de permitir que o excesso de colesterol celular volte ao fígado, pela via LDL-receptor, como também pelo caminho HDL-receptor.

2.1.5.5. Quilomícrons

Os quilomícrons são formados nas células epiteliais do intestino durante a fase intracelular da absorção de gordura. Pertencem a uma classe de partículas lipídicas estabilizadas, e envolvidas no transporte de lipídios, que são denominadas lipoproteínas do plasma (Figura 3). São compostos predominantemente de triacilgliceróis estabilizados por uma camada externa constituída de proteína, apoproteína e fosfolípido. Graças a essa composição os triacilgliceróis podem ser fisicamente “empacotados” em uma forma estável em ambiente aquoso. São eles os principais carreadores de gordura derivada da dieta através do plasma sanguíneo (GURR, 1984; LEHNINGER et al. (1995).

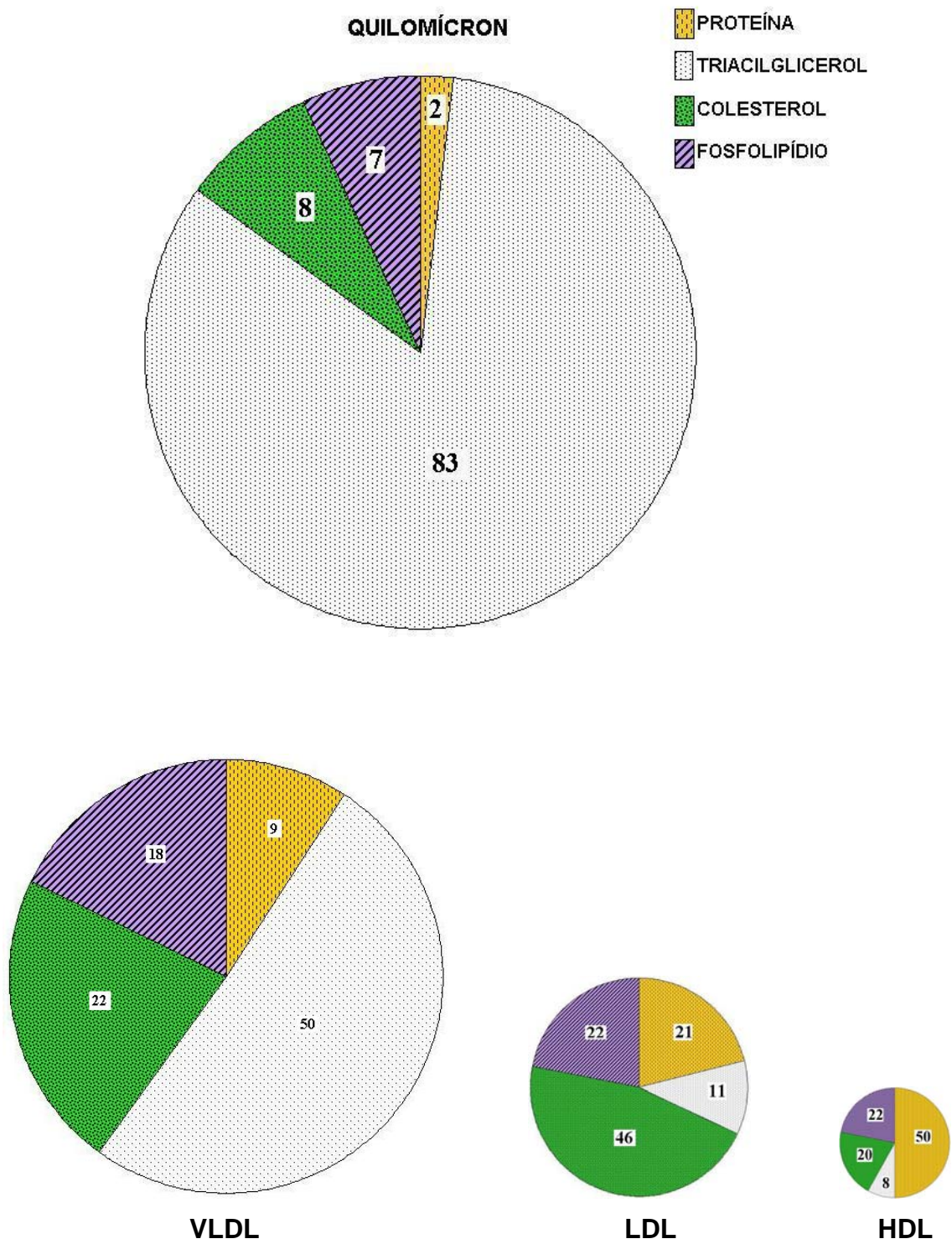


Figura 3 – Composições químicas e dimensões proporcionais das diferentes classes de lipoproteínas do soro sanguíneo humano.

2.1.6. Manifestações clínicas do metabolismo de lipoproteínas

Felizmente, poucos indivíduos herdam os defeitos de metabolismo lipoprotéico, os quais podem conduzir à hiper ou hipolipoproteinemias (Quadros 1 e 2). Frequentemente, pessoas que sofrem de *Diabetes mellitus*, hipotireoidismo e doenças renais, exibirão metabolismo anormal de lipoproteínas, como resultado de efeitos secundários das desordens desses órgãos. Por exemplo, em face da síntese de lipase lipoprotéica (LPL) ser regulada pela insulina, podem acontecer deficiências de LPL, como um resultado secundário de *Diabetes mellitus*, implicando em hiperlipoproteinemia Tipo I. Adicionalmente, insulina e hormônios tireoidais afetam positivamente interações hepáticas de LDL-receptor. Assim, a hipercolesterolemia, e o aumento no risco de aterosclerose associada com diabete descontrolada ou hipotireoidismo, provavelmente se deve à diminuição da captação hepática, bem como do metabolismo de LDL. (HARPER et al., 1982).

Das muitas desordens de metabolismo de lipoproteínas, a hipercolesterolemia hereditária (HH) prevalece na população em geral. Verifica-se heterozigose, no locus de HH, em 1:500 indivíduos, ao mesmo tempo em que se observa homozigose em 1:1.000.000 indivíduos. HH é uma desordem herdada que inclui quatro classes diferentes de mutação no gene LDL-receptor. O defeito classe 1 (o mais comum) resulta em perda completa de síntese do receptor. O defeito classe 2 resulta na síntese de uma proteína receptora, que pelo fato de não ser corretamente processada no aparelho de Golgi, não será transportada à membrana plasmática. O defeito classe 3 resulta em um receptor de LDL que é incapaz de se ligar às LDLs. O defeito classe 4 gera receptores que se ligam às LDLs, mas não se aglomeram em regiões especiais da membrana para serem apropriadamente interiorizados (HARPER et al., 1982; LEHNINGER et al., 1995).

Indivíduos que sofrem de FH, heterozigotos ou homólogos, podem apresentar uma mutação particular no gene receptor. Aqueles homozigotos exibem colesterol sanguíneo grotescamente elevado (principalmente em LDLs). Os níveis elevados de HDLs resultam de fagocitose destas pelos macrófagos. Estas células fagocíticas, carregadas de lipídios, tendem a se depositarem no interior da pele e dos tendões, dessa forma gerando xantomas. Uma

Quadro 1 – Principais desordens hiperlipoproteïnêmicas

Desordem	Causas	Comentários
Tipo I - Deficiência hereditária de LDL; hiperquilomicronemia hereditária	(a) Deficiência de LDL; (b) produção anormal de LDL; (c) deficiência de apoC-II.	Baixa liberação de quilomícrons, níveis reduzidos de LDL e HDL; tratamento por dieta contendo baixa gordura e carboidratos complexos; não há elevação no risco de Doença Crônica Coronariana (CHD).
Tipo - II Hipercolesterolemia hereditária (HH)	Defeitos em 4 classes de receptores de LDL	Indução de hipercolesterolemia por elevação do índice de LDL, resultando em aterosclerose e CHD
Tipo III Disbetalipoproteinemia hereditária, deficiência em apolipoproteína E	A liberação de sobra hepática fica prejudicada por anormalidade de apoE; pacientes só expressam a forma apoE2, que interage fracamente com o receptor de apoE	Causa xantoma, hipercolesterolemia e aterosclerose nas artérias periféricas e coronárias por incrementar os níveis de quilomícrons e VLDLs
Tipo IV Hipertriacilglicerolemia hereditária	Alta produção de VLDL associada com intolerância à glicose e hiperinsulinemia	Freqüentemente associada com <i>Diabetes mellitus</i> do tipo II (independente de insulina), obesidade, alcoolismo ou administração de hormônios progestacionais; elevação do colesterol como resultado de elevados teores de VLDLs
Tipo V (hereditária)	Elevados teores de quilomícrons e VLDLs devido à causas desconhecidas	Hipertriacilglicerolemia e hipercolesterolemia associadas ao decréscimo nos teores de LDLs e HDLs
Hiperalfalipoproteinemia Hereditária	Elevada taxa de HDLs	Uma rara condição que é benéfica para a saúde e longevidade
Tipo I Hiperbetalipoproteinemia Hereditária	Alta produção de LDL e atraso na liberação de triacilgliceróis e ácidos graxos	Forte associação com aumento no risco de CHD
ApoB com ligação defeituosa (hereditária)	Duas mutações diferentes: Gln por Arg (aminoácido 3500) ou Cys por Arg (aminoácido 3531); ambas provocam reduzida afinidade da LDL pelo receptor de LDL	Dramática elevação na taxa de LDL; sem efeito nas taxas de HDL, de VLDL ou nos níveis plasmáticos de triglicerídios; significante causa de hipercolesterolemia e prematura CHD
Deficiência hereditária de LCAT	A ausência de LCAT induz inabilidade das HDLs em captar o colesterol	Diminutos níveis plasmáticos de colesteril ésteres e de lisolecitina; anormalidade nas LDLs (Lp-X) e VLDLs; sintomas também associados à colestase
Doença do sexo feminino (doença do armazenamento de colesteril ésteres)	Um defeito na enzima colesteril éster hidrolase afeta o metabolismo de LDLs	Reduzida liberação de LDL causando hipercolesterolemia, aterosclerose e CHD
Deficiência em lipase hepática liberadora de heparina	A deficiência desta lipase induz ao acúmulo de HDLs ricas em triacilgliceróis e de remanescentes de VLDL.	Causa xantoma e doença coronariana

Quadro 2 – Principais desordens hipolipoproteinêmicas

Desordem	Causas	Comentários
Abetalipoproteinemia (acantocitose, síndrome de Bassen-Kornzweig)	Ausência de quilomícrons, de VLDLs ou de LDLs devido a defeito na expressão de apoB	Defeito raro; acúmulo de colesterol no intestino ou no fígado; má absorção de gordura; retinite pigmentosa, doença atáxica neuropática, eritrócitos com aparência espinhosa
Hipobetalipoproteinemia hereditária	Identificadas pelo menos 20 diferentes mutações genéticas da apoB. Em torno de 20% das concentrações de LDL apresentam-se fora do normal, teores de VLDL ligeiramente baixo, HDL normal.	Alterações amenas ou não patológicas
Deficiência hereditária de alfa-lipoproteína (doença Tangier), Doença “olho de peixe” (deficiências em apoA-I e C-III)	Para estas síndromes, verificam-se reduzidas concentrações de HDL, e nenhum efeito sobre a produção de quilomícron ou VLDL.	Tendência para hipertriacilglicerolemia; alguma elevação nos teores de VLDLs; doença “olho de peixe” caracterizada por severa opacidade da córnea.

complicação maior, a aterosclerose, principal fator de quase todas as doenças cardiovasculares, resulta do depósito de colesterol dentro das artérias (HARPER et al., 1982; LEHNINGER et al., 1995).

2.1.7. Intervenção farmacológica

Como alternativa para diminuição dos teores de lipoproteínas e (ou) de colesterol circulante no plasma sanguíneo, tem-se indicado o tratamento com drogas, principalmente quando se visa reduzir o risco de incidência de aterosclerose e, subseqüentemente, de doença coronariana (CHD), comuns em pacientes com elevados teores de lipídios na circulação sanguínea. Normalmente, considera-se esta terapia como opção somente quando intervenções não-farmacológicas (alteração na dieta e prática de exercícios físicos) não são suficientes para promover reduções nos teores de lipídios plasmáticos. De maneira a se reduzir a formação de esqualeno e, subseqüentemente, diminuir os níveis plasmáticos de colesterol, pesquisa-se

intensamente sobre inibidores da esqualeno sintetase (LEWIS et al., 1995, TANSEY e SCHECHTER, 2000). Em uma outra linha de pesquisa, investigam-se drogas capazes de inibir a HMG-CoA redutase, conforme esquema descrito por TRZASKOSA (1995), na Figura 4.

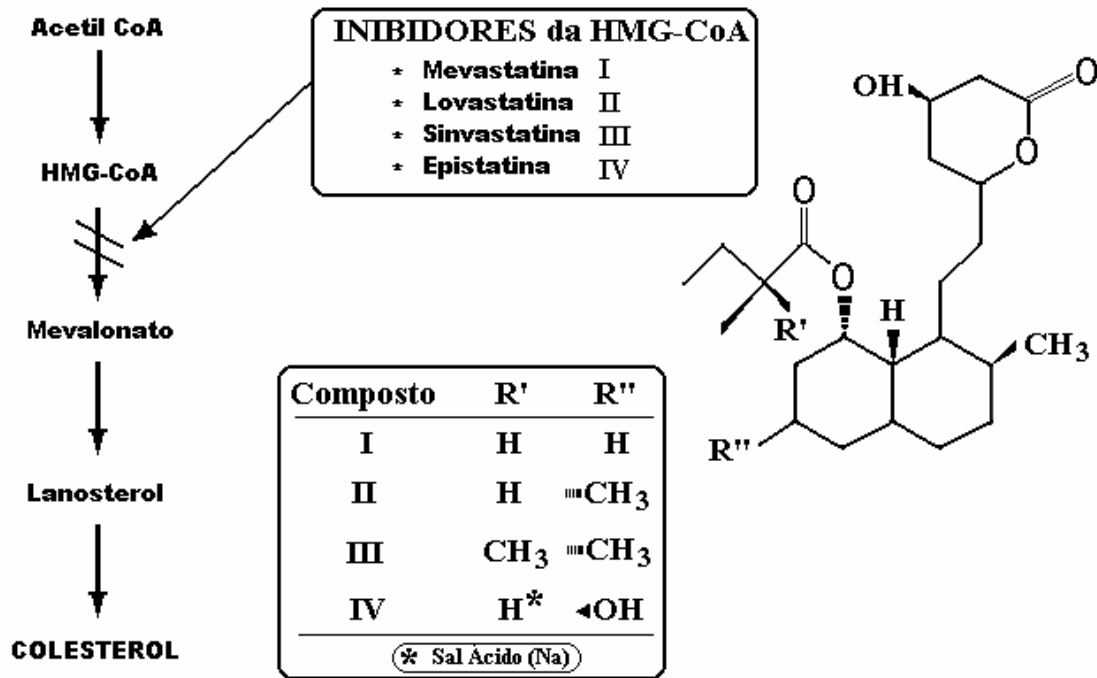


Figura 4 – Estratégias para inibição da biossíntese de colesterol pelo uso de inibidores competitivos da HMG-CoA redutase.

2.1.7.1. Outras drogas capazes de reduzir colesterol plasmático

a) Tratamento com mevinolin, mevastatin e lovastatin: Estas drogas, de origem fúngica, são inibidoras da HMG-CoA redutase (STEINER et al., 2001). Segundo o autor, o resultado líquido deste tratamento será um aumento na captação celular das LDLs, dado que a síntese de colesterol será inibida e as células, portanto, passarão a ser dependentes de fontes extracelulares de colesterol. Entretanto, visto que o mevalonato (produto da reação catalisada pela HMG-CoA) é um composto requerido para a síntese de outros importantes produtos intermediários (isoprenóides), além do colesterol, os tratamentos em longo prazo podem suscitar riscos de intoxicação.

b) Ácido nicotínico: Esta substância reduz os níveis plasmáticos de VLDLs e de LDLs pela inibição da secreção hepática de VLDL, bem como por inibição da lipólise nos tecidos adiposos, suprimindo, assim, o fluxo de liberação de ácidos graxos livres. Por ser hábil em reduzir drasticamente os níveis de colesterol circulante, utiliza-se o ácido nicotínico para tratamento das hiperlipoproteinemias dos tipos II, III, IV e V.

c) Clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato: Estes compostos, que são derivados do ácido fíbrico, provocam rápida degradação das VLDLs pela ativação das lipases lipoprotéicas. No fígado, eles desviam o sentido das reações de esterificação em direção às de oxidação dos ácidos graxos livres, dessa maneira reduzindo a secreção hepática de triacilgliceróis e de VLDLs ricas em colesterol.

d) Probucol: o probucol eleva a taxa de metabolismo de LDL, podendo ainda bloquear os transportes intestinais de colesterol, promovendo significativa redução dos níveis de colesterol sanguíneo.

e) Cholestiramina ou colestipol (resinas): são compostos resinados, não absorventes, que se ligam aos ácidos biliares que ainda não foram absorvidos pelo fígado. O decréscimo na taxa de reabsorção desses ácidos resulta num mecanismo de retroinibição da síntese de ácidos biliares. Conseqüentemente, grande quantidade de colesterol se converte nesses ácidos, de maneira a manter um nível básico em circulação. Adicionalmente, há elevação na síntese de receptores de LDL para aumentar o suprimento de colesterol destinado à síntese de ácidos biliares. KAHN e WOODRUFF (2002) reportam que o efeito global disso consiste na redução do colesterol plasmático. Este tratamento é ineficaz para pacientes hipercolesterilêmicos homozigotos, com histórico familiar, visto que estes são deficientes em receptores LDL (HARPER et al., 1982).

2.1.7.2. Substâncias funcionais encontradas em alimentos e capazes de controlar o colesterol sanguíneo

Estudos epidemiológicos conduzidos por SOLEAS et al. (1997), WOLLNY et al. (1999) e FRÉMONT (2000), sugeriram que consumo moderado de vinho tinto pode proteger contra o desenvolvimento de doenças

cardiovasculares. Segundo esses autores o resveratrol (trans-3,4',5-trihydroxystilbene) é um composto polifenólico, de ocorrência natural em várias fontes alimentícias como, por exemplo, vinho tinto e suco de uva concentrado, tendo demonstrado possuir diversos efeitos benéficos para saúde cardiovascular. Dentre esses efeitos, citam-se: prevenção de dano oxidativo, promoção de vasodilatação, e prevenção de agregação de plaquetas. LADEN e PORTER (2001) informam que o resveratrol inibe especificamente a esqualeno monoxigenase humana purificada, uma enzima que limita a taxa de biossíntese, tanto de esqualeno quanto de FAD, de uma maneira não-competitiva. Estes dados exaltam o efeito protetor do resveratrol com relação ao desenvolvimento de doença cardiovascular. Em parte, isto pode ser explicado pela inibição da biossíntese endógena de colesterol.

Ainda, segundo KULK SIS (2001), a inibição da biossíntese de colesterol está associada à presença de esteróis precursores (fitosteróis, tocotrienóis e outros) no plasma sanguíneo. POLAK e KRITCHEVSKI (1998), citados por MAKI et al. (2001) revelam que estes esteróis ocorrem naturalmente, tendo estrutura química semelhante à do colesterol e que seus teores nas dietas ocidentais se aproximam daqueles do colesterol (170 a 358) mg/dia. Demonstrou-se também que os fitosteróis (stigmasterol, beta-sitosterol, campesterol e outros), e seus ésteres, têm sido efetivos na redução do colesterol sanguíneo ao inibirem a absorção deste ao nível de intestino delgado (JONES et al., 1999; SIERKSMA et al., 1999; WESTSTRATE et al., 1999). WEBER et al. (2002) citam que, recentemente, WESTER (2000) adicionou esteril e estanol ésteres a margarinas especiais, sendo que estes produtos mostram-se funcionalmente hábeis em reduzir os níveis plasmáticos de colesterol total e de LDL. Propõe-se que o mecanismo físico-químico pelo qual há redução no nível de colesterol circulante envolve competição entre fitosteróis e o colesterol, pela solubilização na fase biliar no interior do intestino delgado (GILLING et al., 1996).

KASTELEIN et al. (2000) concluíram que o consumo de 1,8 g/dia de fitosteróis não esterificados (β -sitosterol) provenientes de óleo de pinus (PHYTROLTM), na forma de chocolate, reduzia significativamente ($p < 0,03$) o LDL colesterol. Em outro experimento, quando o Phytrol foi hidrogenado (conversão do β -sitosterol para sitostanol), MOGHADASIAN et al. (2000)

verificaram haver diminuição do efeito dos fitosteróis sobre a redução do colesterol plasmático, em modelo animal.

Segundo MAKI et al. (2001), os benefícios gerados pela ingestão dietética de fitosteróis ocorrem não somente em indivíduos portadores de doença coronariana ou possuidores de severos níveis de colesterol circulante, mas também em pessoas saudáveis, com discretas a moderadas elevações destes níveis.

KAHLON et al. (1992), ao estudarem o β -glucano, substância presente na maioria dos farelos de cereais, e suas propriedades de redução do colesterol sanguíneo (ANDERSON, 1984; MARLETT, 1994), verificaram que, mesmo quando as dietas testadas continham diminutas quantidades destes farelos, ainda assim se observava redução colesterilêmica. Esse efeito também foi atribuído à presença de constituintes lipossolúveis nos farelos, e em baixas concentrações, que consistiam em fitosteróis, álcoois triterpênicos, ésteres do ácido ferúlico e vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis), entre outros compostos não identificados.

QURESHI et al. (1997) verificaram que o efeito supressivo exercido pelos tocotrienóis sobre a HMG-CoA redutase, resultou em significativa redução nos níveis de colesterol sanguíneo. Observaram que elevados teores sanguíneos de LDL-colesterol, a intensidade de sua oxidação e o desenvolvimento crônico de trombose aguda são fatores vistos como críticos na progressão da aterosclerose, e na ocorrência de infarto do miocárdio. Resultados experimentais obtidos por esses autores mostraram que quando tocotrienóis foram inseridos numa dieta, houve redução da disponibilidade de substrato para formação de LDL, inibição da oxidação do LDL colesterol e diminuição na formação de “trombos” obstruidores de artéria, que são três importantes contribuições destes compostos em benefício da saúde humana.

2.2. Os esteróis

2.2.1. Esteróis livres

Esteróis constituem um grupo de lipídios insaponificáveis, encontrados em quantidade apreciável em todos os tecidos animais e vegetais (FENNEMA, 1996).

Nos tecidos de vertebrados, o principal esteroide é o álcool C_{27} – colesterol – particularmente abundante nas glândulas adrenais (10% p/p), nos tecidos nervosos (fração em peso 2%), no fígado (fração em peso 0,2%) e nos sais biliares. Sua estrutura carbônica fundamental é o anel ciclopentanoperihidrofenantreno (também denominado esterano). Foi o primeiro esteroide isolado, por volta de 1770, pelo químico Poylletier de La Salle, nos sais biliares. Em 1815, Chevreul isolou colesterol a partir da fração insaponificável de gordura animal, denominando-o *cholesterine* (do grego, *khole*-bile e *stereos*-sólido). A fórmula correta ($C_{27}H_{46}O$) foi proposta em 1888 por F. Reinitzer, mas estudos visando elucidar estruturas, principalmente por WIELAND (1927), e por WINDAUS (1928), esclareceram a exata representação estérica do colesterol. VANCE e Van den BOSCH (2000) citam que em 1936, Callow e Young designaram como esteróides todos os compostos quimicamente relacionados ao colesterol. Nos tecidos animais se encontra outro esteroide – Lanosterol (C_{30}) – constituindo a maior fração insaponificável da gordura da lã (lanolina), sendo também uma molécula intermediária na biossíntese do colesterol (CYBERLIPID CENTER, 2002).

Em plantas superiores, os primeiros esteróides foram isolados por Hesse, em 1878, de feijão Calabar (*Phytostigma venenosum*), e nomeados com o termo *phytosterine*. Posteriormente, em 1906, essa substância foi nomeada stigmasterol, por Windaus e Hault. A denominação *phytosterol* (fitosterol) foi proposta por H. Thoms, em 1897, para todos os esteróides de origem vegetal. Quimicamente, esses esteróides possuem a estrutura básica do colesterol, entretanto, emergem diferenças a partir da cadeia lateral do carbono 17. Os principais fitosteróides contêm 29 ou 30 átomos de carbono. São representantes desses esteróides o campesterol, o stigmasterol (em óleo de soja) e o beta-sitosterol, os quais estão presentes em todos os lipídios vegetais, sendo usados para síntese esteroide (Figura 5). Um importante esteroide presente em leveduras e fungos é o ergosterol (mycosterol), composto C_{28} . Sob irradiação, esse esteroide origina a vitamina D_2 , ou calciferol (PIIRONEN et al., 2001).

Os fitosteróides exercem um amplo espectro de atividades biológicas em animais e humanos, sendo considerados eficientes agentes redutores de colesterol. Adicionalmente, produzem diversos efeitos terapêuticos incluindo propriedades anticâncer (LING e JONES, 1995)

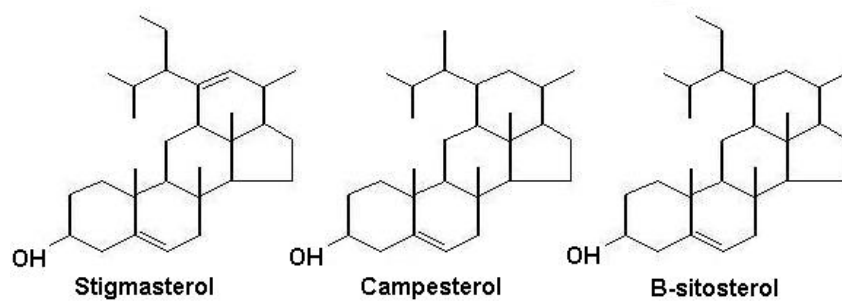


Figura 5 – Fórmula estrutural dos principais fitosteróis.

Conquanto o colesterol tenha sido considerado praticamente ausente em organismos vegetais, atualmente sua presença em plantas superiores é amplamente aceita. Ele pode ser detectado nos óleos vegetais em diminutas proporções (até 5% dos esteróis totais), mas a frequência predominante é em quantidades traço (CYBERLIPID CENTER, 2002). Contudo, segundo FUKUBA e TAKEUCHI (1989), vários estudos têm revelado a existência de colesterol como o principal esterol presente em cloroplastos e pólen. Além disso, o colesterol tem sido um dos principais esteróis detectados nos lipídios presentes em folhas de plantas superiores, onde ele pode constituir até 72% do total de esteróis.

Apesar dos esteróis originarem de diferentes fontes, não se usa mais a distinção entre zoosteróis, mycoesteróis e fitosteróis, embora prático. Usa-se freqüentemente o título *fitosterol* (CYBERLIPID CENTER, 2002).

Avenasterol pode ser isolado na fração insaponificável de óleo de aveia. Demonstrou-se que, em óleos utilizados para fritura, esse esterol confere proteção contra oxidação, devido ao grupo *ethylidene* presente na sua cadeia lateral (WHITE et al., 1986).

2.2.2. Esterol ésteres

Se os esteróis incidirem no estado livre, nas membranas celulares, em íntima associação com as moléculas de fosfolipídios, eles freqüentemente esterificarão nos ácidos graxos. O colesterol de tecidos animais, especialmente do fígado, das adrenais e das lipoproteínas (HDL e LDL), pode ser esterificado por vários ácidos graxos, mais freqüentemente por ácidos graxos essenciais, formando ésteres de colesterol (LEHNINGER et al., 1995).

A ligação química entre o esteroil e o ácido graxo pode ser hidrolisada ou transesterificada muito mais lentamente que a maioria dos lipídios ortoacilados. Nas plantas, diversos esteróis-ésteres podem ser encontrados em membranas celulares e óleos de sementes, como ésteres de ergosteril, de stigmasteril e de beta-sitosteril. A presença dessas formas esterificadas justifica uma prévia saponificação, caso se faça necessário estimar o conteúdo total de esteroil (CYBERLIPID CENTER, 2002).

2.2.3. Esteril glicosídeos

Os esteril glicosídeos são complexos encontrados em vegetais. Essa família caracteriza-se pela presença de uma unidade de carboidrato ligada ao grupo hidroxila de uma molécula de esteroil. Determinou-se que a fração esteroil compreende vários esteróis: campesterol, stigmasterol, sitosterol, brassicasterol e dihidrositosterol. Por outro lado, em *Graminae*, a porção carboidrato é composta de: glicose, xilose e até mesmo arabinose (JONES e SARJAZ, 2001).

Em bactérias, encontrou-se que *Helicobacter* é particularmente rico em colesterol glicosídeos (mais de 33% dos lipídios totais), sugerindo que essas moléculas podem ser importantes marcadores quimiotaxonômicos dessas espécies (HAQUE et al., 1995). A presença de colesterol diglicosídeo também foi reportada em procariotos (*Acholeplasma axanthum*) por KOBAYASHI et al. (1995). Isolou-se, de fígado humano, colesterol glicuronídeo numa razão de aproximadamente 33 nmol, por grama de tecido fresco. Presume-se que o colesterol glicuronídeo seja sintetizado no fígado. Parte dele, algo em torno de 6 mg/mL, acessará a corrente sanguínea por difusão, e o restante, provavelmente será eliminado na bile (ACCATINO et al., 1998).

2.2.4. Esteril glicosídeos acilados

São compostos que se formam quando um ácido graxo é acilado no grupamento álcool primário da unidade carboidrato da molécula de esteril glicosídeo. O *6'-palmitoil-β-D-glicosídeo* do β-sitosterol é a principal espécie (51%), podendo ser detectada em tubérculos de batata, enquanto o *6'-linoleil-β-*

D-glucosídeo, do β -sitosterol, predomina (47%) em extratos de soja (STAPLETON, 1991). Nesses produtos também foram encontrados ácidos graxos 16:1, 18:1 e 18:3. Em plantas aquáticas (*Pistia stratiotes*), DELLA-GRECA. et al. (1991) relataram a existência de moléculas mais complexas, onde o β -sitosterol encontrava-se acilado ao açúcar.

Em recente ensaio com 48 fontes de vegetais, verificou-se a presença de esteril glicosídeos acilados em todas as partes dos vegetais (frutos, raízes, caules, folhas e sementes), em concentração na faixa de 1 mg a 125 mg por 100 g de peso fresco, sendo que a forma acilada era de 2 a 10 vezes mais abundante que o esterol glicosídeo não-acilado (SUGAWARA e MIYAZAWA, 1999).

2.2.5. Colesterol sulfato

O sulfato éster de colesterol ocorre em células mamárias. O sulfato-3-O-colesterol também pode ser detectado em hemácias e, principalmente, em camadas queratinizadas da pele (WATARAI et al., 1990).

2.3. O colesterol e as gorduras saturadas em alimentos

Diversos alimentos contêm colesterol, mas em diferentes concentrações (Quadro 3). Normalmente, o colesterol ocorre em maior concentração em alimentos de origem animal, principalmente em membranas lipoprotéicas e em gorduras. As maiores concentrações ocorrem no cérebro, na medula óssea, nos rins e no fígado.

O interesse pelo metabolismo de gorduras e óleos desenvolveu-se nos anos 50, quando se verificaram as primeiras descobertas quanto às elevações das taxas de colesterol serem influenciadas pelo aporte de gordura saturada na dieta. Determinou-se que as gorduras saturadas seriam capazes de aumentar em até duas vezes o colesterol plasmático, em relação à ingestão de ácidos graxos poliinsaturados. A gordura saturada e o ácido graxo saturado não são totalmente danosos. A ingestão de uma quantidade segura de gordura saturada pode ser benéfica, pois eleva o HDL, substância que remove o excesso de triglicerídios do sangue (HAYES, 1996).

Quadro 3 – Concentração de colesterol em diferentes alimentos

Alimento	Tipo	% de Gordura	Concentração de Colesterol (mg/100g)
Leite humano		4,0	25
Leite de vaca		3,8	12,3
Leite desnatado		0,1	3
Queijos:	Brie	27,9	100
	Camembert	22,3	62
	Cheddar	32,3	100
	Roquefort	29,8	88
	Frescal	31,5	103
	Gouda	29,2	114
	Parmesão	25,8	68
	Quark	5,1	17
Ovo:	Integral	14,4	396
	Gema (líquida)	31,9	1.260
Manteiga		83,2	192
Banha		99,7	86
Carne de vaca	Músculo	1,9	60
Carne de Porco	Músculo	1,9	65
	Fígado	5,7	340

Fonte: SIEBER (1993).

De um modo geral, as doenças cardíacas coronarianas despertaram atenção para as gorduras, entretanto, as pessoas simplesmente associaram a ingestão de gorduras saturadas com o aumento da taxa de colesterol sangüíneo, entendendo-se que as gorduras poliinsaturadas reduzem-no. Isto não constitui uma verdade absoluta, pois o ácido graxo “trans”, obtido pela hidrogenação de óleos vegetais, induz à formação de colesterol endógeno, elevando sua concentração sangüínea (HAYES, 1996). Segundo O’DONNEL (1993), os ácidos graxos “trans” não são metabolizados como as gorduras monoinsaturadas, e sim como as saturadas, simultaneamente reduzindo o HDL e aumentando o LDL.

2.3.1. FDA (*Food and Drug Administration*) e o colesterol

O FDA, órgão responsável pelo controle e inspeção de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos, propôs e estabeleceu valores para a diferenciação de alimentos “sem colesterol”, alimentos com “baixo teor de colesterol” e alimentos com “médio teor de colesterol” (FDA, 1986; 1990).

Baseado nesta publicação, o alimento é considerado “sem colesterol” quando apresenta índices inferiores a 2 mg de colesterol, por porção; o alimento com “baixo teor de colesterol” deve conter entre 2 mg e 20 mg por porção; e o produto “médio teor de colesterol” deve compreender entre 20 mg e 25 mg por porção. Acima de 25 mg por porção, o produto é considerado “alto teor de colesterol”.

2.4. As fibras dietéticas e o colesterol – mecanismos de interação

2.4.1. Fibra dietética – caracterização

CHESSON (1995) definiu fibra como “os componentes endógenos de materiais de planta, na dieta, que são resistentes à digestão por enzimas produzidas por humanos”, assumindo-se simplesmente como fibra dietética, incluindo celulose, hemiceluloses, pectina, e lignina, provenientes das paredes celulares de plantas, mais alguns outros polissacarídeos indigeríveis de plantas, estes citados por LSRO (1987). Este também foi o conceito original proposto por TROWELL et al. (1976) e SOUTHGATE et al. (1978). Segundo CLAYE et al. (1996), muito da dificuldade ao se definir tipos específicos de fibra, relaciona-se às diferenças entre as metodologias analíticas empregadas para sua quantificação.

Na década de 80, reconheceu-se que a fibra poderia ser caracterizada por sua solubilidade nos intestinos (STEPHEN, 1994). A medição da fibra bruta utiliza uma extração exaustiva, não prevendo uma estimativa precisa do conteúdo real de fibra dietética em alimentos. Tabelas nutricionais desenvolvidas antes de 1980 contêm somente valores de fibra bruta (DREHER, 1987). Nos Estados Unidos, o método desenvolvido por PROSKY et al. (1985), foi aceito pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), e tem sido amplamente utilizado, proporcionando uma estimativa segura para o conteúdo de fibra total em alimentos. Esse método suscita diferenças desprezíveis em relação ao conteúdo de fibra total, mas é relativamente coerente na estimação dela, e também mais preciso que aqueles tradicionais.

Existem evidências nutricionais suficientes para se demonstrar que os valores expressos em fibra total, sozinhos, são insuficientes na predição das atuais propriedades fisiológicas das fibras dietéticas (HALL, 1989; CLAYE et al., 1996).

Um das características físicas dos polissacarídeos é a habilidade em expandir, reter água e formar uma matriz gélida. Denominou-se fibra solúvel aquela com alta capacidade de retenção de água, como pectina e gomas. A definição das características das fibras pela classificação solúvel e insolúvel induziu o desenvolvimento de métodos capazes de medir cada uma destas frações, acuradamente, porque se presumiu a possibilidade de haver distinção na forma das respostas biológicas (FENNEMA, 1996).

Métodos melhorados para determinação do conteúdo de fibra solúvel resultaram em aumento da precisão relativa, entretanto evidenciou-se que a resposta fisiológica para fontes de fibra não era necessariamente previsível somente em base de solubilidade. Outros fatores, como fermentabilidade, viscosidade, e habilidade de ligação com a bÍlis ácida, também contribuem com a qualidade da resposta fisiológica às fontes de fibra. Adicionalmente, considerando que todos os alimentos analisados contenham uma mistura de polissacarídeos, cada polissacarídeo somente pode ser classificado como fonte de fibra solúvel ou insolúvel, isoladamente (CLAYE et al., 1996; JENKINS et al., 1998; ABDUL-HAMID, 2000).

2.4.2. Fontes de fibra dietética

Por causa destas limitações em metodologia de avaliação química, a quantificação da composição de fibra dietética dos estoques de alimentos, foi historicamente difícil e limitado à fibra crua. Dentro da década passada os bancos de dados de composição de alimentos mostraram avanços tecnológicos, refletidos ao se listarem valores específicos para fibra total, fibra dietética solúvel, e insolúvel (CLAYE, 1996; JENKINS et al., 1998).

Cevada contém fibras, mas principalmente fibra insolúvel. Trigo, centeio, arroz, e a maioria dos outros grãos são compostos principalmente de fibras insolúveis (ENGLYST, 1982). Os farelos contêm maior proporção de fibras solúveis que os grãos que os originaram (KAHLON et al., 1993). Legumes, feijões, e ervilhas também são excelentes fontes de fibra solúvel e insolúvel,

com quase 7 g de fibra total e 2 g de fibra solúvel, por cada 75 g de produto. Certas frutas e legumes são melhores fontes de fibra solúvel. Normalmente, deve-se consumir maior quantidade destes alimentos, para igualar a contribuição de fibra insolúvel proveniente de feijões ou grãos de cereal (VAN HORN, 1997).

2.4.3. O colesterol e as fibras dietéticas

Atualmente, há forte evidência que fatores dietéticos influenciam o risco de doença coronariana (DC), tanto favorável quanto desfavoravelmente (ANDERSON et al., 1994; SANDERS, 1998; FERNANDEZ, 2001; McCANN et al., 2001; CHARALAMPOPOULOS et al., 2002). Os três principais fatores de risco dietéticos aterogênicos são: gordura saturada, colesterol e obesidade. Recomenda-se aumentar a quantidade de carboidratos da dieta, principalmente carboidratos complexos, com o objetivo de restituição da maioria das calorias suprimidas pela restrição imposta na ingestão de gordura (AHA, 1996). Em média, adotando-se fontes de carboidratos ricos em fibra, os níveis de colesterol no sangue podem ser reduzidos em 5 a 15%, além de outros benefícios nutricionais. Alguns pacientes hiperlipidêmicos experimentam até maiores reduções. Estudos inconsistentes sobre fibras e lipídeos geraram, recentemente, conclusões divergentes em relação aos benefícios potenciais das fibras vegetais (VAN HORN, 1997).

2.4.5. Mecanismos de redução do colesterol sanguíneo

Permanecem pouco esclarecidos os mecanismos específicos envolvidos na redução de colesterol do plasma sanguíneo devido ao incremento na entrada de fibra na dieta. Segundo CHESSON (1995), são dois os mecanismos propostos para redução do colesterol pelo efeito da ingestão de fibras solúveis; um relacionado com a excreção de sais biliares e outro com a redução da absorção destes. Segundo o autor, embora esses efeitos sejam mutuamente exclusivos, é possível que ambos ocorram no trato digestivo superior.

WOOD e BEER (1998) defendem que o principal efeito resultante do aumento da viscosidade intestinal, inerente ao β -glucano de aveia, aparentemente, relaciona-se com a elevação na taxa de excreção de ácidos biliares e a subsequente alteração na taxa do metabolismo de síntese e excreção endógena de colesterol. Um efeito adicional pode consistir no retardamento no processo de solubilização de lipídeo micelar e a consequente redução na taxa de secreção de quilomícrons na circulação sanguínea.

Recentes pesquisas provêm evidências que polissacarídeos viscosos agem na região gastrintestinal, reduzindo o colesterol do sangue, pelo decréscimo na absorção de colesterol e ácidos graxos, e por absorção decrescente de colesterol biliar (MARLETT et al., 1994; NICOLOSI et al., 1999). Fibras também podem causar alteração na concentração hormonal ou de ácidos graxos de cadeia curta, que afetam o metabolismo de lipídeos (van HORN, 1997). Em modelo animal foi mostrado que o β -glucano, a principal fibra solúvel em água, presente em aveias e cevada, seria o agente ativo causador de alterações no metabolismo do colesterol (SHINNICK et al., 1991; KAHLON et al., 1998). EDWARDS et al. (1988), citam um outro efeito do aumento da viscosidade na digestão e absorção de nutrientes: há prejuízo da emulsificação de lipídios, fator essencial à sua absorção, evidentemente em parte pelo decréscimo dos movimentos mecânicos de contração dos intestinos.

Entretanto, ao se considerarem as implicações práticas do consumo de fibras como parte de dietas terapêuticas, é importante considerar que esses múltiplos efeitos gastrintestinais descritos acima, associados aos efeitos benéficos no colesterol sanguíneo e nos níveis de glicose e insulina, são dose-dependentes. Enquanto o limite mínimo a ser ingerido para redução do colesterol sanguíneo se situa em torno de 3 g/dia de β -glucano, similar à dose necessária para proporcionar bom funcionamento das funções gastrintestinais, para que se alcance efeito satisfatório no controle do metabolismo da glicose seria necessário que se ingerisse uma dose de 4-6 g/dia de β -glucano (MÄLKKI e VIRTANEM, 2001). Considerando que a concentração média desse produto em farelos de cereais varia entre (35 e 50) g/kg, a quantidade de farelo a ser ingerida diariamente tornaria essas dietas impraticáveis.

Por outro lado, RIECKHOFF et al. (1999) conduziram experimentos para comparar os efeitos colesterilêmicos de várias fontes de fibras dietéticas (farelos de cevada, de aveia e de centeio), em hamsters, utilizando uma dieta moderadamente enriquecida com colesterol. Os resultados encontrados, semelhantemente àqueles verificados por LIA et al. (1997) e RIECKHOFF et al. (1999) mostraram que, além do farelo de centeio ser o mais eficiente em reduzir o colesterol plasmático, o mecanismo envolvido neste processo esteve associado à elevação na taxa de excreção de colesterol e de ácidos biliares. Observaram também que doses crescentes de β -glucano, fornecidas na dieta, não induziram resposta dose-dependente, sugerindo que outros fatores como a solubilidade da fibra e a viscosidade também desempenham importante papel na habilidade em reduzir colesterol.

2.4.6. O β -glucano

Segundo BLACKWOOD et al.(2000) as principais fontes de β -glucanos são os farelos de cereais (*Gramineae*) como o trigo, aveia, arroz e cevada.

Na Figura 6 está representada a unidade estrutural do β -glucano.

A Cevada (*Hordeum vulgare*), contém concentrações relativamente elevadas de ligações mistas β -D-glucanos (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4). Embora se verifique a ocorrência do β -Glucano em todos os cereais, as maiores concentrações deste composto são verificadas em farelos de aveia e de cevada, variando de menos de 2% até mais de 16% (BURGER et al., 1982; BELL et al., 1990). Dentre os cereais, a aveia e a cevada têm sido reportadas como sendo as mais efetivas em reduzir o colesterol total plasmático e o LDL-colesterol, em humanos e em animais (McINTOSH, 1991).

A habilidade em reduzir o colesterol foi primeiramente descrita para a aveia e, somente mais recentemente, para a cevada (WOOD et al., 1991; GALLAHER, 1993). Tem-se hipotetizado que, após sua ingestão, o β -Glucano incrementaria a viscosidade do muco intestinal, devido ao seu baixo peso molecular, favorecendo a formação de soluções pastosas. Conseqüentemente, ocorreria redução na taxa de absorção de ácidos biliares, de colesterol ou de triglicerídios, reduzindo o nível plasmático destes (WANG et al., 1992; WANG,

β -Glucano (Unidade Estrutural)

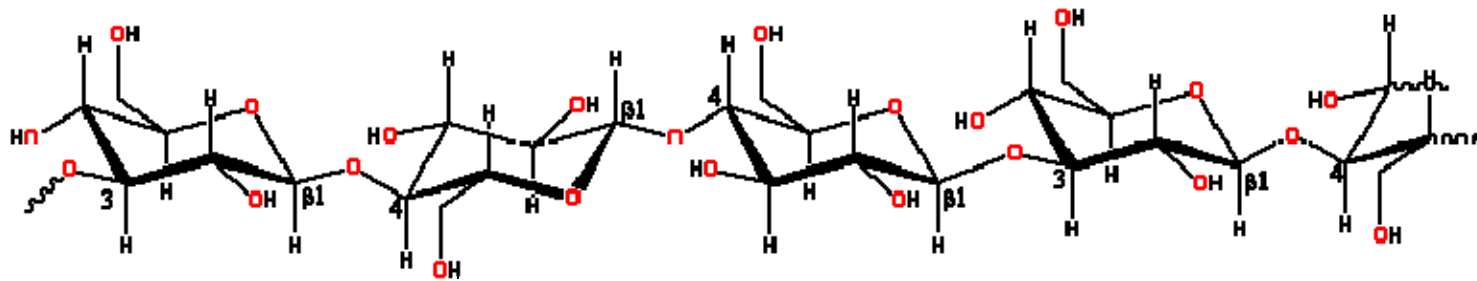


Figura 6 – O β -Glucano. Consiste numa cadeia polissacarídica, não-ramificada, linear, contendo unidades de β -(1-3) e β -(1-4)-D-glicopirranose.

et al., 1997), assim como alterando a atividade das enzimas digestivas (WANG, 1997).

CHEUNG (1996), ao suplementar dieta de ratos com 2% de colesterol e 1% de β -Glucano isolado de cultura de cogumelos (*Volvariella volvacea*), verificou substancial redução dos níveis de colesterol total e de LDL-colesterol no sangue e de colesterol total no fígado. O nível fecal de esteróis neutros foi substancialmente aumentado, enquanto não se evidenciou alteração no nível de excreção fecal de ácidos biliares, contrastando com os resultados obtidos anteriormente por LIA et al. (1995). Não houve mudanças significativas nas concentrações sanguíneas de triacilgliceróis, de HDL-colesterol e de lipídios totais no fígado. Assim, o autor concluiu que este β -Glucano demonstrava significativa atividade hipocolesterilêmica em ratos submetidos à dieta hipercolesterilêmica.

Ao analisarem esses dados, KALRA e JOOD (2000) investigaram os efeitos de concentrações altas, médias e baixas de β -glucano (total e solúvel) extraído de cevada, em dietas de cobaias, e verificaram que esse composto pareceu ser um efetivo redutor de colesterol do sangue e do fígado destes animais. Aparentemente, a propriedade de sublimar a viscosidade do bolo intestinal, que o β -glucano solúvel possui, pode resultar na redução da absorção e (ou) reabsorção de lipídeos.

LIA et al. (1997), estudando os mecanismos envolvidos no efeito redutor do colesterol sanguíneo, nas respostas de lipídio pós-prandial, nas concentrações de latosterol do sangue e na pequena excreção intestinal de gordura e esteróis, resultantes da ingestão de fibra de aveia, mediram a intensidade desses efeitos em indivíduos ileostomizados e submetidos a refeições-teste contendo elevados ou baixos teores de fibra de aveia. Verificou-se elevação na excreção de gordura e ácidos biliares, em 146% e 93%, respectivamente ($P < 0,05$), e diminuição na reabsorção de colesterol total e endógeno, em 14% e 19%, respectivamente ($P < 0,05$), depois da refeição contendo farelo de aveia.

Num estudo realizado com 11 homens saudáveis, onde se investigou a resposta da insulina, da glicose, da colecistoquinina e de lipídeos, BOURDON (1999) testou dois tipos de farelos com diferentes teores de fibra (15,7 e 5) g,

ambos contendo β -glucano. 4 horas após a ingestão destas dietas, a concentração de colesterol plasmático não foi alterada naqueles indivíduos alimentados com baixo teor de fibra, entretanto, quando a dieta foi rica em fibra, verificou-se rápida e significativa diminuição na concentração plasmática de colesterol, quando comparada àquela observada na dieta com baixo teor de fibra. O consumo de β -glucano, na forma de farelos, segundo o autor, aparentemente estimularia o transporte reverso de colesterol.

Assim, as evidências científicas acumuladas até o presente, em modelos *in vivo*, justificam o uso do β -glucano como substância capaz de reduzir o colesterol sanguíneo (CHEUNG, 1996; VAN HORN, 1997; CHAO et al., 1998; WOOD e BEER, 1998; BELL et al., 1999; NICOLOSI et al., 1999; KALRA e JOOD, 2000; MÄLKII e VIRTANEN, 2001). Em modelos *in vitro* foram testados procedimentos que exploraram a capacidade de alguns farelos de cereais em reduzir ácidos biliares, tendo sido encontrados resultados motivadores (BOWLES et al., 1996; KAHLON e CHOW, 2000; KAHLON e WOODRUFF, 2001; 2002).

2.4.6.1. Estrutura molecular

Os β -glucanos formam moléculas cilíndricas que contêm até aproximadamente 250.000 resíduos de glicose, podendo gerar ligação cruzada entre cadeias que contenham unidades sucessivas de celotriose. Formam redes infinitas de géis termorreversíveis. Em torno de 90% das ligações β -(1 \rightarrow 4) ocorrem em unidades de celotriosil e de celotetraosil, estas unidas por ligações simples β -(1 \rightarrow 3). A relação de celotriosil/celotetraosil é de aproximadamente 2,0 a 2,4 em aveias, aproximadamente 3,0 em cevada e aproximadamente 3,5 em trigo (WOOD e BEER, 1998; ROUBROEKS et al., 2000; WANG et al., 2001).

2.4.6.2. Funcionalidade

Funcionalmente, o principal uso de β -glucanos é no sentido de garantir texturização como substituto de gordura. São reconhecidos como fontes de importantes e positivos benefícios à saúde, prevenindo a doença coronariana, abaixando o colesterol sanguíneo e reduzindo a resposta de glicemia crônica,

embora alguns destes efeitos sejam devido à supressão de apetite. β -glucanos de massa molar elevada são viscosos devido a lábeis associações cooperativas, enquanto β -glucanos de baixo peso molecular podem formar géis macios, tornando as cadeias mais facilmente rearranjáveis, com isso maximizando acoplamentos. β -glucano de cevada forma gel altamente viscoso e pseudoplástico, propriedades que decrescem com temperatura crescente. Esse gel hidrocoloidal tem somente unidades de β -(1 \rightarrow 3)-D-glicopirranose, as quais formam estruturas tripla-hélice, termorreversíveis sob aquecimento, que entretanto, ligam-se irreversivelmente quando são aumentados a concentração e a temperatura, concomitantemente (WOOD e BEER, 1998; BÖHN e KULICKE, 1999; BLACKWOOD et al., 2000; ABDUL-HAMID e LUAN, 2000).

2.4.7. Os heteroxilanos

Os heteroxilanos constituem uma outra família de polissacarídeos, baseada em ligações lineares β -(1 \rightarrow 4) entre cadeias de D-xilopirranose, de vasta ocorrência em farelos de cereais e de composição amplamente variável. Compõem a maior parte dos polissacarídeos da parede celular de gramíneas e cereais. Quando hidrolisados originam os açúcares xilose e arabinose, daí a razão de serem comumente denominados pentosanos (CHESSON, 1995).

Os arabinoxilanos do grão de trigo têm recebido particular atenção de nutricionistas, cientistas de alimentos e de químicos (FINCHER e STONE, 1986; HOFFMANN et al., 1992). Por estarem presentes no farelo de trigo, embora em pequena concentração (1 a 5% em peso), possuem a propriedade funcional de formarem soluções de alta viscosidade e hábeis em reter até 10 vezes o seu peso em água, sendo que essa capacidade de formar géis apresenta efeitos positivos sobre a saúde do sistema gastrointestinal de humanos (CHESSON 1995, MÄLKKI e VIRTANEM, 2001 e CHARALAMPOPOULOS, 2002).

2.5. Métodos para análise quantitativa de colesterol

Atualmente, fatores como redução de custos e alta qualidade de resposta, tornaram-se pré-requisitos à maioria das análises laboratoriais. Da mesma forma, e indubitavelmente, a automação dos procedimentos analíticos se tornou imprescindível ao desenvolvimento de novas metodologias de rotina.

Em geral, os procedimentos analíticos recomendados para determinação do colesterol são tediosos e de custo elevado. Ao se objetivar o desenvolvimento de métodos quantitativos para determinação do colesterol, que sejam baratos, rápidos e confiáveis, há que se coletar grande volume de dados de colesterol em diferentes fontes alimentícias.

A literatura faz referência a diversos métodos para se quantificar o colesterol e os seus óxidos em alimentos. No entanto, os principais são: **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência** (VALENTE, 2000; MANZI et al., 1996; CASIRAGHI et al., 1994; PARK e ADDIS, 1985; HURST, 1984); **Cromatografia Gasosa** (BALLESTEROS et al., 1996; ROSE-SALLIN, 1995; NIELSEN et al., 1995; REGUEIRO et al., 1994; STEWART et al., 1992; HUBER et al., 1995) e **Espectrometria VIS** (ME-FAE, 1988; FERNANDEZ-ROMERO et al., 1987; PEINADO e TORIBIO, 1986; BACKMAN et al., 1976).

2.5.1. Métodos espectrofotométricos

Com a intenção de verificar a variabilidade e a reproducibilidade dos resultados de diferentes métodos colorimétricos para determinação de colesterol, PARK (1999) modificou alguns procedimentos dos métodos **SB** (SEARCY e BERGQUIST, 1960) e **RM** (RUDEL e MORRIS, 1973). Segundo o autor, o método colorimétrico **RM** (orto-fitalaldeído) é o mais consistente, revelando-se em torno de 20% menos variável que o método **SB** (FeSO₄-ácido acético), para a determinação de colesterol em queijos de leite de cabra.

O método oficial adotado pela FAE (ME-FAE, 1988), para análise de colesterol em ovos, também enfatiza o princípio colorimétrico. Consiste de uma adaptação do ensaio desenvolvido por KIM e GOLDBERG (1969), sendo estimulada a reação de Liebermann-Burchard, com conseqüente produção do ácido bis-3,5-colestadienil-mono-sulfônico, de coloração verde. Dessa forma,

possibilita-se leitura espectrométrica da absorvância a 625 nm, que será proporcional à concentração de colesterol na amostra.

2.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Nas três últimas décadas, a cromatografia se desenvolveu rápida e significativamente, sendo hoje uma técnica freqüentemente usada para separação, análise qualitativa e análise quantitativa de compostos bioquímicos (HADDEN e BAUMAN, 1972; COLLINS, 1997).

Diversos métodos utilizam equipamentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE para a determinação de colesterol em alimentos. A CLAE utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados, sendo hábil em efetuar separações, quantificar diversos compostos, em vários tipos de amostras, em curto tempo, com resolução, eficiência e sensibilidade elevadas. O desenvolvimento da informática melhorou a eficiência dos equipamentos, a qualidade da apresentação dos dados e os processos de automatização das análises (WATERS, 1998).

Compostos que diferem em tipo químico ou em número de grupos funcionais são facilmente separados por cromatografia líquido-sólido, incluindo ácidos graxos, álcoois, alcalóides, aminas, antioxidantes, barbitúricos, corantes, esteróides, fenóis, lipídios, vitaminas, entre outros (HADDEN e BAUMAN, 1972; COLLINS, 1997).

A análise de colesterol por CLAE apresenta a vantagem de demandar pouco tempo (em alguns casos a separação cromatográfica ocorre em cerca de seis minutos), podendo-se destacar ainda a alta precisão (o desvio-padrão para a reprodutibilidade pode ser inferior a 2%), segundo CASIRAGHI et al. (1994).

A pré ou pós-derivatização pode ser um aspecto importante na análise de uma amostra. O procedimento de reduzir ou alterar a composição de uma molécula “pai”, para uma molécula “filha”, quimicamente relacionada, em geral extrai dados potencialmente tangíveis, que poderiam complementar resultados futuros ou análises anteriores. Em poucos casos, o passo de derivatização serve apenas para gerar dados questionáveis, e esta é uma razão por que a CLAE pode se tornar uma técnica vantajosa em relação à cromatografia

gasosa (GC). A GC requer analitos voláteis, termicamente estáveis, ou analitos apolares, e a derivatização normalmente é requerida por amostras que não apresentem estas propriedades. A acetilação, silição, ou hidrólise com ácido concentrado constituem algumas técnicas de derivatização.

2.5.2.1. CLAE por adsorção em sílica gel

Os procedimentos descritos por CASIRAGHI et al. (1994) e PARK e ADDIS (1985) contemplaram a utilização de colunas contendo sílica gel (granulometria média de 5 μm). Os compostos saíram da coluna ao se permear fase móvel composta de mistura contendo frações de volume entre 5% e 12% de 2-propanol em hexano. Utilizou-se vazão entre 1 e 1,2 mL/min e a detecção foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 208 nm. A reprodutibilidade entre os métodos não excedeu 2%, configurando-se a excelência desses protocolos na quantificação de colesterol em amostras de produtos lácteos.

Destacou-se também o procedimento desenvolvido por KATSANIDIS e ADDIS (1999), para detecção e quantificação de colesterol em tecido muscular, que consistiu no escoamento de fase móvel composta de hexano-isopropanol (99:1), através de uma coluna de sílica gel ZORBAX RX-SIL, em uma vazão de 1,3 mL/min. Utilizaram como detector um espectrofotômetro UV, com comprimento de onda selecionado em 202 nm.

2.5.2.2. CLAE por partição em fase reversa (CLAE-FR)

Atualmente, essa é uma das técnicas mais utilizadas para a separação, detecção e quantificação de esteróis em alimentos.

Diversos são os protocolos de cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC) registrados na literatura pertinente. Entretanto, destacar-se-ão aqueles que contemplaram a separação do colesterol dos demais esteróis (óxidos de colesterol, fitosteróis, tocoferóis e tocotrienóis).

MANZI et al. (1996) e ZIMMERMANN e ELMADFA (1997) descreveram um método de RP-HPLC para a separação de alfa, beta e gama-tocoferóis, retinóis totais, colesterol, β -sitosterol, campesterol e stigmasterol, utilizando

somente metanol como fase móvel, em condições isocráticas, à vazão de 1,0 mL/min. A corrida cromatográfica se deu em uma coluna empacotada com sílica (5 µm) RP 18. Dois detectores programáveis, um espectrofluorímetro e um espectrofotômetro UV, este ajustado ao comprimento de onda 208 nm, foram conectados em série, de forma a permitir a detecção de todos os compostos na mesma corrida. CARERI et al. (2001), utilizaram a mesma coluna para separar β-sitosterol e stigmasterol de óleos vegetais, contudo a fase móvel utilizada foi acetonitrila e água (86:14 em volume), escoada em condições isocráticas, a 0,3 mL/min, obtendo-se detecção na concentração de 0,42 µg/mL e quantificação nas concentrações de (0,52 a 0,54) µg/mL, para o β-sitosterol e o stigmasterol, respectivamente.

Para determinar colesterol em carne e em tecidos adiposos, ARNETH e Al-AHMAD (1995) utilizaram RP-HPLC. O sistema analítico consistiu numa coluna RP 18, fase móvel acetonitrila e isopropanol (80:20 em volume) e detecção em espectrofotômetro UV (comprimento de onda 210 nm). Stigmasterol foi usado como padrão interno, obtendo-se taxa de recuperação de 100%, tanto para o colesterol como para os seus oleatos. Obteve-se resposta linear na faixa compreendida entre (20 e 450) mg colesterol por 100 g de amostra.

Três esteróis – desmosterol, fucosterol e colesterol – presentes nas gônadas de um tipo de pescado marinho (*Paracentrotus lividus*), foram identificados e quantificados por HERNANDEZ et al. (1999), utilizando a técnica RP-HPLC. A metodologia adotada contemplou o uso de uma coluna C18 como fase estacionária, escoamento isocrático, fase móvel constituída por metanol e acetonitrila (30:70 em volume) e detecção UV (comprimento de onda 205 nm). Os limites de detecção encontrados foram de: 2,31 µg/mL, 0,56 µg/mL e 2,33 µg/mL para o desmosterol, o fucosterol e o colesterol, respectivamente.

Alternativamente, EMARA et al. (1999) propuseram outra metodologia para a determinação de colesterol em gema de ovo. Utilizando CLAE-FR (coluna RP 18), os autores adotaram como fase móvel, uma mistura composta de acetonitrila, isopropanol e tampão fosfato pH 4,0 (40:50:10 em volume). A média de recuperação do colesterol variou entre 97,7% e 100,5%, com desvio-padrão entre 2,7 e 3,84%. O método, quando adotado em rotina de análises

diárias de ovos de galinha, provou ser acurado e rápido, tendo sido considerado aplicável ao estudo de efeitos nutricionais do colesterol oriundo de gema de ovo.

2.5.3. Cromatografia gasosa (CG)

Isoladamente, a análise cromatográfica por CG é rápida, porém, na maioria dos casos, há necessidade de preparação prévia da amostra, de forma a se evitar a ocorrência de interferências durante a análise e a contaminação da coluna cromatográfica. Às vezes, essa etapa é longa e complexa, aumentando em muito o tempo e o custo da análise.

A cromatografia gás-líquido, utilizada na análise de colesterol, faz uso de um líquido pouco volátil, como fase estacionária, recobrando um suporte sólido ou as paredes de colunas capilares. A separação se baseia em mecanismos de partição das substâncias entre a fase líquida e a fase gasosa. A fase estacionária deve ser termicamente estável e quimicamente inerte às substâncias, na temperatura de uso (COLLINS, 1997).

O método oficial nº 967.18 da AOAC (AOAC, 1998), preconiza a utilização de GC para determinação de β -sitosterol em óleo de manteiga (*Butter Oil*), como alternativa para detecção de fraude. Essa molécula pode aparecer na concentração de 1 mg β -sitosterol por 100 g de *butter oil*, e entre 3 mg e 4 mg por 100 g sorvete.

O método nº 976.26, registrado na AOAC (1998), também utiliza GC para determinação de colesterol em alimentos multicompostos. Como na maioria dos métodos que empregam cromatografia gasosa para determinação de esteróis, estes devem ser derivatizados para éteres de trimetilsilil (TMS), de maneira a serem quantificados.

Para a análise específica de esteróis, os principais fabricantes de colunas capilares para GC recomendam aquelas que incorporem pelo menos 5% de grupos fenil no polímero de dimetilpolisiloxano. Essa composição imprime uma ligeira polaridade à fase estacionária, resultando em excelente seletividade, reproduzibilidade e eficiência para análise de compostos contendo grupos aromáticos (VARIAN, 1998).

REGUEIRO et al. (1994) determinaram colesterol, ésteres de colesterol, mono e diglicerídeos em gordura de presunto por cromatografia gasosa, dispensando-se o procedimento de derivatização dessas moléculas. Com isso, e minimizando-se a manipulação das amostras, evitou-se o risco de contaminação química, inerente ao reagente TMS, e o de ampliação das fontes de erro experimental. De maneira similar, BALLESTEROS et al. (1996) desenvolveram um método automatizado de cromatografia gasosa para determinar colesterol, alfa-tocoferol e acetato de alfa-tocoferil, simultaneamente, em óleos comestíveis, sem que houvesse necessidade da etapa de derivatização das amostras. Validaram este método por meio da análise de material de referência que se fazia presente em óleo de coco. JEKEL et al. (1998) também utilizaram GC-capilar para determinar esteróis, não-derivatizados, em amostras dietéticas e, ainda, MARASCHIELLO et al. (1996) determinaram colesterol em músculo suíno por GC-capilar, sem derivatização das amostras.

2.5.4. Métodos enzimáticos

PEINADO e TORIBIO (1986); FERNANDEZ-ROMERO et al. (1987), propuseram diversos métodos enzimáticos para a determinação de colesterol total, em soro sanguíneo, por análise de injeção de fluxo (FIA). Foram obtidas curvas de calibração com linearidade nas faixas entre 0,02 e 0,2 e 0,005 e 0,05 g/L. Estes métodos apresentaram respostas excelentes quando foram aplicados para se determinar colesterol em plasma sanguíneo. Posteriormente, AMUNDSON e ZHOU (1999) desenvolveram um método fluorimétrico para a determinação enzimática do conteúdo de colesterol, usando um equipamento fluorogênico (*Amplex Red*). Estes ensaios foram executados em microplacas com 96 poços; considera-se considerado um método ameno, rápido, ideal para procedimentos automatizados. Possibilita-se a detecção de pmol (2 ng) de colesterol por poço, apresentando-se como um método 100 vezes mais sensível que outros métodos colorimétricos e fluorimétricos. O *Amplex Red*, quando aplicado para medição de níveis de colesterol em soro sanguíneo, e em amostras de alimentos, foi considerado muito eficiente e menos suscetível à interferência de compostos biológicos.

INGR e SIMEONOVÁ (1983) propuseram uma técnica direta, em um só estágio, para determinação do conteúdo de colesterol total em gema de ovo. Amostras dessas gemas foram tratadas por diluição, até uma concentração satisfatória para aplicação diagnóstica do Bio-La-teste, método que foi inicialmente desenvolvido para determinação de colesterol em plasma sanguíneo. O procedimento de aplicar este bioensaio foi modificado em parte. Esta modificação do Bio-La-teste, para gema de ovo, proporcionou um erro sistemático de 1,5%. O tempo necessário para preparo da amostra, mais a análise propriamente, não excedeu 40 minutos.

2.5.5. Outros métodos

Na literatura pertinente encontra-se referências sobre outros métodos para a determinação de colesterol. Entretanto, estes têm aplicação limitada, são demorados (demandam numerosas etapas no procedimento analítico), e apresentam o limite mínimo de detecção muito elevado. Citam-se, por exemplo, os métodos nº 941-09, que faz uso do princípio titulométrico, e o nº 988.17, baseado em cromatografia em camada fina, sendo ambos oficiais e referenciados pela AOAC (1998).

XU et al. (*in press*) desenvolveram um método simples e rápido para quantificação de colesterol em gema de ovo. As amostras foram saponificadas e então quantificadas por NACE (*non-aqueous capillary electrophoresis*) – eletroforese capilar. O limite mínimo de detecção do método foi 5µg/mL (duas vezes a taxa de sinal do ruído de fundo), podendo ser usado para determinações rápidas e sensíveis de colesterol em alimentos.

2.6. Tecnologias para redução do colesterol em alimentos

DRYER (1990), comentou que, em 1989, 1348 novos produtos lácteos foram introduzidos nos Estados Unidos. A maior parte destes, continha inscrições populares do tipo “gordura reduzida”, “sem gordura”, colesterol reduzido, “zero” colesterol e baixa caloria. Desses novos produtos, 36 eram bebidas, 500 sobremesas geladas, 194 novidades congeladas, 345 queijos, 215 iogurtes e 58 outros produtos. Entretanto, grande parte desses produtos foi

destinada ao consumo interno, havendo mais de 200 companhias envolvidas no marketing de novidades alimentícias.

No mercado americano, e tão somente nele, em face à extensa discussão envolvendo o assunto colesterol dietético, verifica-se um potente e significativo marketing para produtos lácteos com teores reduzidos de colesterol. Ao empreender agressivo marketing no comércio desses produtos, a indústria de laticínios, nos EUA, deveria atentar para a alteração de atitude dos consumidores, que cresce em direção ao consumo de alimentos saudáveis.

2.6.1. Limitação à produção de alimentos “sem colesterol”

Cresce a preocupação de consumidores com o nível e com a quantidade ingerida de colesterol em seus alimentos, contudo existem barreiras à produção de produtos “sem colesterol”.

Enfocando-se o ponto de vista científico, segundo RENNERT (1991) e SIEBER (1993), não existiria necessidade de se reduzir o colesterol dos produtos lácteos, visto que, a presença deste na dieta, pouco efeito exerceria sobre o nível de colesterol sanguíneo. Recentemente, GYLLING e MIETTINEN (2002), pesquisando alternativas para tratamento de hiperlipidêmicos, verificaram que era o perfil básico de metabolismo de colesterol que determinava mudanças em termos de síntese e absorção deste.

Os processos para redução do teor de colesterol do leite podem ser classificados em biológicos (enzimáticos), químicos, e físicos (Quadro 4).

2.6.2. Métodos biológicos

Os métodos que se baseiam em reações catalisadas por enzimas, de transformação do colesterol em outros compostos, apresentam vantagens tais como: baixo investimento e transformação definitiva do produto.

MILLER et al. (1996) descreveram a atividade biológica de algumas transferases, além do procedimento para construí-las geneticamente, sua produção comercial e alguns métodos para seu uso. Dentre esses métodos, inclui-se a degradação do colesterol, *in vitro* e *in vivo*, resultando na conversão do colesterol em outros produtos esteróis úteis, como a pregnenolona, substância precursora da testosterona.

Quadro 4 – Métodos para remoção do colesterol de gorduras

Método	Processo	Agente	Mecanismo	Referência
Biológico	Microbiológico	<i>Lactobacillus</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Nocardia</i>	Transformação enzimática	KLAVER E MEER (1993); SALE E MARCHESINI (1984); RASIC et al. (1992); GILLILAND (1985)
	Enzimático	Colesterol redutase ou oxidase	Transformação em óxidos	ANDERSON et al. (1995)
Químico	Complexação e extração	Solventes orgânicos	Extração	CZECH et al. (1993); JOHNSON et al. (1991)
	Complexação	β -ciclodextrina	Emulgação	AHN e KWAK (1999)
Físico	Adsorção	Sílica gel	Adsorção sólido-líquido	KLEMANN et al. (1991); VALENTE (2000)
	Adsorção	Carvão ativo	Adsorção sólido-líquido	KLEMANN et al. (1991A)
	Destilação	Destilação a vapor	Fracionamento	BOUDREAU E ARUL (1993)
	Destilação	<i>Short path</i>	Fracionamento	LANZANI et al. (1994)
	Extração supercrítica	Extração com dióxido de carbono	Fracionamento	CHAO et al. (1991); BHASKAR (1993); HUBER et al. (1996)

Fonte: SIEBER (1993).

Igualmente, SAITO et al. (1996) patentearam um processo para obtenção de uma substância reduzida em colesterol pela conversão deste em epicolesterol, descrevendo também uma nova colesterol-oxidase, uma nova epicolesterol desidrogenase e o processo para produção destas enzimas. Neste procedimento, os produtos resultantes, reduzidos em colesterol, foram preparados sem que houvesse deterioração da qualidade original após a conversão do colesterol em epicolesterol, o qual não é intensamente absorvido pelos intestinos.

A enzima colesterol redutase foi descoberta em certas partes de vegetais, sendo também produzida por diversas bactérias habitantes do trato

digestivo de animais (ANDERSON et al., 1995). A espécie Eubactéria (A.T.C.C. 21408), produtora dessa enzima, foi concentrada em um homogenato por BEITZ et al. (1990) e utilizada para reduzir o teor de colesterol de alguns alimentos. O produto resultante dessa degradação, o coprostanol, tem baixa absorção no trato intestinal humano. Para aplicação industrial, adicionou-se colesterol redutase ao leite previamente homogeneizado. Alternativamente, pode-se permear leite por um suporte de material inerte contendo a enzima. Em produtos cárnicos, acrescentou-se o homogenato contendo enzima às preparações fundamentais de carnes. Conforme descrito por SAITOH et al. (2001), em ovos essa enzima pode ser injetada no interior da gema, ou pode ser acrescentada a misturas de clara e gema.

BOUDREAU e ARUL (1993) citam que, na França, credenciou-se uma patente para remoção de esteróis de um filme de gordura láctea, incubando-se este com bactérias degradadoras do gênero *Nocardia*. Este procedimento permitiu uma redução de até 89% do conteúdo de esteróis. Relata-se ainda que os *Lactobacillus acidophilus* podem metabolizar parte do colesterol contido em produtos lácteos fermentados (ANDERSON et al., 1995). Estudos desenvolvidos por RASIC et al. (1992) e TOIT et al. (1998), com bactéria lácticas, indicaram fortes evidências do efeito destas bactérias em reduzir o colesterol de produtos fermentados, ou mesmo o nível sanguíneo de colesterol de pessoas usuárias destes produtos.

2.6.3. Métodos químicos

Os processos químicos de extração envolvem, basicamente, reações de complexação e de extração por solventes.

2.6.3.1. Reações de complexação

HSIEH et al. (1994) desenvolveram um método para remoção de gordura e de colesterol em ovos e num produto à base de ovos. Adicionaram um agente quelante, aniônico a gemas de ovos diluídas. Este agente, por ser capaz de formar complexos lipoprotéicos, acarretou a precipitação da lipoproteína do ovo. O complexo sólido precipitado foi separado da fração

aquosa. Em seguida, os lipídeos e o colesterol foram separados do precipitado lipoprotéico, obtendo-se um complexo contendo somente proteínas. O produto obtido incluía complexo protéico, gordura essencialmente livre de colesterol e clara de ovo líquida. Nesta técnica, podem-se utilizar vários agentes quelantes aniônicos. Preferivelmente, como agentes quelantes, utilizam-se surfactantes e polissacarídeos aniônicos. Exemplos de surfactantes aniônicos incluem: colato de sódio, deoxicolato de sódio, e lauril sulfatos de sódio (SLS), embora os SLS sejam os mais empregados. Em pH ácido (menos que aproximadamente 5), as moléculas típicas de lipoproteínas estarão carregadas positivamente (catiônicas), sendo precipitadas pelo SLS sem a presença de cátions divalentes. Porém, quando o pH é maior que, ou igual a aproximadamente 5, cátions divalentes, como íons de cálcio, magnésio e (ou) manganês, irão atuar como uma “ponte” para ajudar o SLS quelar lipoproteínas. Particularmente, sob condições neutras ou ligeiramente ácidas, como por exemplo, pH entre aproximadamente 5 e 7, especialmente entre aproximadamente 6 e 7, cátions divalentes facilitarão a interação entre lipoproteínas e SLS, formando precipitados.

KWAK et al. (2000) relatam um outro método para remoção de colesterol do leite e do creme de leite, que pressupõe a utilização da β -ciclodextrina, um polissacarídeo cíclico capaz de formar complexo com o colesterol, em solução aquosa. RODERBOURG et al. (1993) citam ser relevante a relação água:gordura na eficiência deste processo, e ainda, enumeraram os parâmetros mais importantes que determinariam se uma molécula poderia formar um complexo. São eles: a hidrofobicidade, o tamanho relativo, e a geometria em relação à molécula de ciclodextrina.

Quando dissolvidas em água, as ciclodextrinas podem acomodar moléculas menores nas suas cavidades internas ou nos grupos funcionais de substâncias menos hidrofílicas que água. Em solução aquosa, regiões ligeiramente apolares da ciclodextrina estarão ocupadas por moléculas de água, num processo energeticamente desfavorável (interação polar-apolar). Estas moléculas de água poderão ser prontamente substituídas por outras, como o colesterol, ou ácidos graxos livres e seus ésteres, que são comparativamente menos polares que água (AWAD e GRAY, 2000).

AWAD e SMITH (1996) desenvolveram outro método, para extrair colesterol e seus ésteres, de gemas de ovos, com base na afinidade específica destes pela β -ciclodextrina. O método consistiu na seguinte seqüência de passos: adição de β -ciclodextrina, ajuste do pH, diluição com água destilada, aquecimento, homogeneização, resfriamento e centrifugação. O processo possibilitou redução de aproximadamente 95 a 96% do total de colesterol presente em gema de ovo, sem que houvesse remoção ou dano de outros componentes da gema. A estabilidade protéica, o volume de expansão e a cor mantiveram-se os mesmos para o controle e para o produto final.

De todos os processos desenvolvidos para reduzir colesterol e ácidos graxos livres, em gordura animal, utilizando-se da formação de complexos com β -ciclodextrina, pode-se concluir que, de uma maneira global, há uma necessidade por melhorá-los. Atualmente, os processos ainda são bastante onerosos em função do elevado custo agregado à β -ciclodextrina (MAKI, 1999).

KODALI (1999) caracterizou um método moderno de reduzir esteróis de produtos como: sebos de carne bovina, banha suína, óleo de peixe, gema de ovo, manteiga e queijo. O método pode ser aplicado a diversos esteróis, incluindo, sem limitação, os esteróis naturais ou sintéticos de plantas (beta-sitosterol, campesterol e stigmasterol), micosteróis, colesterol e esteróis quimicamente modificados, ou derivatizados, contanto que tais moléculas sejam particionáveis ao final do processo. O método foi eficiente e de baixo custo, tendo sido baseado na afinidade do colesterol e de outros esteróis por moléculas anfipáticas fluidas, como os fosfolipídios. Posteriormente, KODALI (2001) enfatizou que esses fosfolipídios, enriquecidos com colesterol, poderiam ser isolados da mistura, e usados, alternativamente, para diversos propósitos.

2.6.3.2. Extrações com solventes

JOHNSON et al. (1991) desenvolveram um processo de produção de gordura láctea com baixo teor de colesterol com base na partição da gordura em duas fases, uma aquosa e outra orgânica. A fração orgânica (creme) foi lavada e reseparada por diversas vezes, de forma a obter-se um produto contendo substanciais quantidades de glóbulos de gordura intactos. O colesterol presente nas membranas dos glóbulos, em torno de 90% do

colesterol livre (DAPPER et al., 1987), foi extraído dessas membranas por meio de um solvente orgânico polar (etanol), sem que houvesse perda substancial de gordura láctea na forma sólida. Relatou-se que o creme obtido possuía características sensoriais bastante similares àquelas da gordura láctea natural. Aproximadamente, pelo menos 50% do colesterol foram removidos por este método, chegando-se a 85% em alguns tratamentos.

MERCHANT et al. (1995) descreveram um método de extrair colesterol de um produto lácteo, promovendo a agitação de misturas de leite com óleo vegetal, variando a relação dessas misturas de aproximadamente 1:99 até aproximadamente 1:4 e, por fim, obtiveram o produto lácteo descolesterolizado, e o óleo, em fases distintas.

Outro processo de redução de colesterol utilizando o princípio de extração foi descrito por MEILBACH et al. (1996), para produção de ovos reduzidos em colesterol. Ao submeterem uma mistura de óleo vegetal:gema:permeado de clara de ovo, a uma relação de cerca de 1:0,7:0,05, a 51 °C, produziu-se gema de ovo reduzida em colesterol. Seqüencialmente, o método preconizou que se misturasse gema de ovo reduzida em colesterol, com claras de ovo concentradas, e com óleo vegetal, a uma relação de cerca de 1:0,7:0,05 para aproximadamente 1:1,2:0,2. Este método apresentou como importante vantagem, a possibilidade de se usar o permeato contendo gema de ovo com colesterol reduzido e o concentrado de clara de ovo, para se emparelhar os níveis de clara e gema resultantes do tratamento, com os níveis originais. Assim, a composição resultante do produto de ovo reconstituído seria substancialmente igual à de ovos naturais, exceto pela substituição da gordura saturada de gema de ovo, por um óleo não saturado, o que melhorou a textura e a funcionalidade, e pelo nível de colesterol que foi reduzido.

Posteriormente, JACKESCHKY (1999) descreveu um método de fabricar produtos dietéticos, a base de ovo integral, ou produtos de gemas de ovos, com teores reduzidos de colesterol. O método, que utilizou ovo inteiro, ou gema, como material para início de secagem, também possibilitou a redução de colesterol através de extração com óleo de soja (um agente líquido, sem colesterol e bastante satisfatório para consumo humano). O método teve como característica o procedimento de se pressionar o agente de tratamento, a

permeiar pelo ovo inteiro ou pela gema, a uma determinada temperatura e pressão.

Geralmente, providenciam-se métodos para remover colesterol de lipídios comestíveis. Nesta consideração, as gorduras tipicamente animais, que contêm colesterol predominantemente na forma livre, como também quantidades secundárias de ésteres de ácidos graxos (colesteril oleato ou palmitato), foram um incentivo para que WREZEL et al. (1992) desenvolvessem um processo utilizando-se de extração por solventes, que pode ser usado tanto para remover colesterol de triglicérides de origem animal, quanto de origem vegetal, incluindo, mas não limitando, manteiga, sebo de carne bovina, óleo de peixe, gema de ovo, óleo de soja, óleo de canola, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de algodão, óleo de girassol, azeite de oliva e óleo de amendoim.

Recentemente, FOGLIA et al. (2002) registraram uma patente referente ao fracionamento de gordura de frango, para produção de composições de ácidos graxos polinsaturados enriquecidas com triacilgliceróis. O método resultou num produto em que a composição da fração lipídica, obtida com fracionamento por solventes, possuía elevadas concentrações de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), ésteres de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e reduzidas quantidades de ésteres de ácidos graxos saturados, quando comparada com as concentrações originais da gordura de frango.

2.6.4. Métodos físicos

NORRIS (1977), utilizando a técnica de fracionamento de gordura de leite, obteve uma emulsão láctea reduzida em triglicéridios. As frações que apresentaram ponto de derretimento satisfatório puderam ser recombinadas, gerando assim um produto caracterizado por agregar limitadas alterações no conteúdo de gordura sólida, fato que proporcionou uma satisfatória característica de “espalhabilidade”. Adicionando-se sólidos não gordurosos, neste caso, água e sal, obteve-se manteiga. As frações combinadas não incluíam os triglicéridios que derretiam acima da faixa de (0 a 20) °C, o que resultou em redução no teor de colesterol.

MARSCHNER et al. (1989), esclareceram o uso de destilação molecular para reduzir o conteúdo de colesterol de um meio contendo gorduras. LANZANI et al. (1994), utilizando essa mesma técnica, concluíram que o investimento industrial e o custo operacional eram excessivamente altos.

SUNDFELD et al. (1994) e KLEMANN et al. (1991a), relataram que colesterol poderia ser removido de gorduras, quando estas eram colocadas em contato com um adsorvente sólido ou material de adsorção. Como exemplos de utilização de material adsorvente citaram a sílica gel, a saponina e o carvão ativado.

No trabalho de KLEMANN et al. (1991a), usando-se um adsorvente com superfície modificada e capaz de adsorver seletivamente o colesterol e os outros esteróis puderam ser separados de misturas fluidas, em especial de gema de ovo. Um adsorvente com superfície modificada, preparado deste modo, também poderia ser usado para remover esteróis contidos em solventes anteriormente utilizados para extrair esteróis de alimentos, evitando-se assim, a necessidade de destilar e condensar o solvente, antes de reciclá-lo para tratamento de sucessivas bateladas.

2.6.4.1. Extrações utilizando CO₂ supercrítico

Para várias substâncias, a eficiência da extração destas com fluido supercrítico irá depender da interação entre o gás supercrítico e o material do qual elas serão extraídas. Sabe-se que o gás carbônico (CO₂) supercrítico dissolve compostos polares e apolares. Obtém-se melhor eficácia no processo de extração de materiais polares, como por exemplo, cafeína, quando a umidade situa-se aproximadamente em torno de 40%. Esses tipos de extração podem ser conduzidos em água saturada com gás carbônico supercrítico. Materiais secos, apolares e solúveis em solventes como hexano, benzeno ou cloreto de metileno, podem ser tipicamente extraídos com CO₂ supercrítico a pressões e temperaturas mais altas (BOUDREAU e ARUL, 1993).

CHAO et al. (1991) reportaram que alguns compostos podem ter suas polaridades aumentadas ao se adicionarem solventes polares, como álcoois ou, eventualmente, até mesmo água, incrementando-se assim o poder de dissolução do CO₂ supercrítico. Porém, no caso de lipídios apolares, ou do

colesterol, para que ocorram remoções de quantidades significativas destes materiais, pelo CO₂ supercrítico, o nível de umidade não deveria exceder 15%, devendo ser, preferivelmente, abaixo de 10%.

Utilizando um processo de extração com CO₂ supercrítico combinado com adsorção em alumina, MOHAMED et al. (1998) conseguiu reduzir em 96% a concentração de colesterol em óleo de manteiga.

ZEIDLER et al. (1996) registraram um método para extração de colesterol de gema de ovo integral, utilizando-se dióxido de carbono supercrítico. Essa extração foi conduzida na presença de co-solventes, e (ou) outros agentes modificadores, capazes de sublimar o rendimento do processo. Resumindo, combinou-se gema de ovo integral, líquida (aproximadamente 50% de umidade), com óleo vegetal em uma relação de 1:0,5, preferivelmente 1:2, de gema de ovo e óleo. Essa mistura foi homogeneizada, sob pressão normal, sendo a temperatura mantida entre 35 e 45 °C, para se formar uma emulsão. Submeteu-se esta emulsão à extração supercrítica, com gás carbônico ou, alternativamente, com gás carbônico na presença de um co-solvente (p.ex.: metanol). Usando esta variação, 60 a 80% de colesterol foram removidos de gema de ovo líquida.

Utilizou-se também o processo de extração com CO₂ supercrítico para modificação de vários comestíveis, incluindo manteiga, como descrito por BIERNOTH et al. (1985).

A invenção proposta por HEIDLAS et al. (1997), forneceu um processo para a produção de gordura e produtos em pó, a base de ovos, reduzidos em colesterol, que continham elevado teor de fosfolipídios, por meio de extração com gases comprimidos (propano:gás carbônico). Devido aos atenuados parâmetros de processo, não se evidenciou desnaturação protéica. A quantidade de mistura de gases pôde ser variada dentro de amplos limites, dependendo essencialmente da concentração de gorduras e de derivados de colesterol a serem removidos, como também da composição da mistura de extração.

Porém, como desvantagens desta técnica, pode-se citar que as condições que mantêm o solvente na região supercrítica envolvem extremos de temperatura e pressão, e que a equipamentação requerida é muito cara.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

O objetivo geral foi o de avaliar, *in vitro*, os efeitos resultantes das interações físico-químicas entre fibras solúveis presentes em farelos de cereais e em farelo de soja e o colesterol do óleo de manteiga. Foram exploradas as propriedades do β -glucano presente em farelos de aveia, trigo, e soja.

3.1. Preparação do óleo de manteiga

Obteve-se o óleo de manteiga a partir de manteiga de primeira qualidade produzida pela Usina de Laticínios da FUNARBE (Viçosa-MG). Essa manteiga foi aquecida a 60 °C e submetida à centrifugação com uma força equivalente a 800 g, por 10 minutos, conforme o procedimento empregado por VALENTE (2000). Sifonou-se a fase superior – óleo de manteiga – embalando-se em frascos protegidos de luz e estocando-se a -40 °C até o seu uso.

3.2. Aparato experimental e fluxograma do processo

Na Figura 7 é mostrado o esquema do protótipo usado para estudar o processo de remoção do colesterol de óleo de manteiga.

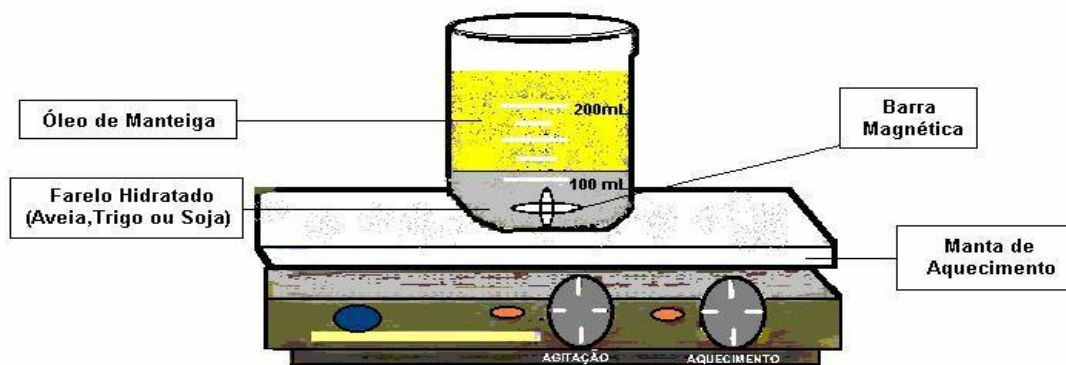


Figura 7 - Esquema do aparato utilizado para processo em batelada.

Nos fluxogramas do processo são mostradas as metodologias que foram aplicadas para se remover o colesterol do óleo de manteiga (Figura 8) e para se quantificar os efeitos de algumas variáveis do processo de remoção do colesterol do óleo de manteiga (Figura 9).

3.3. Preparo dos farelos

Farelos de trigo, aveia e soja, obtidos no comércio local de Viçosa-MG, foram fracionados através de um conjunto de peneiras Granutest (Telasten Ltda.), classificações 35 (0,5 mm) e 18 (1,0 mm) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Coletaram-se duas frações para os experimentos: uma cujos diâmetros variavam entre 0,5 e 1,00 mm (fração que passou pela peneira 18 e ficou retida pela peneira 35), e outra contendo partículas de diâmetros menores que 0,5 mm (fração que passou pela peneira 35), que foram denominadas G1 e G2, respectivamente. Essas granulometrias foram adotadas com base nos experimentos de KAHLON e CHOW (2000) e de KAHLON e WOODRUFF (2002).

3.4. Extração de colesterol do óleo de manteiga

3.4.1. Técnica de separação

Utilizou-se um processo em batelada para a extração de colesterol do óleo de manteiga.



Figura 8 – Fluxograma do processo utilizado para remoção do colesterol do óleo de manteiga.

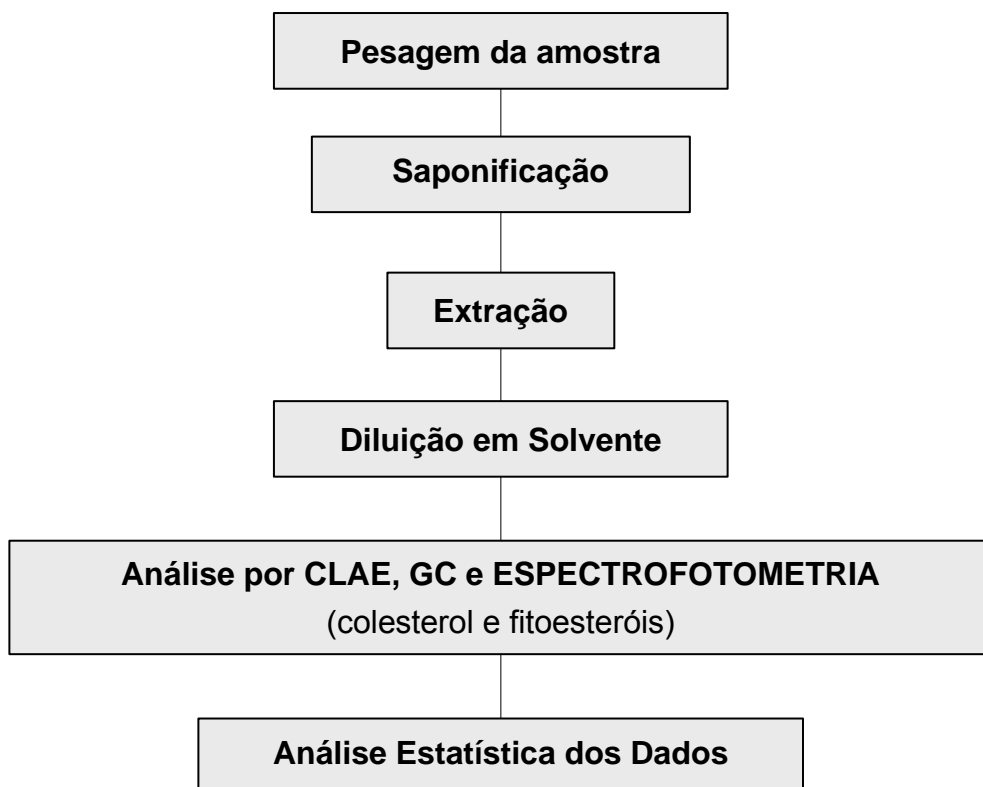


Figura 9 – Fluxograma da metodologia utilizada para análise do colesterol.

Após ensaios preliminares, uma vez que as condições de extração foram aperfeiçoadas, durante a fase de experimentos a quantidade de farelo posta para reagir com óleo e com água foi aumentada até que se atingisse a carga máxima suportada pelo aparato de extração. Em um béquer de 250 mL, colocou-se uma massa de 20 g de farelo para reagir com 80 mL de óleo de manteiga, colocando-se este conjunto sobre uma manta elétrica dotada de dispositivo para controle de aquecimento e agitação (FANEM). Após atingirem-se as temperaturas especificadas, que variaram entre 35 e 90 °C, foram adicionadas quantidades de água entre 8% e 50% em volume, em relação ao volume inicial de óleo. Padronizou-se em 30 minutos o tempo total de cada reação, fixando-se a velocidade da barra magnética em, aproximadamente, 300 rotações por minuto.

3.5. Delineamento experimental

Utilizaram-se três tipos de farelos, cinco percentuais de água, cinco temperaturas e duas granulometrias para os tratamentos propostos (Quadro 5), que foram aplicados segundo um esquema fatorial, com três repetições, num delineamento inteiramente ao acaso.

3.6. Análise quantitativa de colesterol do óleo de manteiga

3.6.1. Obtenção das amostras

Para análise da concentração de colesterol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), espectrofotometria UV-VIS e por Cromatografia de Fase Gasosa (GC), coletaram-se amostras do óleo de manteiga original, e de frações representativas de cada tratamento, em triplicatas. Na coleta das frações representativas dos tratamentos, e com o objetivo de se obter amostras de óleo de manteiga livres de resíduos de farelo e de água, centrifugou-se uma alíquota de volume aproximadamente 20 mL do produto de cada batelada (farelo, água e óleo de manteiga) a 1.000 g, por 5 minutos, para completa separação do óleo reduzido em colesterol.

Quadro 5 – Esquema do delineamento experimental empregado

Tratamento	Granulometria	Temperatura (°C)	% de Água	Farelo
1	G1	35	8	Aveia
2	G1	35	12	Aveia
3	G1	35	20	Aveia
4	G1	35	30	Aveia
5	G1	35	50	Aveia
6	G1	55	8	Aveia
7	G1	55	12	Aveia
8	G1	55	20	Aveia
9	G1	55	30	Aveia
10	G1	55	50	Aveia
11	G1	75	8	Aveia
12	G1	75	12	Aveia
13	G1	75	20	Aveia
14	G1	75	30	Aveia
15	G1	75	50	Aveia
16	G1	85	20	Aveia
17	G1	85	30	Aveia
18	G1	85	50	Aveia
19	G1	90	20	Aveia
20	G1	90	30	Aveia
21	G1	90	50	Aveia
22	G1	35	8	Trigo
23	G1	35	12	Trigo
24	G1	35	20	Trigo
25	G1	35	30	Trigo
26	G1	35	50	Trigo
27	G1	55	8	Trigo
28	G1	55	12	Trigo
29	G1	55	20	Trigo
30	G1	55	30	Trigo
31	G1	55	50	Trigo
32	G1	65	20	Trigo
33	G1	65	30	Trigo
34	G1	65	50	Trigo
35	G1	70	20	Trigo
36	G1	70	30	Trigo
37	G1	70	50	Trigo
38	G1	75	8	Trigo
39	G1	75	12	Trigo
40	G1	75	20	Trigo
41	G1	75	20	Trigo
42	G1	75	50	Trigo
43	G1	35	8	Soja
44	G1	35	12	Soja
45	G1	35	20	Soja
46	G1	35	50	Soja
47	G1	55	8	Soja
48	G1	55	12	Soja
49	G1	55	20	Soja
50	G1	55	50	Soja
51	G1	75	8	Soja
52	G1	75	12	Soja
53	G1	75	20	Soja

Continua...

Quadro 5, Cont.

Tratamento	Granulometria	Temperatura (°C)	% de Água	Farelo
54	G1	75	50	Soja
55	G2	35	8	Aveia
56	G2	35	12	Aveia
57	G2	35	20	Aveia
58	G2	35	30	Aveia
59	G2	35	50	Aveia
60	G2	55	8	Aveia
61	G2	55	12	Aveia
62	G2	55	20	Aveia
63	G2	55	30	Aveia
64	G2	55	50	Aveia
65	G2	75	8	Aveia
66	G2	75	12	Aveia
67	G2	75	20	Aveia
68	G2	75	30	Aveia
69	G2	75	50	Aveia
70	G2	85	20	Aveia
71	G2	85	30	Aveia
72	G2	85	50	Aveia
73	G2	90	20	Aveia
74	G2	90	30	Aveia
75	G2	90	50	Aveia
76	G2	35	8	Trigo
77	G2	35	12	Trigo
78	G2	35	20	Trigo
79	G2	35	30	Trigo
80	G2	35	50	Trigo
81	G2	55	8	Trigo
82	G2	55	12	Trigo
83	G2	55	20	Trigo
84	G2	55	30	Trigo
85	G2	55	50	Trigo
86	G2	65	20	Trigo
87	G2	65	30	Trigo
88	G2	65	50	Trigo
89	G2	70	20	Trigo
90	G2	70	30	Trigo
91	G2	70	50	Trigo
92	G2	75	8	Trigo
93	G2	75	12	Trigo
94	G2	75	20	Trigo
95	G2	75	30	Trigo
96	G2	75	50	Trigo

3.6.2. Saponificação das amostras e extração dos insaponificáveis

No processo de saponificação e extração dos insaponificáveis foram efetuadas modificações no método preconizado por CASIRAGHI et al. (1994), que é rápido, relativamente simples, apresenta excelente taxa de recuperação e é de baixo custo. Pesou-se exatamente, em balança analítica, uma alíquota em torno de 200 mg do óleo obtido conforme procedimento acima citado, que foi dissolvida em 10 mL de etanol 96%, e saponificada pela adição de 2 mL de solução etanólica de KOH (50% p/v), sob aquecimento de 70 °C por 10 min. Após o resfriamento dessa solução até a temperatura ambiente, os seus compostos insaponificáveis foram extraídos adicionando-se 50 mL de uma mistura de volumes iguais de hexano e éter etílico, e 30 mL de água destilada, em funil de separação, sob agitação vigorosa, até a separação completa das fases. Este procedimento foi executado três vezes. Evaporou-se a fase orgânica em evaporador rotativo (banho-maria ajustado a 55 °C), sob vácuo (400 mmHg), obtendo-se um resíduo seco.

3.6.3. Análise de colesterol e de fitosteróis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Com base no trabalho de ARNETH e AL-AHMAD (1995), as análises por CLAE foram conduzidas em Cromatógrafo Líquido (Modelo CG – 480 C), com válvula de injeção RHEODYNE, e “loop” de 100 µL. Bombeou-se em regime isocrático, 1,0 mL/min de fase móvel composta por uma mistura de isopropanol em acetonitrila, 20% em volume, por uma coluna C-18 Hypersil ODS (HEWLETT PACKARD®), partículas com granulometria média de 5 µm, diâmetro interno da coluna igual a 4,6 mm e 250 mm de comprimento. A absorbância foi medida a 210 nm, através de um detector UV-50 (VARIAM®), e a quantificação das áreas foi efetuada por um registrador-integrador CG-200 (CG Instrumentos Científicos).

O resíduo seco obtido (ver item 3.6.2.) contendo os compostos insaponificáveis, foi reconstituído com 10 mL da fase móvel descrita acima. Filtrou-se uma amostra em membrana de celulose regenerada RC55

(Schleicher e Schuell, Dassel, Alemanha), de 0,45 μm de diâmetro de poro; injetou-se 50 μL do filtrado no cromatógrafo.

Nas determinações do colesterol, após a extração da fração insaponificável, utilizou-se o método da referência externa, construindo-se uma curva de calibração. Utilizou-se, para tal, soluções contendo 0,03 mg; 0,14 mg; 0,28 mg e 0,50 mg de colesterol 99% de pureza (SIGMA C-8667 – Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA), por mL da fase móvel.

3.6.4. Análise do teor de colesterol por espectrofotometria

O resíduo seco obtido (ver item 3.6.2.) contendo os compostos insaponificáveis, foi reconstituído com 15 mL de clorofórmio e transferido para um tubo de ensaio de 20 mL. Adicionou-se, seqüencialmente, 1 mL de ácido acético glacial, 2 mL de anidrido acético e 0,2 mL de ácido sulfúrico concentrado, conforme metodologia oficial (ME-FAE, 1988), estimulando-se, assim, a reação de Liebermann – Burchard, com conseqüente produção do ácido bis-3,5-colestadienil-mono-sulfônico, de coloração verde, possibilitando a medida da absorvância no comprimento de onda 625 nm (CARR e DREKTER, 1956). Nas determinações do colesterol, utilizou-se o método da referência externa, construindo-se uma curva de calibração. Utilizou-se, para tal, soluções contendo 0,03 mg, 0,14 mg, 0,28 mg e 0,42 mg de colesterol 99% de pureza (SIGMA C-8667 – Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) por mL de clorofórmio grau espectrométrico (MERCK).

3.6.5. Análise de colesterol e de fitotesteróis por cromatografia de fase gasosa (GC)

Utilizou-se um cromatógrafo a gás modelo HP 5890 (HEWLETT PACKARD), equipado com uma coluna CP-TAP CB (25 m de comprimento, por 0,25 mm de diâmetro interno, 0,10 μm de espessura do filme interno. CHROMPACK, Middelburg - Holanda), detector de ionização de chama, e hidrogênio como gás de arraste, fixando-se a pressão em 15 lb/in². A temperatura da coluna foi programada para 280 °C, em regime linear, por 5,5 min. O injetor e o detector foram mantidos a 360 °C e a 370 °C,

respectivamente. O resíduo seco obtido (ver item 3.6.2), contendo os compostos insaponificáveis, foi reconstituído com 10 mL de uma mistura de volumes iguais de hexano e éter etílico. Filtrou-se essa amostra em membrana de celulose regenerada RC55 (Schleicher e Schuell, Dassel, Alemanha), de 0,45 µm de diâmetro de poro. Injetou-se 2 µL do filtrado no cromatógrafo.

3.6.5.1. Determinação do índice de recuperação do colesterol

Nas determinações do colesterol do óleo de manteiga, após extração da fração insaponificável, utilizou-se o método da referência externa, construindo-se uma curva de calibração com soluções de 0,03 mg; 0,06 mg; 0,09 mg e 0,12 mg de colesterol por mL de hexano:éter etílico (50% em volume).

Para a determinação do índice de recuperação, adicionou-se às amostras quantidades exatas de uma solução padrão de colesterol (1 mg/mL), obtido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) resultando em incrementos de 50 mg e de 100 mg de colesterol por 100 g da amostra original.

3.6.5.2. Determinação do índice de recuperação dos fitosteróis

Visto que no óleo de manteiga havia a possibilidade de ocorrência de fitosteróis provenientes dos farelos examinados (MAKI et al., 2001), procedeu-se com a determinação desses compostos pela técnica de GC (ver item 3.6.5).

Para a determinação do índice de recuperação dos fitosteróis, adicionou-se às amostras quantidades exatas de uma solução estoque de padrões dos fitosteróis stigmasterol, campesterol e β-sitosterol (Sigma Chemical Co), para que se obtivessem concentrações de 50 mg, 100 mg e 150 mg de cada padrão por 100 g de amostra. No preparo da solução estoque, diluiu-se 1 mg de cada padrão em 1 mL de hexano:éter etílico (50% em volume). As amostras foram saponificadas, e extraiu-se a fração insaponificável para análise.

3.7. Determinação do modelo matemático da redução do colesterol

Os resultados obtidos das análises foram utilizados para ajuste das melhores equações que descrevessem matematicamente o processo de redução do colesterol pelos farelos de grãos. Essas informações possibilitarão que se dimensione conjuntos de diversas capacidades para o processo de remoção do colesterol, inclusive ajustados à escala piloto.

3.8. Determinação da concentração de β -glucano nos farelos de aveia, trigo e soja

Para determinação da concentração de β -Glucano contido nos farelos analisados, empregou-se o procedimento de BOWLES et al. (1996). Esse procedimento é descrito a seguir.

Pesou-se, acuradamente, uma amostra em torno de 40 g de farelo (aveia, trigo ou soja) previamente classificado (ver item 3.3.). Foram feitas três lavagens sucessivas com 200 mL de etanol (QUIMEX P.A.), para remoção dos oligossacarídeos. Em seguida, suspendeu-se o farelo em solução de HCl 0,1 M, contendo 55 mM de NaCl, com a finalidade de inativação de β -glucanase endógena remanescente. Essa preparação foi incubada a 37 °C, sob agitação regular, por 2 horas, após o que houve a neutralização do HCl pela adição de 8,0 mL de NaOH 10% (em peso por volume). A incubação continuou por mais 3,5 horas quando essa mistura foi então centrifugada a 5.000 g, por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante.

Ao sobrenadante, adicionou-se um volume equivalente de acetona, agitou-se por 10 minutos, sedimentando-se o precipitado por centrifugação a 5.000 g durante cinco minutos. Este novo sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 100 mL de água destilada. Adicionou-se 0,03 g de azida sódica, com função bacteriostática, e a amostra foi incubada a 37°C por 2 horas. Seguiu-se nova centrifugação a 5.000 g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Secou-se o precipitado em evaporador rotativo (banho-maria ajustado a 85 °C), sob vácuo de 450 mmHg, obtendo-se um resíduo seco (β -glucano). Após pesagem deste, em balança analítica, determinou-se por diferença gravimétrica sua concentração em peso no farelo.

3.9. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software SAS (SAS[®]), empregando-se análise de regressão. Para apresentação gráfica das equações de regressão optou-se pela metodologia de superfície de resposta, que possibilita visualização tridimensional dos efeitos das variáveis. Para tal, foi utilizado um programa para construção de gráficos do tipo superfície de resposta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise quantitativa do colesterol em óleo de manteiga

O colesterol presente nas amostras de óleo de manteiga foi analisado pelas técnicas de Espectrofotometria, CLAE e CG, com o objetivo de se comparar variações na resposta quantitativa.

4.1.1. Análise do óleo de manteiga por espectrofotometria UV-VIS

A equação 1 representa o modelo de regressão linear que representa a relação entre a absorbância medida a 625 nm e a concentração de colesterol. Verificou-se um elevado coeficiente de correlação.

$$\text{COLESTEROL} = 0,3576 A_{625} + 0,0044 \quad R^2 = 0,999 \quad (\text{eq. 1})$$

em que **COLESTEROL** é a concentração de colesterol (mg/mL) na amostra e A_{625} é a absorbância medida a 625 nm.

Usando-se a equação 1, estimou-se a concentração de colesterol do óleo original por medição da absorbância a 625 nm. O valor médio obtido, de três observações, foi de (289 ± 18) mg de colesterol em 100 g de óleo.

4.1.2. Análise do óleo de manteiga por CLAE

A Figura 10 apresenta o cromatograma da análise de colesterol do óleo de manteiga original.

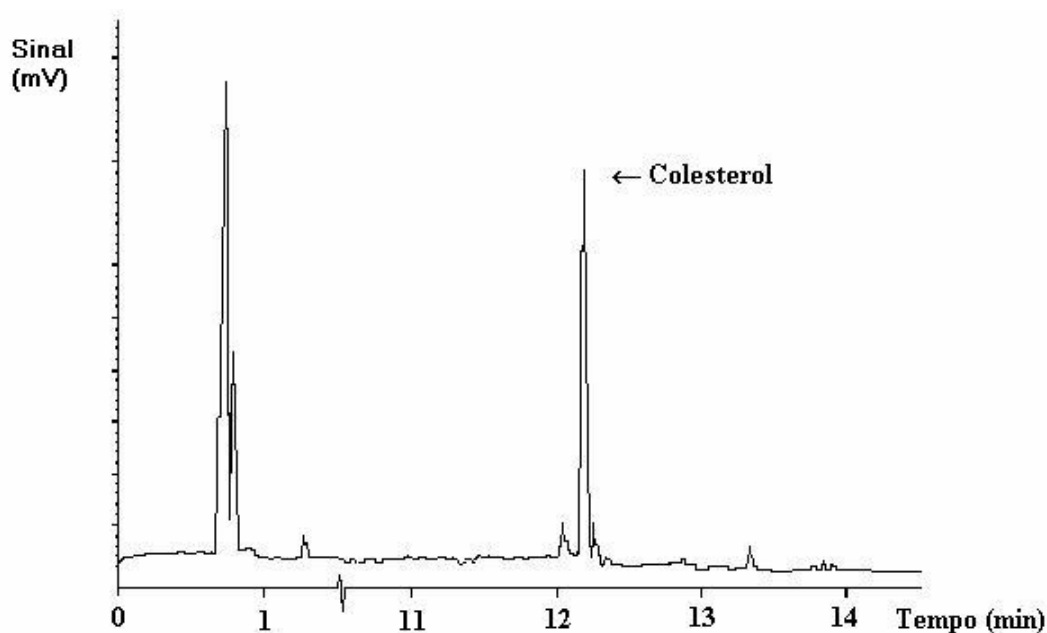


Figura 10 – Cromatograma, obtido por CLAE-FR, da amostra de óleo de manteiga, após saponificação. Coluna Hypersil ODS-C18 (HP); fase móvel acetonitrila e isopropanol (80:20 em volume); vazão de 1,0 mL/min e detecção a 210 nm com atenuação 0,5.

Na Figura 11 são apresentados os perfis cromatográficos da curva-padrão de colesterol. O limite mínimo de detecção foi equivalente ao dobro do ruído de fundo, o que conferiu uma elevada sensibilidade ao método. A equação 2 representa o ajuste do modelo de regressão linear aos dados de área sob os picos e a concentração de colesterol para o método CLAE; verifica-se elevado coeficiente de correlação.

$$\text{COLESTEROL} = 1,23 \times 10^{-5} \text{Área}(mV) - 0,0026 \quad R^2 = 0,998 \quad (\text{eq. 2})$$

em que **COLESTEROL** é a concentração de colesterol (mg/mL) na amostra e **Área(mV)** é a resposta do detector.

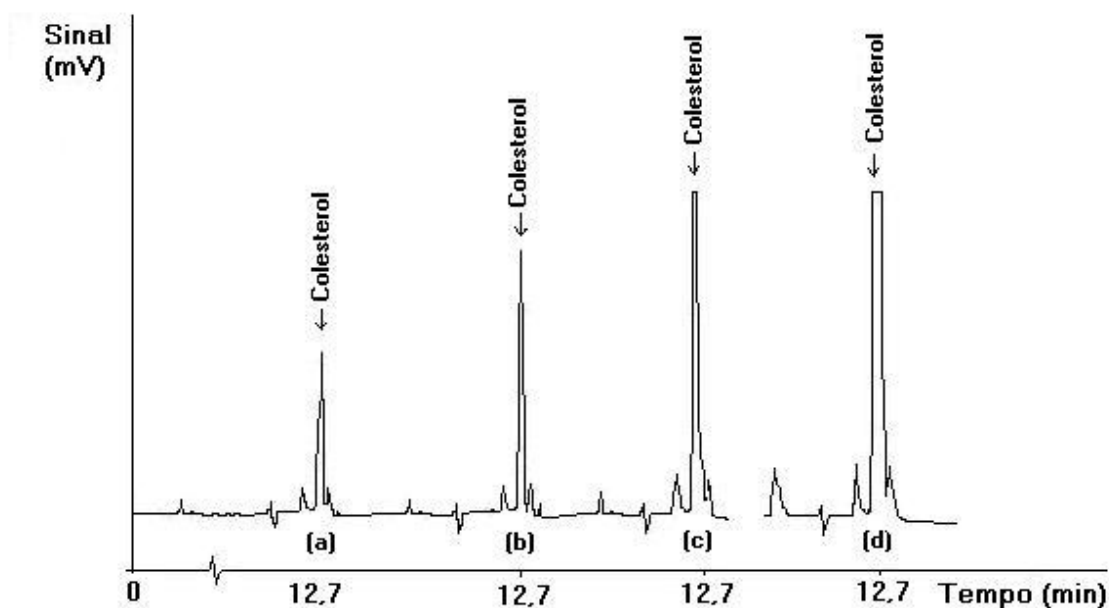


Figura 11 – Cromatogramas (CLAE-FR) da curva-padrão de colesterol. Coluna Hypersil ODS (HP); fase móvel acetoneitrila:isopropanol (80:20); vazão de 1,0 mL/min e detecção a 210 nm com atenuação 0,5 (a) 0,03 mg/mL; (b) 0,14 mg/mL; (c) 0,28 mg/mL; e (d) 0,5 mg/mL.

A concentração inicial foi de $275 \text{ mg} \pm 8 \text{ mg}$ de colesterol em 100 g de óleo. O tempo de retenção do colesterol, conforme condições descritas em 3.6.3, foi de 12,7 min.

Nestas condições, obteve-se resposta linear na faixa compreendida entre 20 mg e 450 mg de colesterol em 100 g de óleo, que são valores compatíveis com os reportados por ARNETH e AL-AHMAD (1995), MANZI et al. (1996) e CARERI et al. (2001).

CARERI et al. (2001) e MOGHADASIAN (2000), ao afirmarem que fitosteróis compõem significativamente a fração insaponificável de alguns lipídios, induziram-nos em avaliar se a presença desses esteróis carregados nos farelos empregados experimentalmente poderia afetar a interpretação dos valores para colesterol.

Na Figura 12 é mostrado o cromatograma obtido por CLAE-FR da análise de uma mistura padrão de Stigmasterol, B-Sitosterol, Campesterol e Colesterol. Verifica-se que, nas condições de análise do colesterol, ocorreu perfeita separação deste dos fitosteróis.

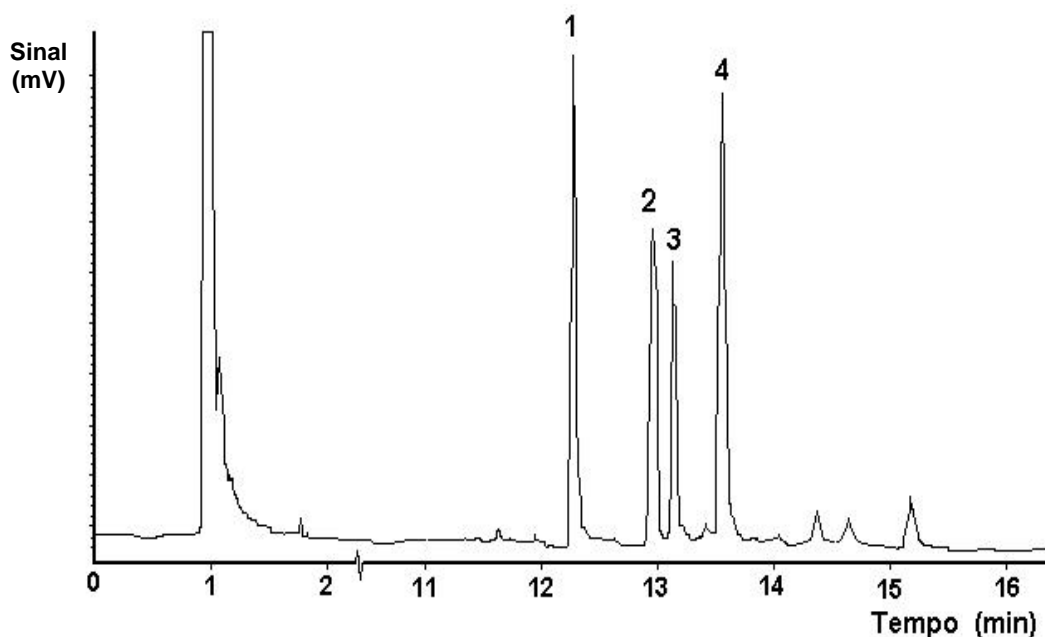


Figura 12 – Cromatograma (CLAE-FR) da fração insaponificável do óleo de manteiga adicionado dos fitosteróis campesterol (2), stigmaterol (3) e β -sitosterol (4); colesterol (1). Coluna Hypersil ODS (HP); fase móvel acetonitrila:isopropanol (80:20); vazão de 1,0 mL/min e detecção a 210 nm com atenuação 0,5.

Assim, empregando-se essas metodologias, criou-se a possibilidade de investigar a ocorrência de fitosteróis, associados ao óleo de manteiga, quando este for submetido aos tratamentos com farelos.

4.1.3. Análise do colesterol e de fitosteróis por cromatografia de fase gasosa (CG)

A Figura 13 mostra o cromatograma da fração insaponificável do óleo. Observa-se que, nesta fração, na região de saída do colesterol da coluna, praticamente não se evidencia a presença de outros compostos além do colesterol o que facilitou a verificação posterior da presença de fitosteróis.

A equação 3 representa o ajuste do modelo de regressão linear aos dados de área sob os picos e a concentração de colesterol; verifica-se elevado coeficiente de correlação.

$$\text{COLESTEROL} = 2,07 \times 10^{-6} \text{Área}(mV) - 0,0004, \quad R^2 = 0,998 \quad (\text{eq. 3})$$

em que **COLESTEROL** é a concentração de colesterol (mg/mL) na amostra e **Área(mV)** é a resposta do detector.

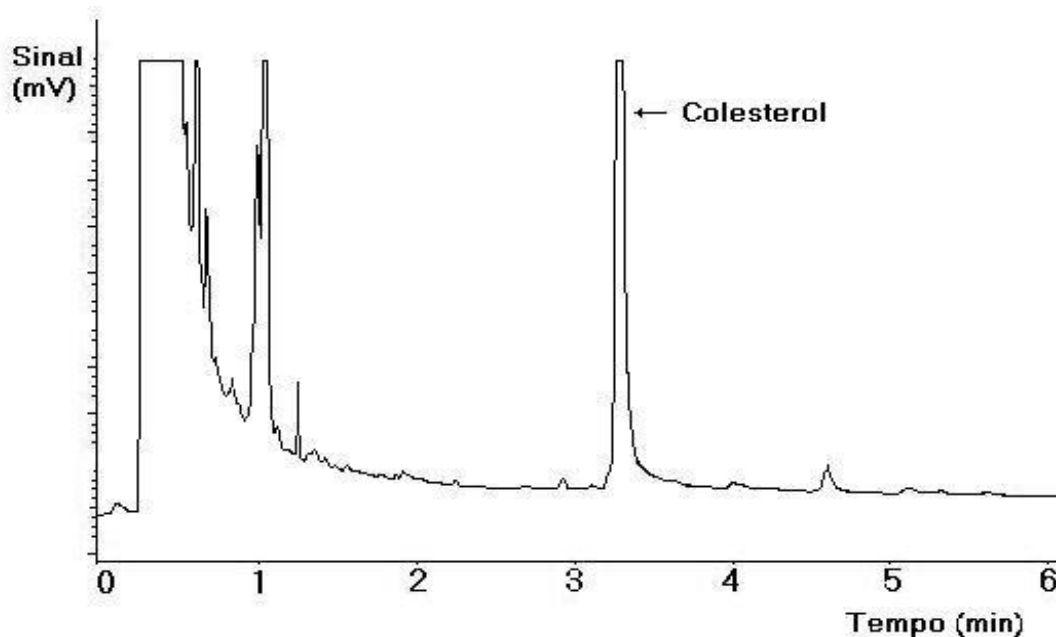


Figura 13 – Cromatograma (CG) da fração insaponificável do óleo de manteiga. Cromatógrafo HP 5890, coluna CP-TAP CB (CHROMPACK), detector de ionização de chama; hidrogênio como gás de arraste a 15 lb.pol². A temperatura da coluna foi programada para 280 °C. O injetor e o detector foram mantidos a 360 °C e 370 °C, respectivamente.

O método oficial nº 967.18 da AOAC (AOAC, 1998), preconiza a utilização de CG para determinação de β -sitosterol em óleo de manteiga (*Butter Oil*), como alternativa para detecção de fraude. Entretanto, neste método, a etapa de preparo de amostra é bastante trabalhosa, requer derivatização dos esteróis, além de proporcionar somente a determinação de um dos possíveis fitosteróis que poderiam estar presentes no óleo de manteiga.

Contudo, os resultados obtidos pela técnica adotada neste trabalho demonstraram ser possível a perfeita separação dos fitosteróis e do colesterol como pode ser observado na Figura 14.

A saída de todos os compostos presentes na amostra, com excelente resolução entre os picos, deu-se em pouco mais de 6 min, fato que confere rapidez ao método.

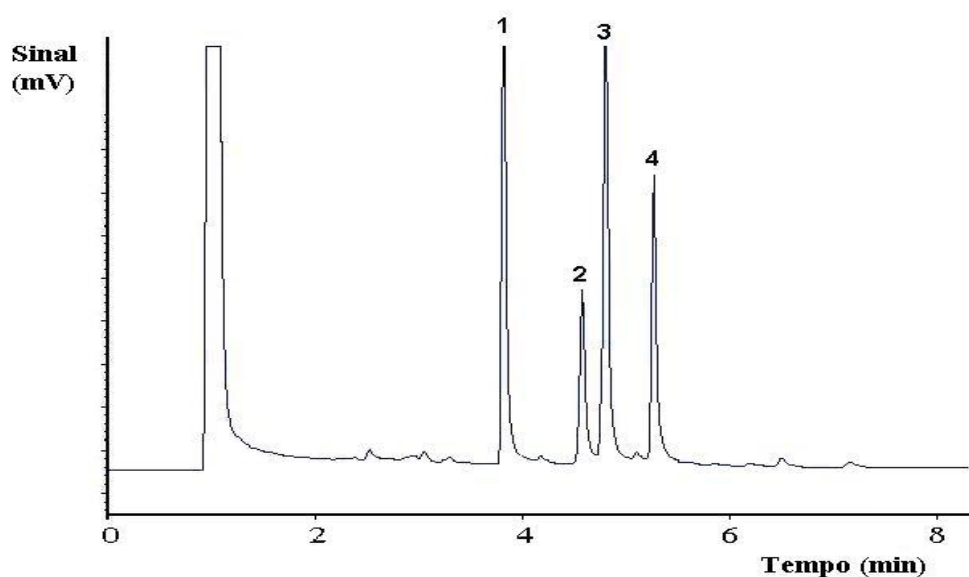


Figura 14 – Cromatograma (CG) da fração insaponificável do óleo de manteiga adicionado dos fitosteróis campesterol (2), stigmasterol (3) e β -sitosterol (4); colesterol (1). Cromatógrafo HP 5890, coluna CP-TAP CB (CHROMPACK), detector de ionização de chama; hidrogênio como gás de arraste a 15 lb.pol⁻². A temperatura da coluna foi programada para 280 °C. O injetor e o detector foram mantidos a 360 °C e 370 °C, respectivamente.

Os resultados obtidos para o índice de recuperação do colesterol, calculados através da equação 3 e mostrados no Quadro 6, evidenciam índices de recuperação próximos a 100%, com baixos desvios-padrão, demonstrando haver boas exatidão e precisão. Estes resultados transmitem confiabilidade na determinação de colesterol, dentro da faixa de concentração estudada.

Houve variação nos índices de recuperação determinados para cada fitosterol, distintamente (Quadro 6). A maior variação observada foi com o stigmasterol, seguido pelo β -sitosterol e pelo campesterol. Contudo, os valores encontrados se situam numa faixa aceitável, mesmo quando houve a adição de quantidades que provavelmente não estariam presentes em amostras de óleo de manteiga adulteradas.

Quadro 6 – Quantidade de colesterol e de fitosteróis no óleo de manteiga e índices de recuperação determinados na fração insaponificável

Esterol	Valor original (mg/100g)	Esterol adicionado (mg/100g)	Valor encontrado (mg/100 g)	Índice de recuperação (%)
Colesterol ⁽¹⁾	247,3 ± 5,0	-	-	-
Colesterol ⁽²⁾	247,3 ± 5,0	50,0	310,1 ± 9,7	104,4 ± 1,0
Colesterol ⁽³⁾	247,3 ± 5,0	100,0	330,6 ± 9,6	95,3 ± 0,8
Stigmasterol	0	50,0	44,4 ± 1,6	88,8 ± 7,2
	0	100,0	105,6 ± 3,8	105,6 ± 3,6
	0	150,0	143,9 ± 5,3	95,9 ± 2,5
β-sitosterol	0	50,0	47,1 ± 3,0	94,1 ± 12,6
	0	100,0	96,9 ± 3,6	96,9 ± 3,7
	0	150,0	158,4 ± 3,4	105,6 ± 1,4
Campesterol	0	50,0	52,6 ± 2,6	105,1 ± 9,8
	0	100,0	92,9 ± 3,9	92,9 ± 4,2
	0	150,0	145,5 ± 3,3	97,0 ± 1,5

(1) amostra de óleo de manteiga original (controle)

(2) amostra de óleo de manteiga original adicionada de 50, mg de colesterol por 100 g de óleo.

(3) amostra de óleo de manteiga original adicionada de 100 mg de colesterol por 100 g de óleo.

* Valores médios de triplicatas.

4.1.4. Seleção da técnica analítica para quantificação do colesterol em óleo de manteiga

Em testes preliminares, as magnitudes das concentrações de fitosteróis detectadas não excederam níveis traço, de tal forma que não houve comprometimento das determinações quantitativas de colesterol. Em função destes dados, embora a análise de colesterol por espectrometria (item 3.6.4.) não possibilite que se quantifique os fitosteróis separadamente do colesterol, para os ensaios executados neste trabalho, essa técnica poderia ter sido empregada para quantificação do colesterol total, com suficiente sensibilidade e isenta de interferências falso-positivos.

Após esses ensaios, para emprego neste experimento, elegeu-se a Cromatografia de fase Gasosa como técnica para análise do colesterol no óleo

de manteiga, pelos seguintes motivos: disponibilidade do equipamento e da coluna CP-TAP (ChromPack); excelente índice de recuperação do colesterol; excelente sensibilidade; ótima resolução entre os picos do colesterol e dos fitosteróis, e baixo tempo de análise (aproximadamente 5 min por amostra).

4.2. Teores de β -glucano nos farelos de aveia, trigo e soja

No Quadro 7 estão relacionados os teores de β -glucano, que foram determinados segundo a técnica descrita no item 3.8.

Quadro 7 – Teores médios de β -glucano nos farelos de aveia, trigo e soja

Tipo de Farelo	Granulometria (mm)	% de β -Glucano (em peso) ^A
TRIGO A	G1	4,6
	G2	4,1
TRIGO B	G1	3,2
	G2	2,0
AVEIA C	G1	6,8
	G2	5,3
AVEIA D	G1	6,0
	G2	5,8
SOJA E	G1	1,6
	G2	0,2

^A Média de duas determinações

Nos experimentos desenvolvidos neste trabalho fez-se uso dos farelos que apresentaram maiores porcentuais de redução de colesterol, determinados em ensaios preliminares. Coincidentemente, esses farelos selecionados foram aqueles que apresentaram os maiores teores de β -glucano, ou seja, farelo de trigo A e farelo de aveia C.

O conteúdo de fibra dietética, encontrado nos farelos de aveia e expresso como β -glucano parcialmente purificado (WESTERLUND et al., 1993), corresponde aos teores médios determinados por CLAYE et al. (1996), JOHANSSON et al. (2000), FOX (2001) e WU e DOEHLERT (2002). As

concentrações de β -glucano determinadas nos farelos de trigo foram equivalentes aos valores encontrados por KAHLON e CHOW (2000), JENKINS et al. (1998) e por CLAYE et al. (1996).

Embora as concentrações médias de β -glucano encontradas nos farelos analisados sejam estreitamente correspondentes com os dados encontrados na literatura, há que se considerar a possibilidade de encontrar-se grande variação nesses valores médios em função da efetividade dos processos de moagem e classificação evidenciados pelos métodos comerciais de obtenção desses farelos (SAULNIER et al., 1994; WOOD e BEER, 1998). Segundo WOOD e BEER (1998), além dos fatores inerentes a cada processo de moagem, a variedade agrônômica e os efeitos de ambiente também poderiam influenciar o conteúdo final de β -glucano.

WU e DOEHLERT (2002), ao estudarem maneiras de promover o enriquecimento de farelo de aveia com β -glucano verificaram que, durante o processamento desse farelo, efeitos como velocidade de moagem, classificação granulométrica e velocidade do ar, geravam diversos teores de β -Glucano nas frações analisadas.

Portanto, conforme anteriormente observado por FOX (2001), prevê-se que poderão ser observadas variações nos resultados, para cada tipo de farelo.

4.3. Curvas de redução do colesterol

Os resultados das interações entre o colesterol do óleo de manteiga e os farelos de trigo, aveia e soja foram expressos como curvas de redução. Na determinação do teor de colesterol utilizou-se a técnica de Cromatografia em Fase Gasosa, por esta técnica permitir excelente separação entre o colesterol e os fitosteróis, e por demandar menor tempo de análise em relação a CLAE.

4.3.1. Efeito da temperatura

Nas Figuras 15, 16 e 17 são mostradas as curvas de redução do teor de colesterol, em função do teor de água, para os farelos de trigo e de soja, nas granulometrias G1 e G2, respectivamente, colocando-se em evidência o efeito de temperatura.

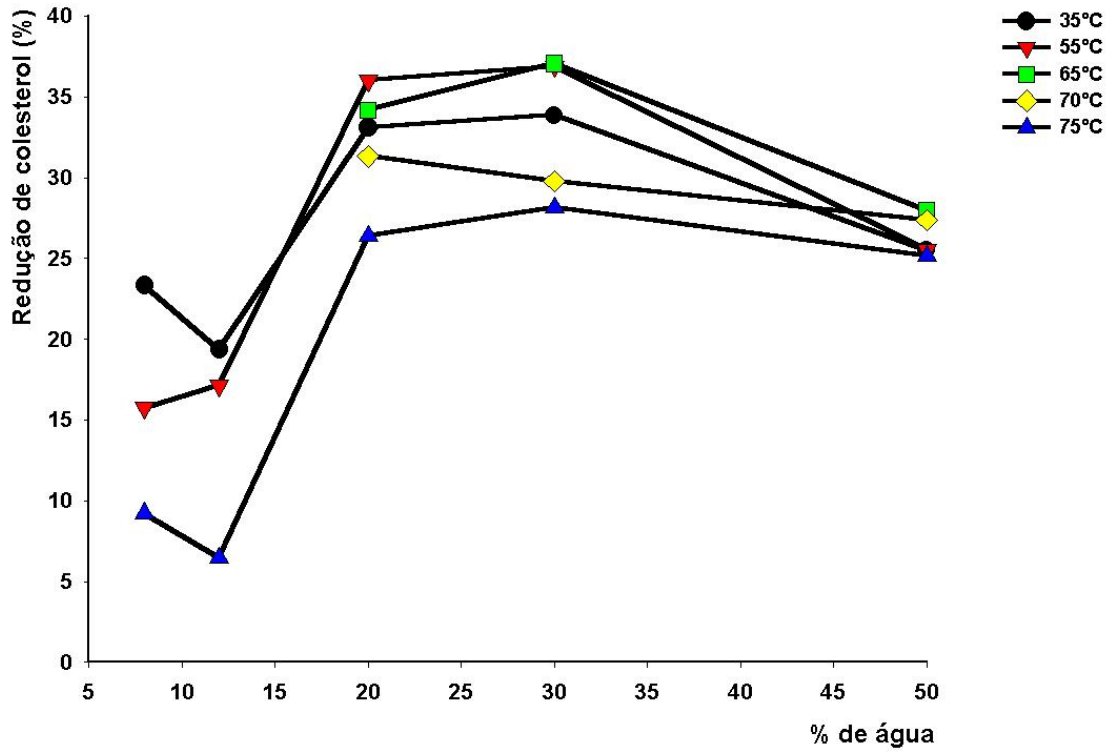


Figura 15 – Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de trigo, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura.

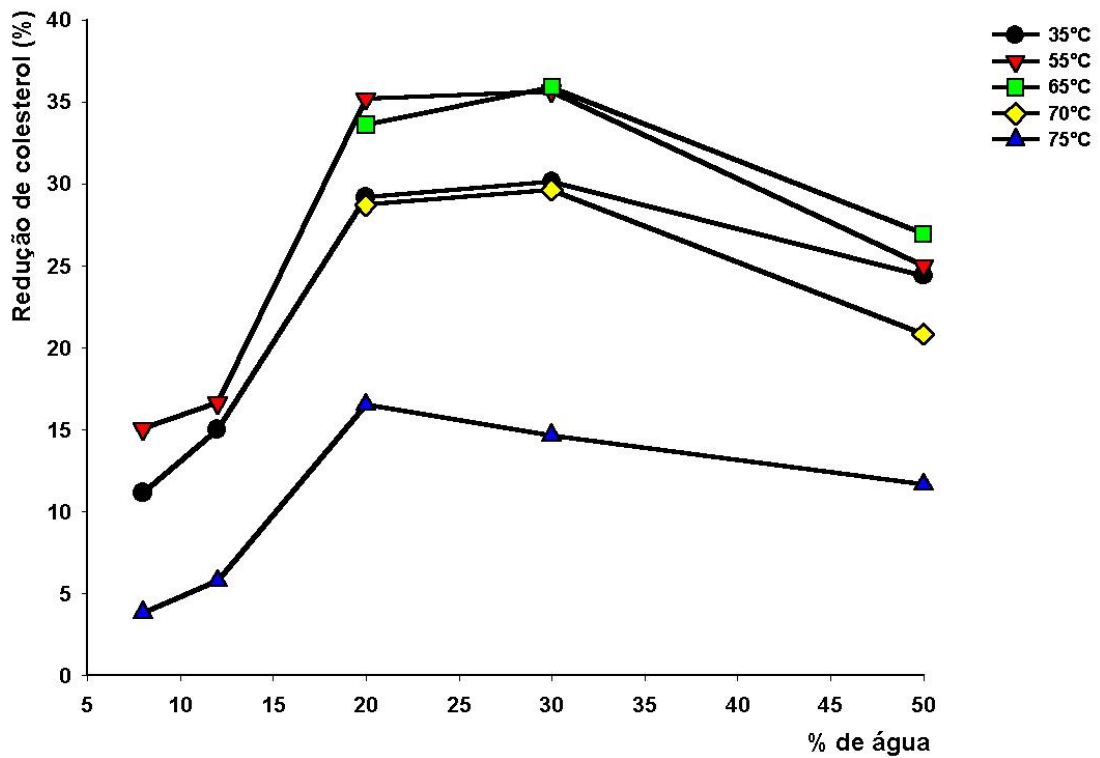


Figura 16 – Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de trigo, granulometria G2, em função do teor de água e da temperatura.

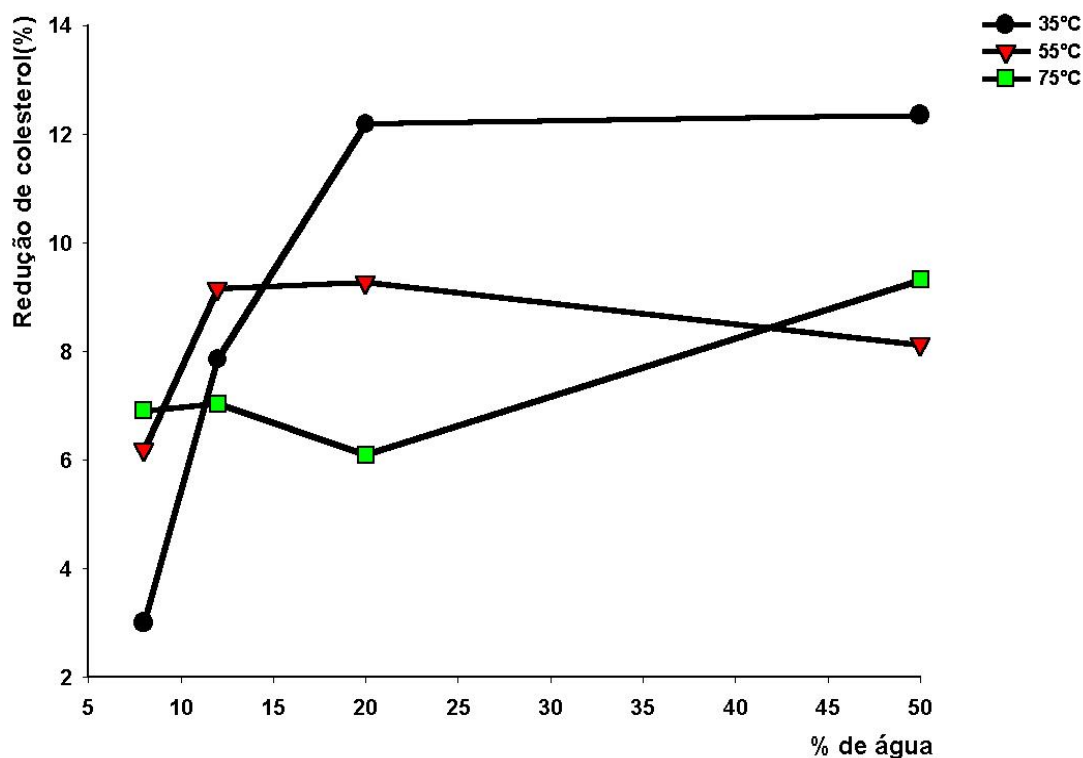


Figura 17 – Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de soja, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura.

Pode-se observar nas Figuras 15 e 16 que, tanto nos tratamentos com granulometria G1, quanto para aqueles com farelo de trigo de granulometria G2, a elevação da temperatura até 65 °C, provocou um aumento na quantidade de colesterol removido do óleo de manteiga. A partir dessa temperatura, verificou-se um decréscimo no efeito redutor de colesterol.

No caso do farelo de soja, observando-se a Figura 17 é possível verificar-se que a elevação da temperatura acima de 35 °C prejudicou a redução de colesterol do óleo de manteiga.

Segundo WANG et al. (2001), as moléculas de β -glucano, ao serem hidratadas, formam redes infinitas de géis termorreversíveis. Caso o fenômeno de interação entre o β -glucano e o colesterol seja o de formação de matriz gélica, com conseqüente “aprisionamento” da molécula de colesterol, como citado por MAKI et al. (1999) e KALRA e JOOD (2000), pode-se supor que a elevação da temperatura acima de 65 °C, para o farelo de trigo, e acima de 35 °C, para o farelo de soja reverteu a estrutura gélica previamente formada,

resultando em conseqüente liberação do colesterol desta para o óleo. HUTH et al. (2000), ao estudarem as propriedades funcionais de dietas à base de fibras extrusadas de cevada, verificaram que a viscosidade de soluções gélicas formadas a partir de β -glucano decrescia de maneira diretamente proporcional ao aumento da temperatura.

Nas Figuras 18 e 19 são mostradas as curvas de redução do teor de colesterol, em função do teor de água, para o farelo de aveia, nas granulometrias G1 e G2, respectivamente, colocando-se em evidência o efeito de temperatura

Nessas figuras, observa-se que nos tratamentos com farelos de aveia, em ambas granulometrias, o aumento da temperatura, até 75 °C, provocou incrementos na redução de colesterol do óleo de manteiga. O decréscimo no efeito redutor de colesterol, verificado a partir da elevação dessa temperatura, pode ser justificado pelo fato de que os géis formados a partir de moléculas de β -glucano hidratadas são termorreversíveis, hipótese confirmada por WANG et al. (2001). Para explicar porque a temperatura de termorreversão situou-se em torno de 75 °C, ligeiramente acima da temperatura de 65 °C verificada nos ensaios com farelo de trigo, pode-se discutir que este efeito esteja relacionado com a maior concentração de β -glucano encontrada no farelo de aveia, ou com as características estruturais do tipo de β -glucano presente nesse cereal. Como dentre os farelos utilizados neste experimento o farelo de aveia foi o que apresentou maior teor de β -glucano, pode-se inferir que, com este farelo há tendência de formação de géis reologicamente mais rígidos, visto que, quando em solução, há direta correlação entre a concentração de β -glucano e a viscosidade dessa solução, tal como reportado por BÖHN (1999a) e HUTH et al. (2000).

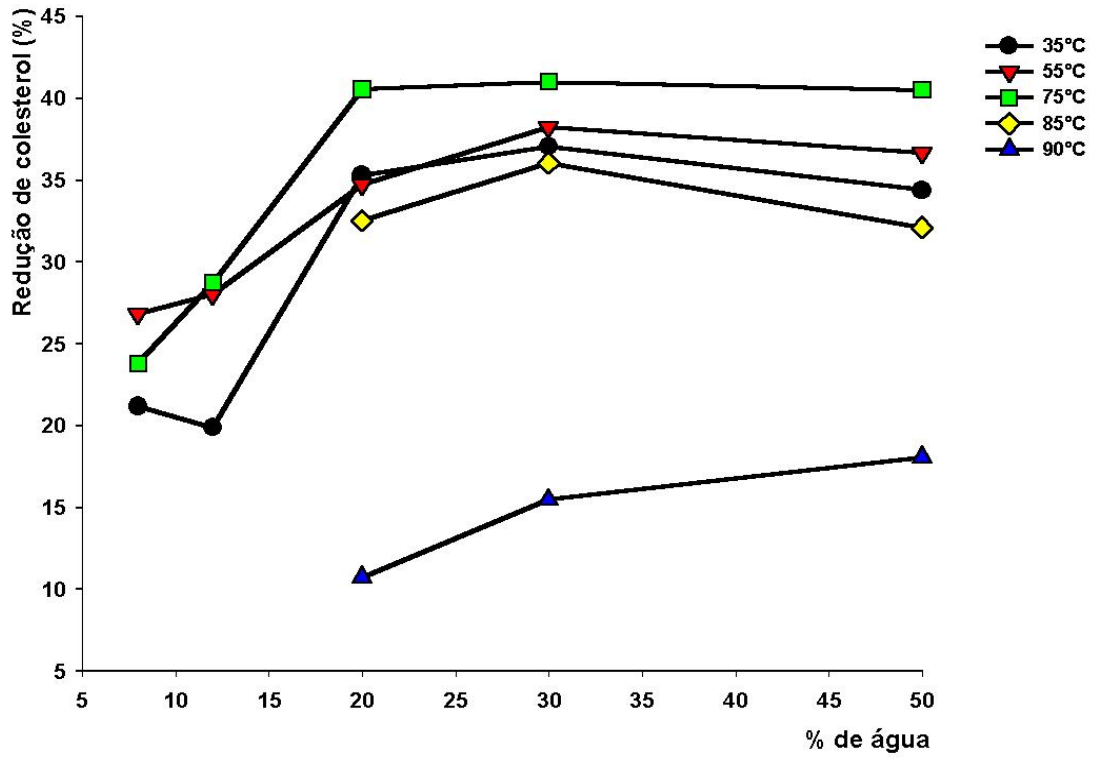


Figura 18 – Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de aveia, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura.

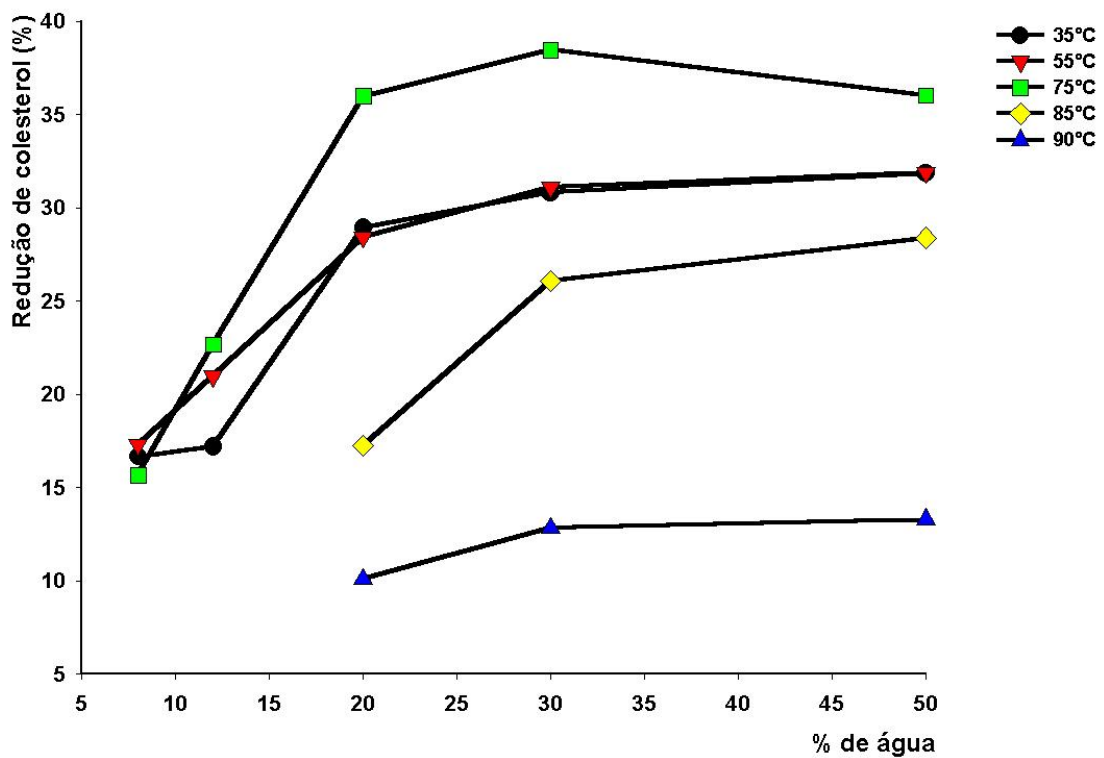


Figura 19 – Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de aveia, granulometria G2, em função do teor de água e da temperatura.

4.3.2. Efeito do teor de água

Nas Figuras 20 e 21 são mostradas as curvas de redução do teor de colesterol, em função da temperatura, para o farelo de trigo, nas granulometrias G1 e G2, respectivamente, colocando-se em evidência o efeito da quantidade de água adicionada.

Nas Figuras 22 e 23 são mostradas as curvas de redução do teor de colesterol, em função da temperatura, para o farelo de aveia, nas granulometrias G1 e G2, respectivamente, colocando-se em evidência o efeito da quantidade de água adicionada.

Na Figura 24 são mostradas as curvas de redução do teor de colesterol, em função da temperatura, para o farelo de soja, na granulometria G1, colocando-se em evidência o efeito da quantidade de água adicionada.

Nas Figuras 20 a 24, verifica-se que a incorporação de água até o limite de 30% ao complexo óleo de manteiga:farelo, em níveis crescentes, proporcionou elevação na porcentagem de redução de colesterol do óleo de manteiga.

KAHLON et al. (1993 e 1998), MAKI et al. (1999), KALRA e JOOD (2000) e MÄLKKI e VIRTANEN (2001), ao pesquisarem modelos experimentais *in vivo*, afirmaram que um dos efeitos das fibras alimentares, quando hidratadas, é o de formarem géis viscosos que contribuem na redução do colesterol sanguíneo. Portanto, pode-se inferir que a presença de água foi de particular importância neste proposto complexo experimental *in vitro*, ao influenciar, favoravelmente, a concepção desses géis.

O fato de ter havido ligeiro decréscimo na porcentagem de redução de colesterol, a partir da adição de 50% de água ao sistema, pode ser atribuído à diminuição da rigidez do gel formado. Conforme descrito no item 4.3.1, o β -glucano, quando em solução, forma soluções viscosas com características pseudoplásticas (géis), em concentrações acima de 2 g/L. Entretanto, a viscosidade é uma função exponencial da concentração do β -glucano dissolvido e de sua massa molar (WOOD, 2001). As massas molares típicas do β -glucano, em preparações alimentícias comerciais, situam-se entre ($6,6 \cdot 10^{-19}$ e $3,3 \cdot 10^{-18}$) g, sendo que a estrutura macromolecular dessa cadeia polissacarídica pode ser rompida por agitação mecânica ou por aquecimento. Segundo WOOD

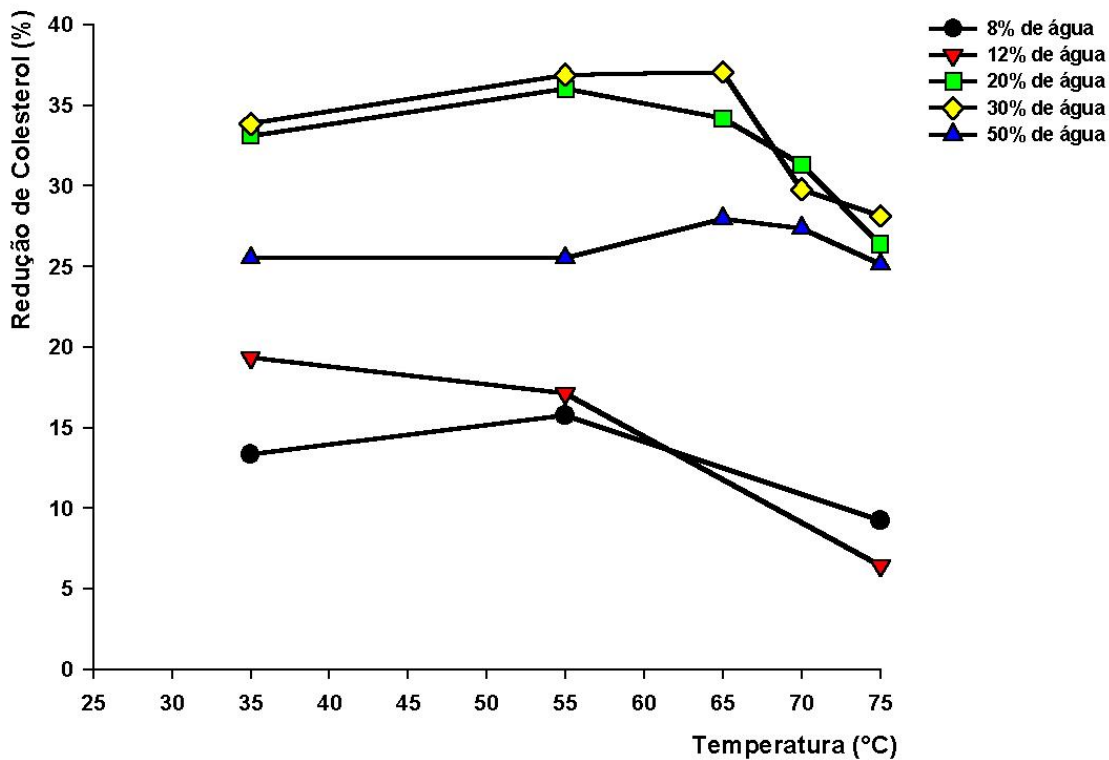


Figura 20 – Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de trigo, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura.

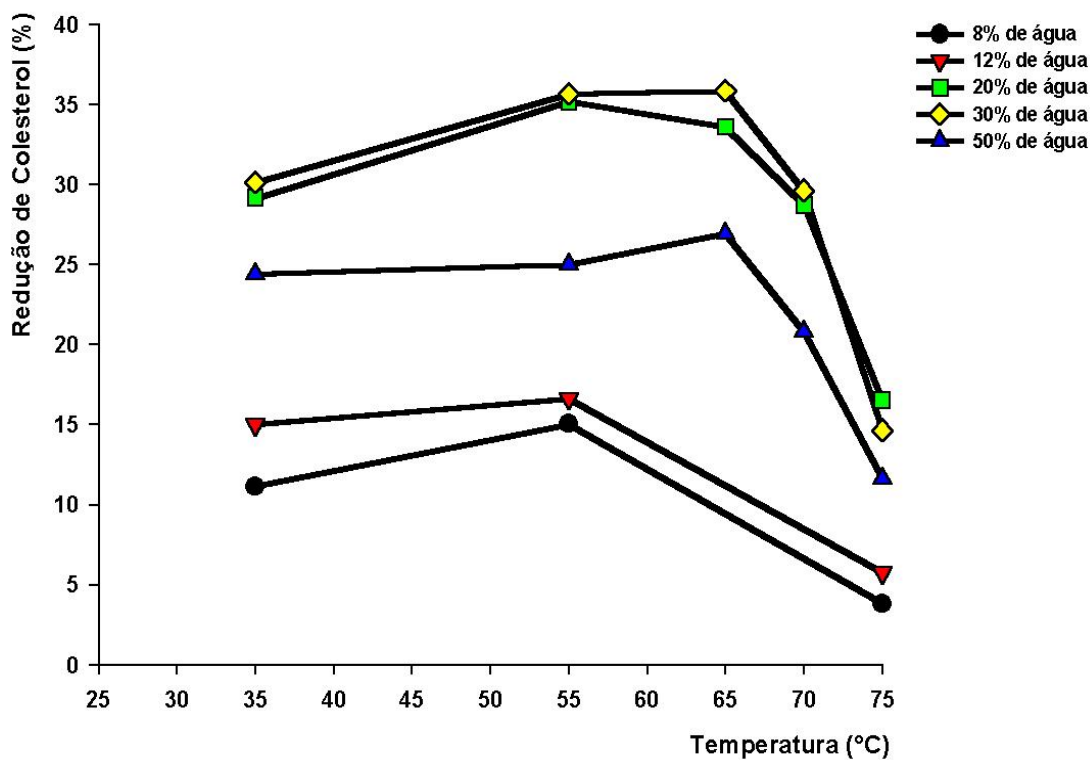


Figura 21 – Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de trigo, granulometria G2, em função do teor de água e da temperatura.

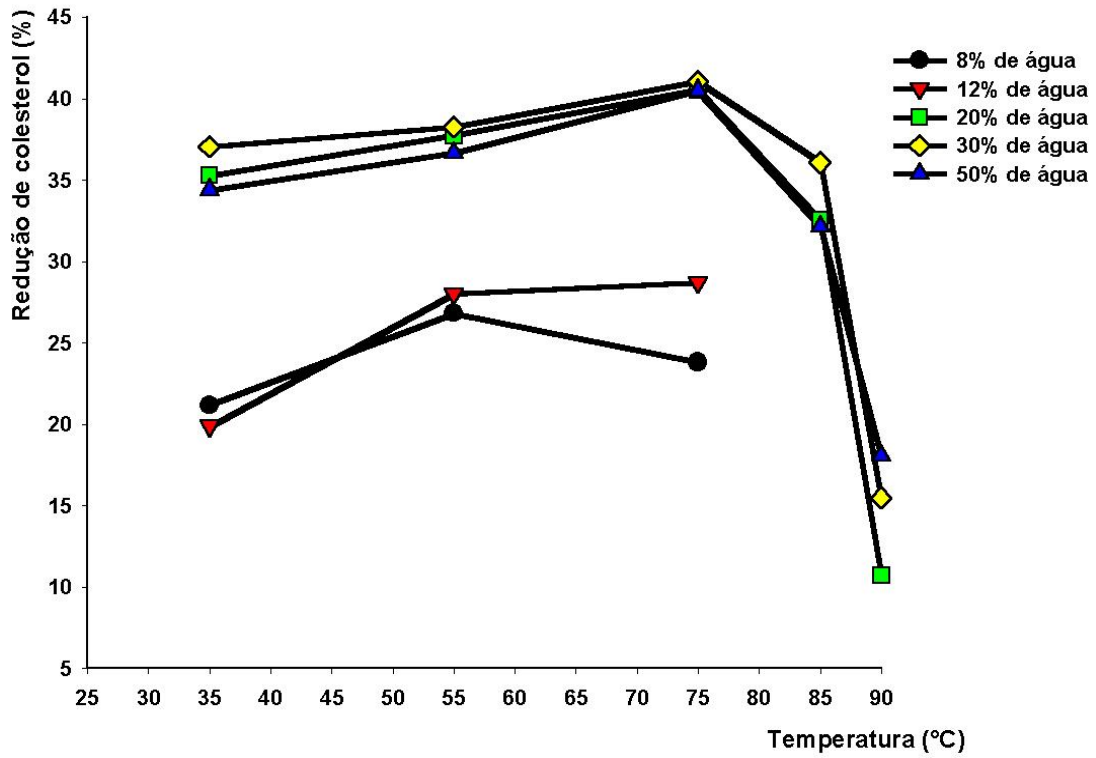


Figura 22 – Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de aveia, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura.

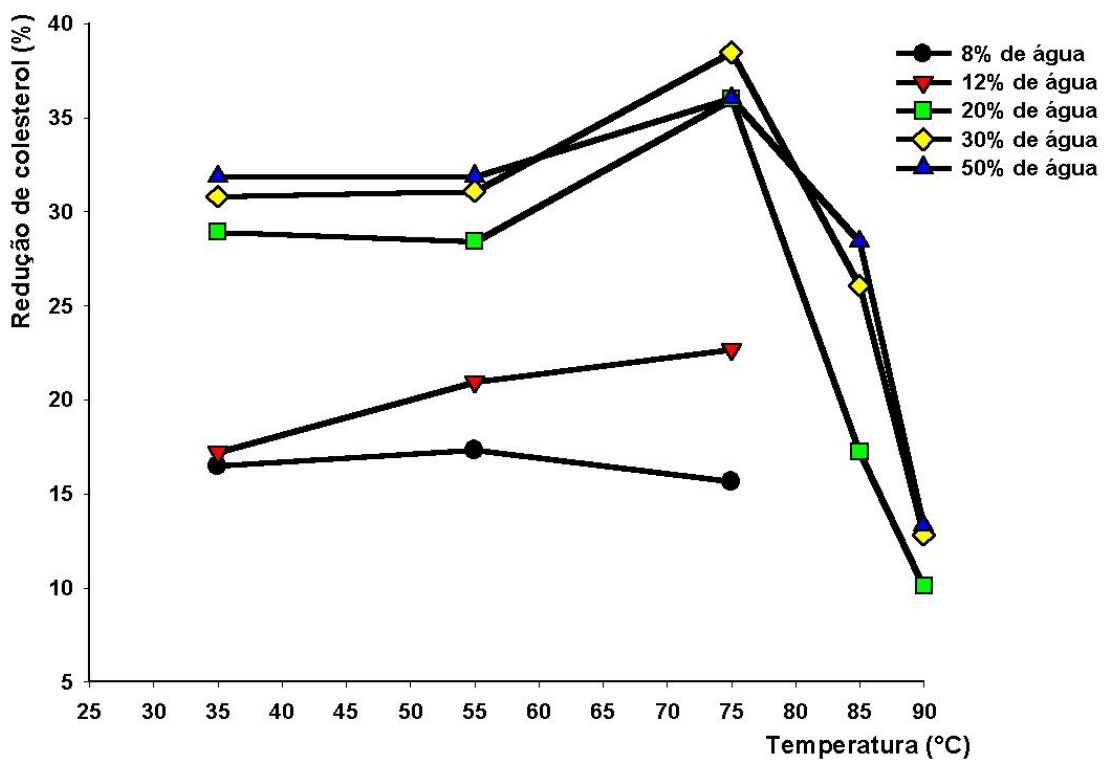


Figura 23 – Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de aveia, granulometria G2, em função do teor de água e da temperatura.

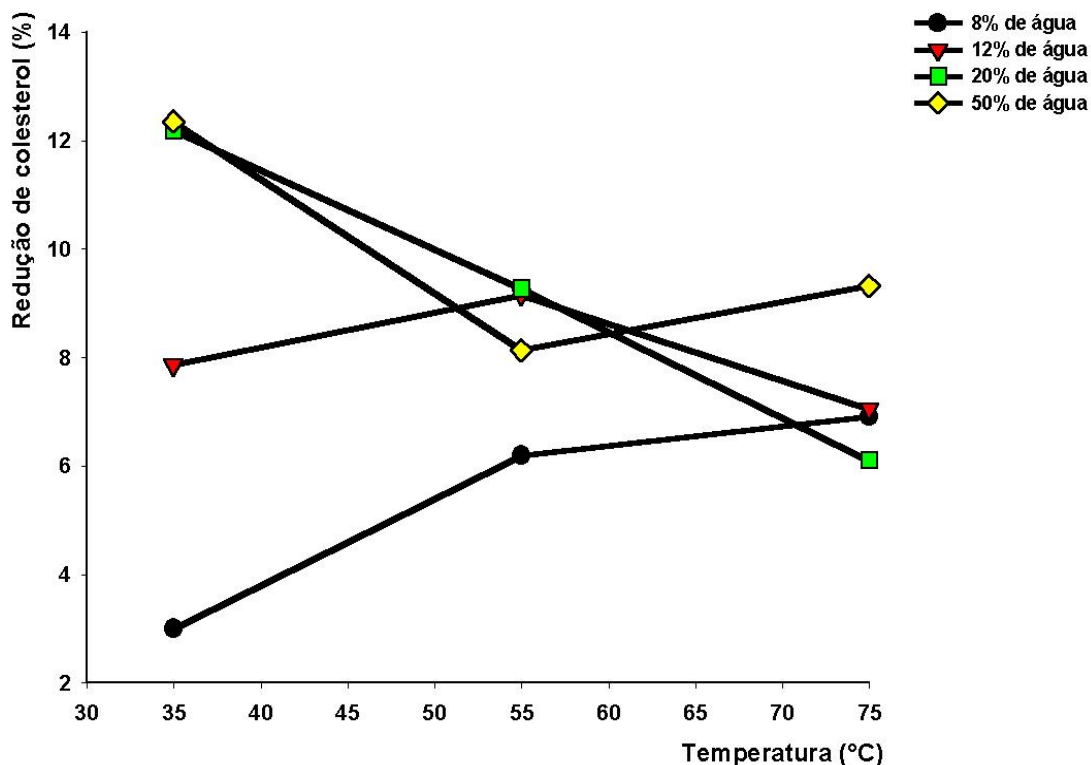


Figura 24 – Curvas de redução do teor de colesterol por farelo de soja, granulometria G1, em função do teor de água e da temperatura.

et al. (1991a) e BEER et al. (1997) essa fragmentação atua diminuindo as barreiras físicas para a penetração de água na matriz, tornando-se um fator redutor da rigidez gélida.

4.3.3. Efeito da granulometria

Nas Figuras 25 e 26 são mostrados os gráficos de redução do teor de colesterol, representando-se o efeito das granulometrias G1 e G2 dos farelos de trigo e de aveia, respectivamente.

Analisando-se as Figuras 25 e 26, pode-se verificar que, para ambos farelos, e em todos os tratamentos, o efeito do fracionamento dos farelos nas granulometrias G1 e G2 influenciou na porcentagem de redução de colesterol.

Esses resultados podem ser correlacionados com a variação na concentração de fibras solúveis nas diferentes frações dos farelos analisados. Segundo FOX (2001), MALKII e VIRTANEN (2001), BÖHN e KULICKE (1999)

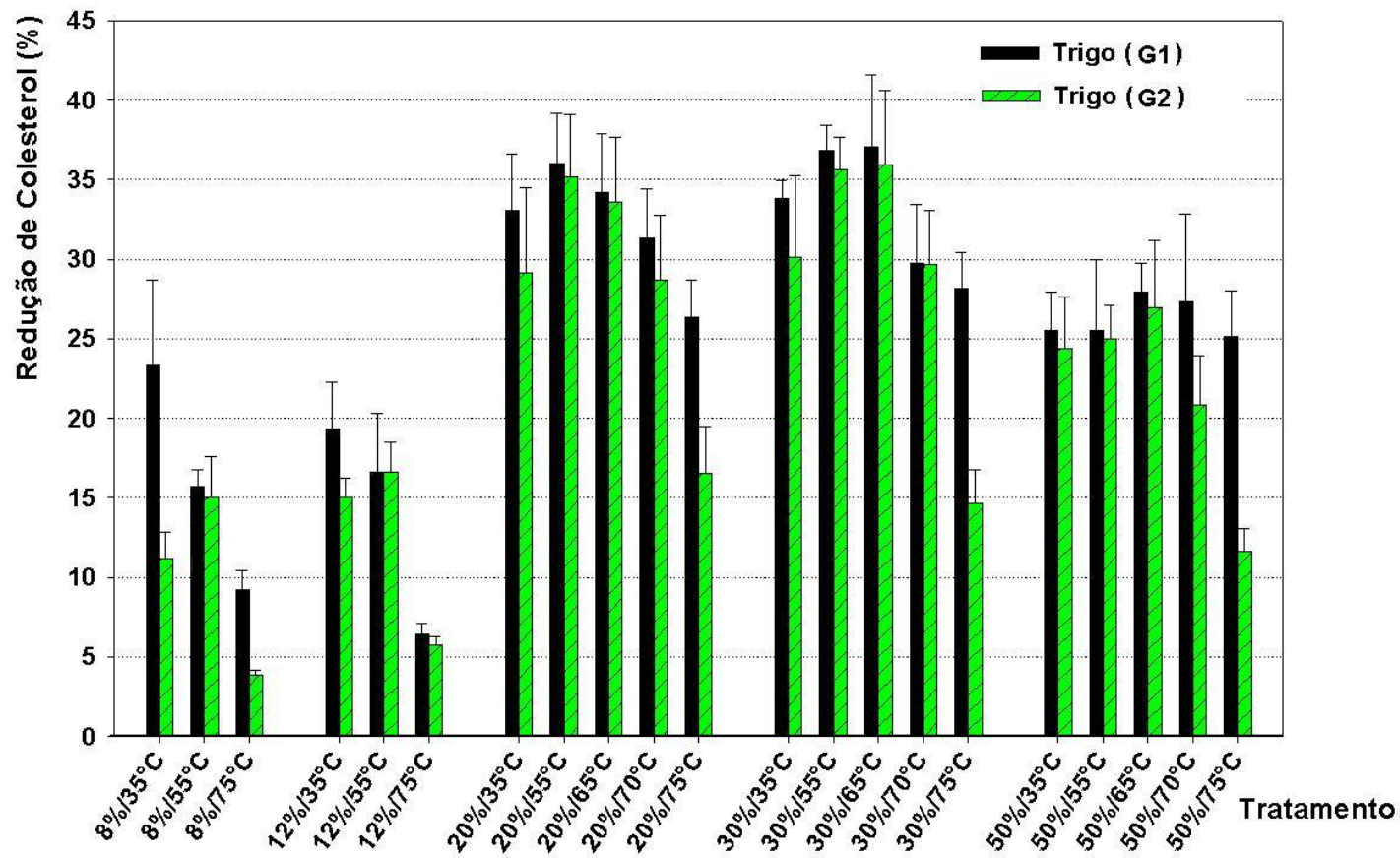


Figura 25 – Influência da granulometria do farelo de trigo na porcentagem de redução de colesterol do óleo de manteiga, em tratamentos contendo entre 8% e 50% de água e com temperaturas entre 35 °C e 75 °C. Médias e desvios-padrão de três repetições.

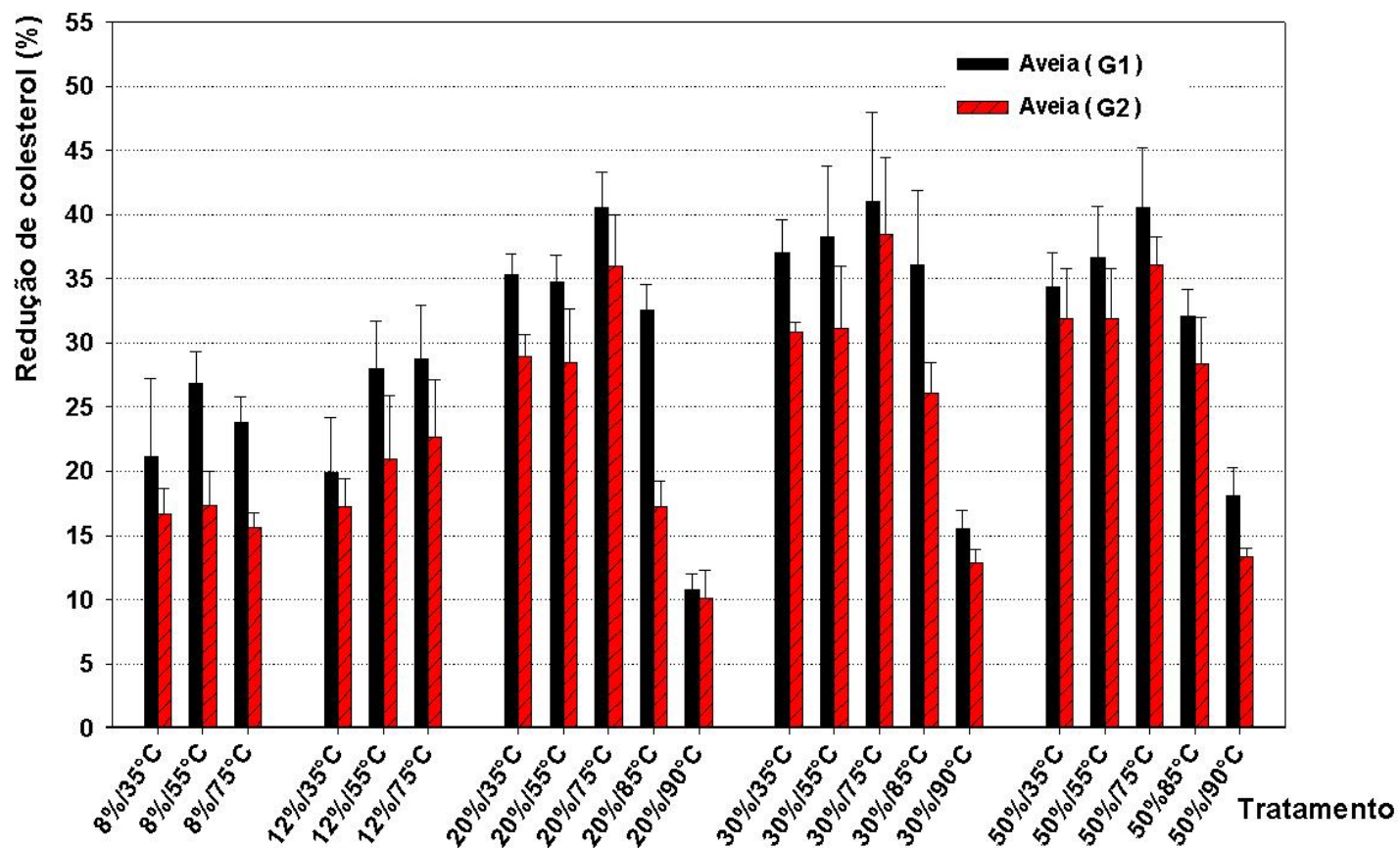


Figura 26 – Influência da granulometria do farelo de aveia na porcentagem de redução de colesterol do óleo de manteiga, em tratamentos contendo entre 8% e 50% de água e com temperaturas entre 35 °C e 90 °C. Médias e desvios-padrão de três repetições.

e MALKII e MYLLIMAKI (1998) as propriedades funcionais do β -glucano, quando em solução, estão diretamente relacionadas com a sua capacidade de aumentar a viscosidade. HUTH et al. (2000) e MALKII e VIRTANEN (2001) relataram que os processos de moagem e de extrusão hidrotérmica, quando aplicados aos farelos de aveia e de cevada, incrementam a quantidade de β -glucano extraído, bem como sua viscosidade quando em solução, face à redução do tamanho das partículas do farelo, ao mesmo tempo em que são rompidas barreiras físicas à penetração de água.

NILSSON et al. (1996), HARKONEM et al. (1997) e GLITSO e KNUDSEN (1999) conduziram experimentos visando obter fibras dietéticas com diferentes composições, a partir da moagem de grãos de centeio em diferentes granulometrias, e verificaram que a distribuição dos principais componentes de fibras dietéticas no centeio, bem como no trigo, variava com a granulometria. Observaram que o β -glucano se concentrava na fração cujo diâmetro de partícula se situava entre 0,25 mm e 1,25 mm. Trabalho similar foi empreendido por WU e DOEHLERT (2002) visando enriquecer farelo de aveia com β -glucano, por meio de moagem desse farelo em partículas finas e grossas, e subsequente classificação em peneiras sob efeito de circulação de ar. Esses autores, assim como KNUCKLES et al. (1992), verificaram que tanto em rendimento quanto em composição havia evidente tendência de que o β -glucano se concentrasse nas frações compreendidas entre 0,15 mm e 0,4 mm de diâmetro. Contudo, SUNBERG e AMAN (1994) e KIRYLUK et al. (2000) ao empreenderem essa mesma avaliação, em grãos de cevada, encontraram maiores concentrações de β -glucano, e de fibras solúveis, nas frações mais grosseiras de farinhas (diâmetros de partículas entre 0,25 mm e 0,4 mm) e no farelo remanescente (diâmetro acima de 2,0 mm).

Conforme discussão anterior, verificou-se que os farelos analisados neste experimento, quando hidratados, têm na viscosidade uma propriedade funcional intimamente relacionada com a redução de colesterol. Portanto, o maior efeito redutor de colesterol do óleo de manteiga, proporcionado pelos farelos de menor granulometria, pode ser atribuído à maior concentração de fibras solúveis, inclusive de β -glucano, nessas frações, o que, conseqüentemente, acarretou maior viscosidade do gel formado. Em recente

revisão, MÄLKKI e VIRTANEN (2001) esclareceram que embora seja de amplo conhecimento que os melhores efeitos fisiológicos advindos da ingestão de fibras solúveis estejam estreitamente correlacionados com a viscosidade, para que se assegure uma boa solubilização aquosa dessas fibras, os fatores dosagem e extração devem ser criteriosamente observados. Segundo esses autores, o que também é relatado por HUTH et al. (2000), incrementos na solubilidade de fibras seriam obtidos a partir da redução do tamanho médio do polímero de β -glucano por fracionamento mecânico.

4.4. Influência das variáveis na quantidade máxima de redução de colesterol

Os resultados encontrados nos ensaios preliminares sugeriram que a efetividade da redução de colesterol do óleo de manteiga, pelos farelos analisados, foi dependente de diversos fatores incluindo a concentração e a granulometria do farelo, a temperatura, o teor de água, o tempo de agitação e a velocidade de agitação. Os níveis dos fatores concentração de farelo, velocidade de agitação e o tempo de agitação foram fixados e as variáveis granulometria dos farelos, teor de água e temperatura de reação foram testadas ao nível de 5% de probabilidade, obtendo-se as equações ajustadas por regressão (Quadro 8).

Pela análise dos coeficientes de cada fator das equações do Quadro 10, isoladamente ou em conjunto, permitiu-se verificar que o efeito da temperatura, na capacidade dos farelos em reduzir o teor de colesterol do óleo de manteiga, foi maior que o do teor de água, naqueles tratamentos onde foram utilizados os farelos de soja, de aveia com as granulometrias G1 e G2, e de trigo na granulometria G2.

Nas Figuras 27, 28, 29, 30 e 31 estão representadas graficamente as equações do Quadro 8.

Embora não seja possível predizer que esta avaliação *in vitro* possibilite validar as diversas propriedades terapêuticas inerentes aos farelos de cereais, entre elas a de redução do colesterol sanguíneo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, pelos modelos experimentais testados, é possível obter-se em torno de 45% de redução do colesterol no óleo de manteiga (Quadro 9).

Quadro 8 – Equações resultantes do modelo de regressão. Relação entre a porcentagem de colesterol reduzido (**Z**) e as variáveis temperatura (**X**) e porcentagem de água (**Y**)

Farelo (mm)	Equação ^A	R ²	Eq. N ^o	DW ^B
Aveia (G1)	$Z = 2,1276X + 1,4702Y - 0,0185X^2 - 0,0196Y^2 - 43,1279$	0,819	4	0,83 ^{ns}
Aveia (G2)	$Z = 1,8014X + 1,4589Y - 0,0161X^2 - 0,0184Y^2 - 39,9755$	0,848	5	0,75 ^{ns}
Trigo (G1)	$Z = 1,0224X + 2,2326Y - 0,0107X^2 - 0,0332Y^2 - 22,7489$	0,888	6	2,33 ^{ns}
Trigo (G2)	$Z = 2,7896X + 2,3290Y - 0,0274X^2 - 0,0351Y^2 - 70,2095$	0,932	7	1,81 ^{ns}
Soja (G1)	$Z = 3,7850 - 0,0164X + 0,5024Y - 0,0001X^2 - 0,0069Y^2$	0,712	8	1,63 ^{ns}

A - Os coeficientes das equações foram gerados por análise dos resultados médios de três repetições.

B - Estatística Durbin-Watson. Avalia se os resíduos estão correlacionados ou aleatoriamente distribuídos.

ns = não-significativo a 5% de probabilidade.

Nos ensaios realizados, foram verificados elevados desvios-padrão entre os resultados das observações (Figuras 25 e 26). Essas variações podem ser atribuídas a diversos fatores, entre eles: o modelo utilizado foi pouco eficaz em manter a velocidade de agitação, bem como a temperatura; possíveis, e esperados, erros de amostragem e nas análises quantitativas de colesterol (CONTARINI et al., 2002). Entretanto, entendeu-se que partes das variações verificadas neste trabalho podem ocorrer devido à diversidade estrutural do β -glucano (BOHN et al., 1999; ROUBROEKS et al., 2000 e CHARALAMPOPOULOS et al., 2002) e, principalmente, porque a fração solúvel encontrada nos farelos de cereais, não se compõe somente de β -glucano (CHESSON, 1995; CHAO et al., 1998), devendo-se sempre considerar a possibilidade de interferência funcional de outros polissacarídeos solúveis presentes nos farelos (ROUBROEKS, 2000 e CHESSON, 1995).

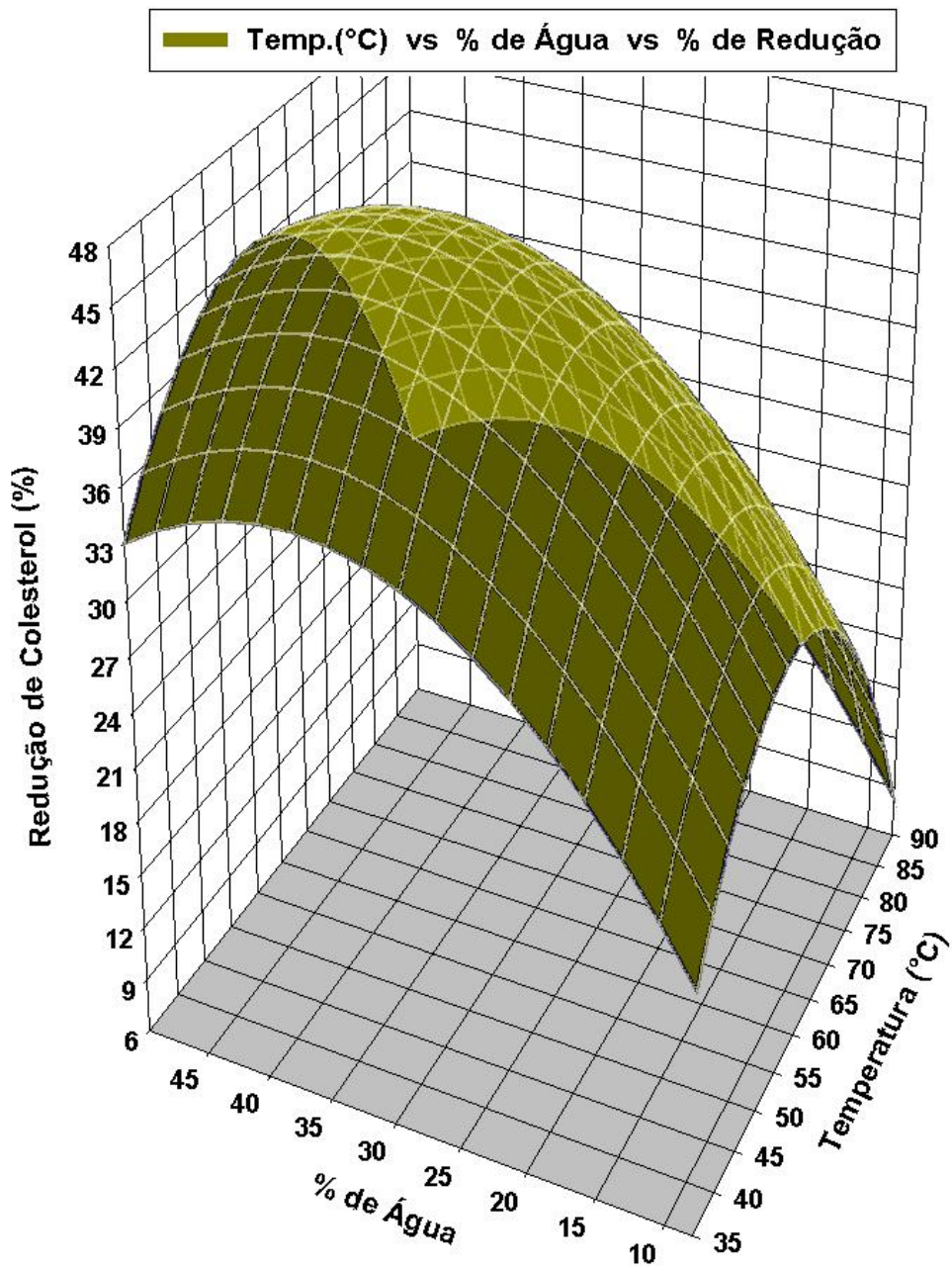


Figura 27 – Efeitos da temperatura e da porcentagem de água na redução de colesterol do óleo de manteiga tratado com 20% (p/v) de farelo de aveia (granulometria G1); equação 4.

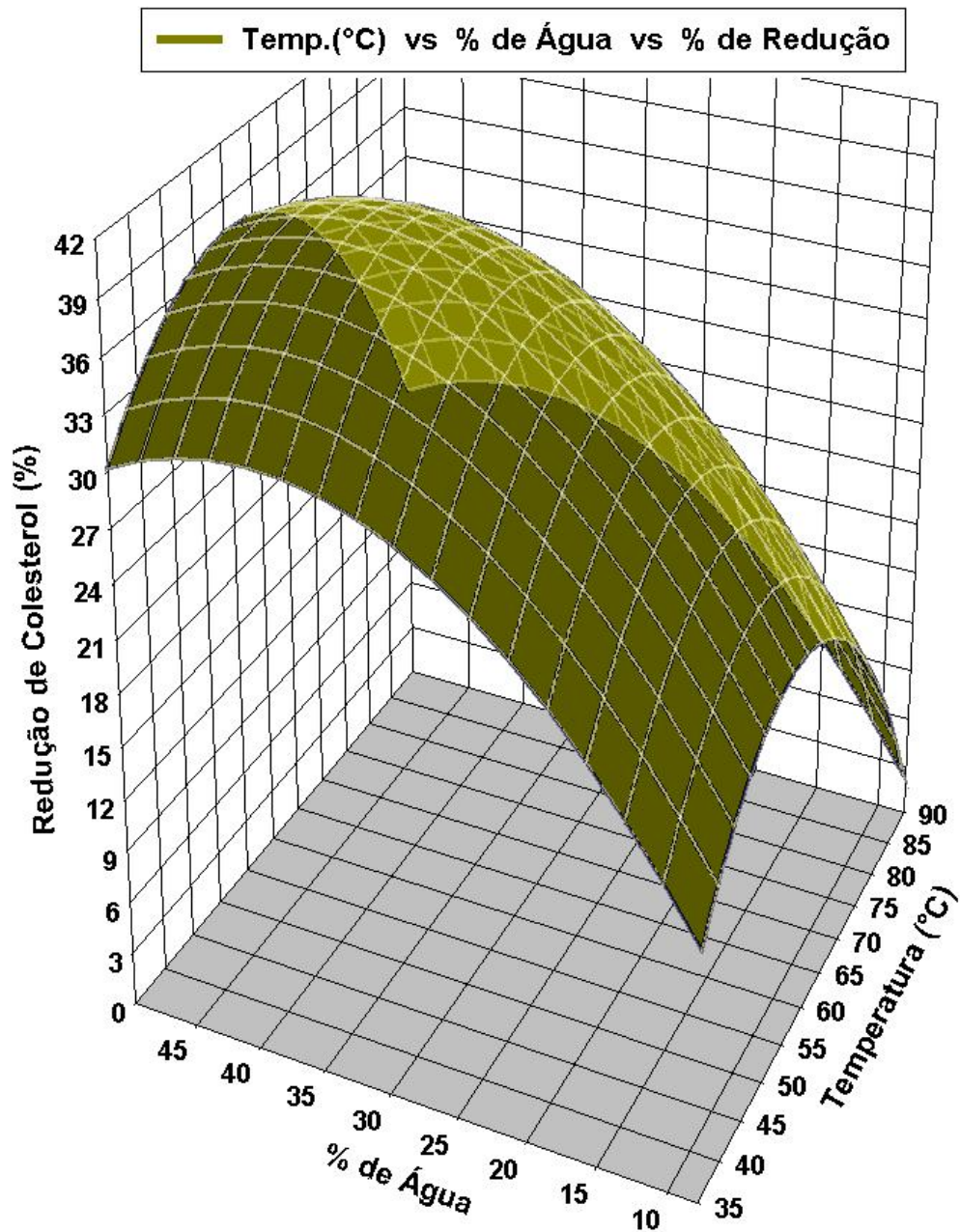


Figura 28 – Efeitos da temperatura e da porcentagem de água na redução de colesterol do óleo de manteiga tratado com 20% (p/v) de farelo de aveia (granulometria G2); equação 5.

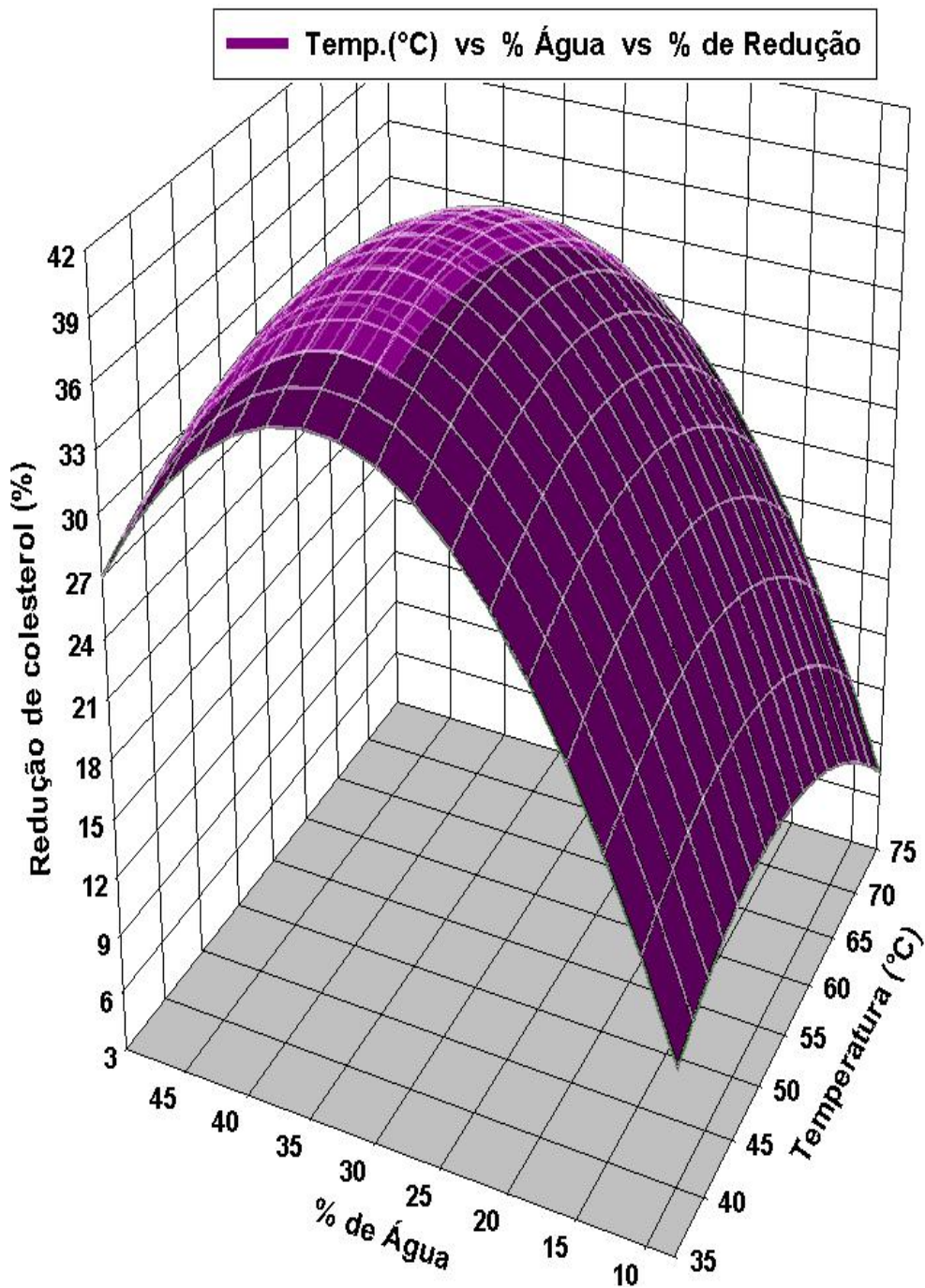


Figura 29 – Efeitos da temperatura e da porcentagem de água na redução de colesterol do óleo de manteiga tratado com 20% (p/v) de farelo de trigo (granulometria G1); equação 6.

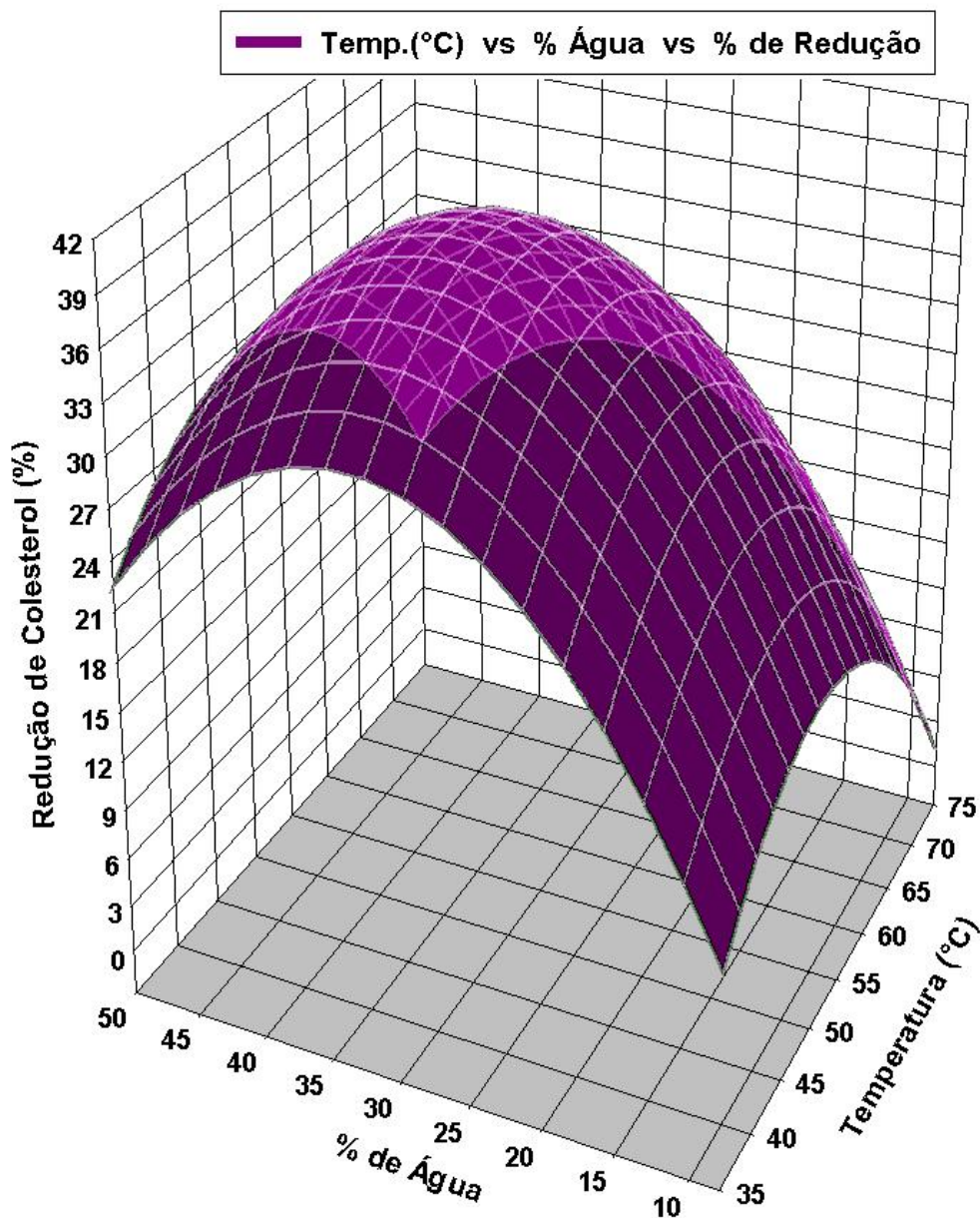


Figura 30 – Efeitos da temperatura e da porcentagem de água na redução de colesterol do óleo de manteiga tratado com 20% (p/v) de farelo de trigo (granulometria G2); equação 7.

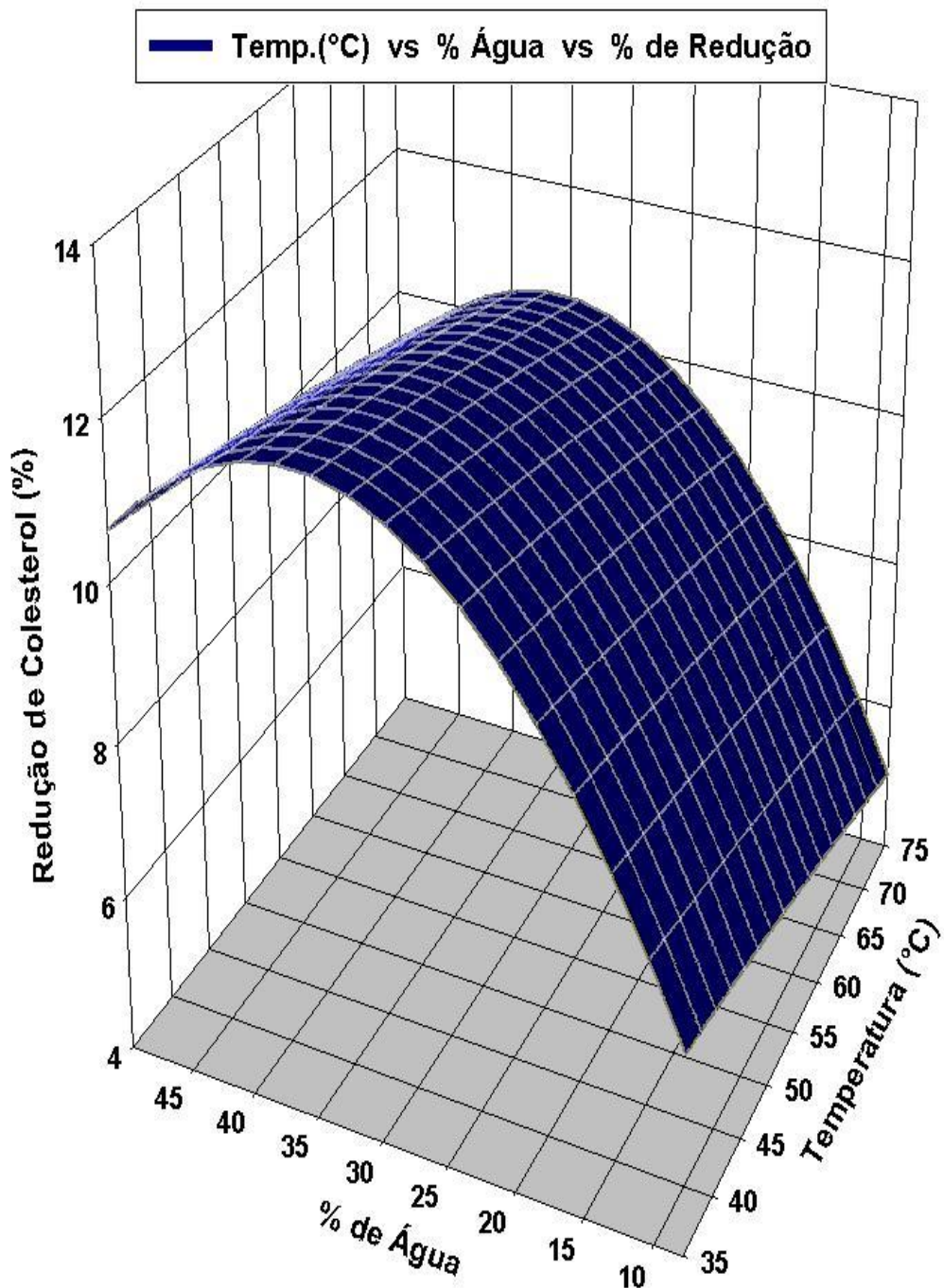


Figura 31 – Efeitos da temperatura e da porcentagem de água na redução de colesterol do óleo de manteiga tratado com 20% (p/v) de farelo de soja (granulometria G1); equação 8.

Quadro 9 – Máximos efeitos da temperatura e do percentual de água na redução de colesterol do óleo de manteiga, utilizando-se farelos de aveia, trigo e soja

Farelo (mm)	Temperatura (°C)	% de Água	Redução de Colesterol (%)	Equação	Erro-Padrão da Estimativa (p < 0,05)
Aveia (G1)	55,6	36,87	45,20	4	5,69
Aveia (G2)	55,6	39,50	39,24	5	5,10
Trigo (G1)	50,0	34,25	39,40	6	3,73
Trigo (G2)	50,0	34,25	39,21	7	4,02
Soja (G1)	35,0	36,87	12,01	8	2,29

A linearidade de resposta dos tratamentos empregados nesta pesquisa pôde ser influenciada por outros fatores, como: a perda de parte das propriedades funcionais do β -glucano devido ao tratamento térmico, à moagem e à classificação granulométrica (HUTH et al., 2000); os efeitos advindos da variação na massa molar média do β -glucano (WOOD e BEER, 1998), que também podem ter se constituído em significativa fonte de variação nos resultados obtidos, e este é um fator que isoladamente já demandaria uma avaliação reológica consistente. Segundo CHARALAMPOPOULOS et al. (2002), β -glucanos de alta massa molar (acima de 10^{18} g) são menos viscosos por formarem lábeis associações cooperativas entre cadeias. Por outro lado, segundo GOMEZ et al. (1997) e CHARALAMPOPOULOS et al. (2002), β -glucanos com pesos moleculares abaixo de 10^{22} g podem facilmente formar géis macios, face ao menor tamanho de suas cadeias, o que favorece o rearranjo destas de forma a maximizarem interligações.

Como é muito remota a possibilidade de haverem interações do tipo ligações químicas entre as moléculas de colesterol e os polissacarídeos solúveis dos farelos (BOWLES et al., 1996; KAHLON e CHOW, 2000; KAHLON e WOODRUFF, 2001; MÄLKKI e VIRTANEN, 2001; HUTH et al., 2002; KAHLON e WOODRUFF, 2002), são diversos os fenômenos que puderam ocorrer durante as reações encaminhadas nesta pesquisa. Muitos processos

físico-químicos ocorreram entre a formação de um material viscoelástico, que se verifica inicialmente, até a sua transformação em um sólido elástico, denotada ao final da reação. Conforme investigações reológicas conduzidas por BÖHN e KULICKE (1999 e 1999a), o β -glucano, devido à sua semelhança estrutural com a celulose, quando em solução, coexiste em dois estados: dispersão molecular com escoamento viscoelástico normal, e como uma infinita matriz gélida, sendo que suas propriedades físico-químicas e funcionais, em meio aquoso, sempre estarão relacionadas com sua parte solúvel.

Com relação ao farelo de trigo, em alguns processos industriais os grãos deste cereal são submetidos ao processo de extrusão. Este processo, em si ou em função de seus parâmetros, influencia grandemente algumas propriedades funcionais de soluções contendo β -glucano, tais como: capacidade de retenção de água e viscosidade (KAHLON et al., 1998; BÖHN et al., 1999; HUTH et al., 2000; CHARALAMPOPOULOS et al., 2002). Isso pode ser uma das explicações porque, embora os farelos de trigo utilizados neste trabalho contivessem menores concentrações de β -glucano em relação aos farelos de aveia, ainda assim foram obtidas consideráveis reduções de colesterol pelo seu uso.

Outra consideração relevante que pode ser extraída desta investigação invoca a possibilidade de que compostos de natureza protéica, presentes nos farelos, possam desempenhar reações de complexação com colesterol. KAHLON e WOODRUFF (2002a), ao avaliarem a capacidade de ligação entre sais biliares e proteínas de soja, de feijão e do glúten de trigo, obtiveram resultados de ensaios *in vitro* indicativos de que estes compostos, especialmente aqueles contidos no feijão, possuem propriedades redutoras de colesterol.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho foram avaliadas as técnicas de Espectrofotometria, de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e de Cromatografia Gasosa, para análise quantitativa de colesterol e de fitosteróis no óleo de manteiga. Concluiu-se que, para esses analitos e neste produto, as técnicas cromatográficas apresentaram sensibilidade, resolução e taxas de recuperação satisfatórias e suficientes. O método espectrofotométrico também pode ser adotado para análise de colesterol, desde que em produtos isentos de outros esteróis, por ser um método simples, de baixo custo e de boa sensibilidade.

Avaliou-se também o processo de redução do colesterol do óleo de manteiga pela reação deste com farelos de aveia, trigo e soja, em função das granulometrias desses farelos, da temperatura e da quantidade de água.

Usando óleo de manteiga com uma concentração inicial média de 247 mg de colesterol por 100 g de óleo, obtiveram-se reduções entre 12% e 41% no teor inicial de colesterol.

Pelo uso do farelo de aveia, foi possível obter-se redução de 41% com a fração de menor granulometria e de 38,5% com a de maior granulometria. Nos tratamentos em que se fez uso dos farelos de aveia foram verificados efeitos significativos ($p < 0,05$) da elevação da temperatura, até 75 °C, e do aumento na porcentagem de água adicionada, até 30%, com relação ao percentual de redução de colesterol.

Naqueles tratamentos com o farelo de trigo, foi possível obter-se redução de 37% com a fração de menor granulometria e de 36% com a de maior granulometria. Semelhantemente ao que se observou com o farelo de aveia, foram verificados efeitos significativos ($p < 0,05$) da elevação da temperatura, até 65 °C, e do aumento na porcentagem de água adicionada, até 30%, com relação ao percentual de redução de colesterol.

Nos experimentos em que se empregou o farelo de soja, verificou-se efeito redutor na concentração inicial de colesterol de, no máximo, em torno de 12%, e foram verificados efeitos significativos ($p < 0,05$) da elevação da temperatura, até 35 °C, e do aumento na porcentagem de água adicionada, até 30%, com relação ao percentual de redução de colesterol.

Com os resultados obtidos nesse trabalho pode-se considerar que há um potencial para a utilização de farelos de cereais, e de soja, para redução do teor de colesterol em alimentos. Tecnicamente, o farelo de aveia mostrou ser mais eficiente para reduzir o colesterol do óleo de manteiga, entretanto, uma possível recomendação deste farelo, deveria ser precedida de estudos quanto à viabilidade econômica, entre outras avaliações.

6. RECOMENDAÇÕES

Analisando-se os dados de resultados apresentados neste trabalho, embora se possa alimentar expectativa esperançosa quanto ao uso de farelos de cereais em processos de redução do colesterol de alimentos, existem diversas variáveis que podem suggestionar novos experimentos como, por exemplo, o efeito redutor do β -glucano puro, níveis mais elevados de proporção farelo:óleo de manteiga, outras velocidades e tempos de agitação, efeito do pH, os efeitos resultantes do uso de outros farelos (arroz, cevada, centeio e malte), estudos reológicos com outros polissacarídeos presentes em farelos de cereais (arabinoxilanas, glicomananas etc.), efeitos dos parâmetros de extrusão e de moagem dos grãos e dos farelos, entre outros estudos promissores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-HAMID, A., LUAN, Y.S. Functional properties of dietary fiber prepared from defatted rice bran. **Food Chemistry**, v.68, p.15-19, 2000.
- ACCATINO, L., PIZARRO, M., SOLIS, N., KOENIG, C.S. Effects of diosgenin, a plant-derived steroid, on bile secretion and hepatocellular cholestasis induced by estrogens in the rat. **Hepatology Baltimore**, v.28, n.1, p.129-140, 1998.
- AHA - AMERICAN HEART ASSOCIATION. The Nutrition Committee. **Dietary guidelines for healthy American adults**. Circulation nº 94, p.1795-1800, 1996.
- AHN, J., KWAK, H.S. Optimizing cholesterol removal in cream using β -cyclodextrin and response surface methodology. **Journal of Food Science**, v.4, n.64, p.629-632, 1999.
- AMUNDSON, D.M., ZHOU, M. Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.38, p. 43-52, 1999.
- ANDERSON J.W., SMITH B.M., GUSTAFSON N.J. Health benefits and practical aspects of high-fiber diets. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59 (suppl), p.1242S-1247S, 1994.
- ANDERSON J.W., STORY L., SIELING B., CHEN W.J., PETRO M.S., STORY, J. Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.40, p.1146-1155, 1984.
- ANDERSON, H., BOSAEUS, I., ELLEGARD. L. Effect of low-fat milk on cholesterol absorption and excretion in ileostomy subjects. **European Journal Clinical Nutrition**, v.49, p.274-281, 1995.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16. ed. 4th Rev.. Edited by Patricia Cunniff, Gaithersbury: AOAC, 1998.
- ARNETH, W., AL-AHMAD, H. Cholesterol. Its determination in muscle and adipose tissue and offal using HPLC. **Fleischwirtschaft**, v.75, n.8, p.1001-1003, 1995.
- AWAD, A.C., GRAY, J.I. Methods to reduce free fatty acids and cholesterol in anhydrous animal fat. **United States Patent**, nº 6.129.945, 2000.

- AWAD, A.C., SMITH, D.M. Method for reduction of cholesterol in egg materials. **United States Patent** nº 5.484.624, 1996
- BACHMAN, K.C., LIN, J.H., WILCOX, C.J Sensitive colorimetric determination of cholesterol in dairy products. **Journal-Association of Official Analytical Chemists**, v.59, n.5, p.1146-1149, 1976
- BALLESTEROS, E., GALLEGO, M., VALCÁRCEL, M. Gas chromatographic determination of cholesterol and tocopherols in edible oils and fats with automatic removal of interfering triglycerides. **Journal of Chromatography A**, v.719, p.221-227, 1996.
- BANKS, P., BARTLEY, W., BIRT, L.M. **The Biochemistry of the Tissues**. 2. ed. New York: John Wiley e Sons, 1976. 493p.
- BEER, M.U., WOOD, P.J., WEIZ, J., FILLION, N. Effect of cooking and storage on the amount and molecular weight of (1→3)(1→4) β-D-glucan. **Cereal Chemistry**, v.74, p.705-709, 1997.
- BEITZ, D.C., YOUNG, J.W., DEHAL, S.S. Method of converting cholesterol in food to coprostanol. **United States Patent** nº 4,921,710, 1990
- BELL, L.P. et al. Cholesterol lowering effects of soluble-fibre cereals as part of a prudent diet for patients with mild to moderate hyper-cholesterolemia. **American Journal of Clinical Nutrition**, v 52, p.1020-1026, 1990.
- BELL, S. et al. Effect of β-Glucan from oats and yeast on serum lipids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.39, n.2, p.189-202, 1999.
- BHASKAR, S.S.H. Anhydrous milk fat fractionation with continuous countercurrent supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Science**, v.58, p.748-752, 1993.
- BHASKAR, S.S.H. Anhydrous milk fat fractionation with continuous countercurrent supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Science**, v.58, p.748-752, 1993.
- BIERNOTH, G., MERK, W. Fractionation of butterfat using a liquefied gas or a gas in the supercritical state. **United States Patent** nº 4.504.503, 1985.
- BLACKWOOD, A.D., SALTER, J, DETTMAR, P.W., CHAPLIN, M.F. Dietary fibre, physicochemical properties and their relationship to health. **Journal of Royal Society of Health**, v.120, n.4, p.242-247, 2000.

- BÖHN, N., KULICKE, W.M. Rheological studies of barley (1→3)(1→4)- β-glucan in concentrated solution: mechanistic and kinetic investigation of the gel formation. **Carbohydrate Research**, v.315, p.293-301, 1999.
- BÖHN, N., KULICKE, W.M. Rheological studies of barley (1→3)(1→4)- β-glucan in concentrated solution: mechanistic and kinetic investigation of the gel formation. **Carbohydrate Research**, v.315, p.302-311, 1999a.
- BOUDREAU, A., ARUL, J. Cholesterol reduction and fat fractionation technologies for milk fat: an overview. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1772-1781, 1993.
- BOURDON, I. Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, n.1, p 55-63, 1999.
- BOWLES, R.K., MORGAN, K.R. et al. C¹³ CP/MAS NMR study of the interaction of bile acids with barley β-D-glucan. **Carbohydrate Polymers**, v.29, n.1, p.7-10, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. Doenças Cardiovasculares no Brasil. **Ciência Hoje**, v.103, 1994. Informe Publicitário.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. **Science**, v.191, p.150-154, 1976.
- BURGER, W.C. et al. Effects of different fractions of the barley kernel of hepatic lipid metabolism of chickens. **Lipids**, v.17, p.924-934, 1982.
- CABRERA-VIVAS, B.M., RAMÍREZ, J.C., MARTÍNEZ-AGUILERA, L.M.R., KUBLI-GARFIAS, C. Theoretical assessment of the mechanisms involved in the cholesterol biosynthesis from lanosterol. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM** (in press).
- CARERI, M., ELVIRI, L., MANGIA, A. Liquid chromatography – UV determination and liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. **Journal of Chromatography A.**, v.935, p.249-257, 2001.
- CARR, J.J., DREKTER, I.J. Simplified rapid technique for the extraction and determination of serum cholesterol without saponification. **Clin. Chem.**, v.2, p.353, 1956
- CASIRAGHI, E., LUCISANO, M., POMPEI, C., DELLEA, C. Cholesterol determination in butter by high performance chromatography. **Milchwissenschaft**, v.49, p.194-196, 1994.

- CHAN-KI, K. et al. Cholesterol biosynthesis from lanosterol: regulation and purification of rat hepatic sterol 14-reductase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v.1259, n.1, p.39-48, 1995.
- CHAO, E. **Functional foods**. Ch. 2 - Physiologically functional wheat bran. Edited by G.Mazza, Technomic Pub. Co. Inc., USA, 1998, 439p.
- CHAO, R.R., MULVANEY, S.J., BAILEY, M.E., FERNANDO, L.N. Supercritical CO₂ conditions affecting extraction of lipid and cholesterol from ground beef. **Journal of Food Science**, v.56, p.182-187, 1991.
- CHARAMPOPOULOS, D., WANG, R., PANDIELLA, S.S., WEBB, C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, p.131-141, 2002.
- CHESSON, A. **Food polysaccharides and their applications**. Ch. 17 - Dietary Fiber. Edited by Alistair M. Stephen. New York, NY: Marcel Dekker Inc. 1995, 654p.
- CHEUNG, P.C.K. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. **Nutrition Research**, v.16, n.11-12, p.1953-1957, 1996.
- CLAYE, S.S., IDOURAINE, A., WEBER, C.W. Extraction and fractionation of insoluble fiber from five fiber sources. **Food Chemistry**, v.2, p.305-310, 1996.
- COLLINS, C., BRAGA, G., BONATO, P. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed., Campinas-SP: Editora da Universidade Estadual de Campinas. 1997. 279p.
- CONTARINI, G., POVOLO, M., BONFITTO, E., BERARDI, S. Quantitative analysis of sterols in dairy products: experiences and remarks. **International Dairy Journal**, v.12, p.573-578, 2002.
- CYBERLIPID CENTER. <http://www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.htm#cholglyc>, acesso em junho de 2002.
- CZECH, B., PETER, S., WEIDNER, E. The reality of cholesterol-free butter. **Dairy Industry International**, v.58, p.25-27, 1993.
- DAPPER et al. Use of polar aprotic solvents to release membranes from milk lipid globules. **J. Dairy Sci.**, v.70, p.760, 1987.
- DELLA-GRECA, M., MOLINARO, A., MONACO, P., PREVITERA, L. Acylglycosyl sterols from *Pistia stratiotes*. **Phytochemistry**, v.30, n.7, p.2422-2424, 1991.

- DREHER, M.L. **Handbook of dietary fiber: an applied approach**. New York: Marcel Decker, 1987. 467p.
- DRYER, J. Big bucks go into new dairy products. **Hoard's-Dairyman.**, v.135, n.11, p.543, 1990.
- EDWARDS, C.A., JOHNSON, I.T., READ, N.W. Do viscous polysaccharides slow absorption by inhibiting diffusion or convection? **European Journal of Clinical Nutrition**, v.42, p.307-312, 1988.
- EMARA, S., HUSSIEN, S.A., MOHAMED, F.A. Determination of cholesterol in egg yolk by high performance liquid chromatography using an automated precolumn-switching procedure. **Jour. of Liquid Chromatography e Related Technologies**, v.22, n.8, p.1235-1246, 1999.
- ENGLYST H., WIGGINS H.S., CUMMINGS J.H. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, v.107, p.307-318, 1982.
- FDA. Food labelling. Definitions of terms, cholesterol-free, low cholesterol and reduced cholesterol; Tentative final rules. **United States Food and Drug Administration**. Fed. Register (July 19), v.55, p.29456, 1990.
- FDA. Proposals for cholesterol-free from milk fat using supercritical and low cholesterol foods. **U.S. Food and Drug Administration**. Fed. Register (Nov. 25), v.51, p.42584, 1986.
- FENNEMA, O.R. **Food chemistry**. 3.ed., New York-NY: Marcel Decker Inc., 1996. 1069p.
- FERNANDEZ, M.L. Soluble fibre and non-digestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. **Current Opinions of Lipidology**, v.12, p.35-40, 2001.
- FERNANDEZ-ROMERO, J.M., LUQUE DE CASTRO, M.D., VALCARCEL, M. Enzymatic determination of total cholesterol in serum by flow injection analysis. **Journal of Pharmaceutical e Biomedical Analysis**, v.5, n.4, p.333-340, 1987.
- FINCHER, G.B., STONE, B.A. Cell walls and their components in cereal grain technology. **Advanced Cereal Science and Technology**, v.8, p.207, 1986.
- FOGLIA, T.A., LEE, K.T., BRILLHART, D.D. Solvent fractionation of chicken fat for making lipid compositions enriched in unsaturated fatty acid-containing triacylglycerols. **United States Patent** n^o 6.344.574, 2002.

- FOX, G.J. Long chained beta glucan isolates derived from viscous barley grain, and the process of making. **United States Patent** n^o 6.197.952, 2001.
- FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v.66, p.663-673, 2000.
- FUKUBA, H., TAKEUCHI, M. Effect of lignin and its related components on plasma cholesterol level. **Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science**, v.42, n.6, p.449-459, 1989.
- GALLAHER, D.O. Viscosity and fermentability as attributes of dietary fiber responsible for the hypocholesterolemic effect in hamster. **Journal of Nutrition**, v.123, p.240-252, 1993.
- GEELLEN, M.J.H., GIBSON, D.M., RODWELL, V.W. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase - the rate-limiting enzyme of cholesterol biosynthesis. **FEBS Letters**, v.201, n.2, p.183-186, 1986.
- GILLILAND, S.E., NELSON, C.R., MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.377-381, 1985.
- GILLING, H.K. et al. Serum retinol, beta-tocopherol, carotenes, and lipid peroxide production during serum cholesterol lowering by sitostanol ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. **Circulation**, v.94, n.1, p.578, 1996 (abstract n^o 3379).
- GLITSO, L.V., KNUDSEN, K.E.B. Milling of whole grain rye to obtain fractions with different dietary fibre characteristics. **Journal of Cereal Science**, v.29, p.89-97, 1999.
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v.343, p.425-430, 1990.
- GOMEZ, C., NAVARRO, A. et al. Physical and structural properties of barley (1→3), (1→4)-β-D-glucan: Part II. Viscosity, chain stiffness and macromolecular dimensions. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, p. 17-22, 1997.
- GURR, M.I. **Role of fats in food and nutrition**. London and New York: Elsevier A S. Pub. 1984. 170p.
- GYLLING, H., MIETTINEN, T.A. Baseline intestinal absorption and synthesis of cholesterol regulate its response to hypolipidaemic treatments in coronary patients. **Atherosclerosis**, v.160, p.477-481, 2002.

- HADDEN, N., BAUMAN, F. **Basic liquid chromatography**. Varian Aerograph (Cal-USA), Chapter 5, p.5.1, 1972.
- HALL, J.M. A review of total dietary fiber methodology. **Cereal Foods World**, v.34, n.7, p.526-528, 1989.
- HAQUE, M., HIRAI, Y., YOKOTA, K., OGUMA, K. Steryl glycosides: a characteristic feature of the *Helicobacter* spp.? **Journal of Bacteriology**, v.177, n.18, p.5334-5337, 1995.
- HÄRKÖNEN, H., PESSOA, E., SUORTTI, T., POUTANEN, K. Distribution and some properties of cell wall polysaccharides in rye milling fractions. **Journal of Cereal Science**, v.26, p.95-104, 1997.
- HARPER, H.A., RODWELL, V.W., MAYES, P.A. **Manual de química fisiológica**, 5.ed. São Paulo-SP: Atheneu Editora, 1982. 736p.
- HAYES, K.C. Designing a cholesterol-removed fat blend for frying and baking. **Food Technology**, p.92-97, April 1996.
- HEIDLAS, J., VOLLBRECHT, H.R., CULLY, J. Process for the production of fat- and cholesterol-reduced powdered products based on eggs which are characterized by a high phospholipid content. **United States Patent** nº 5.616.352, 1997.
- HERNANDEZ, J.L., CASTRO, M.J.G., SOTELO, M.P. Determination of sterols in each urchin gonads by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatographic Science**, v.37, n.7, p.237-239, 1999.
- HOCHGRAFA, E., COGAN, U., MOKADYA, S. Dietary oxidized linoleic acid enhances liver cholesterol biosynthesis and secretion in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, n.3, p.176-180, 2000.
- HOFFMANN, R.A., GEIGTENBEEK, T., KAMERLING, J.P., VLIAGENTHART, F.G. ¹H-NMR study of enzymatically generated wheat endosperm arabinoxylan oligosaccharides: structure of heptato tetradeca-saccharides containing two or three branched xylose residues. **Carbohydrate Research**, v.223, p.19, 1992.
- HSIEH, R.J., SNYDER, D.N., FORD, E.W. Method for removing cholesterol and fat from egg yolk by chelation and reduced-cholesterol egg product. **United States Patent** nº 5,302,405, 1994.
- HUBER, W., MOLERO, A., De La OSSA, M. Determination of cholesterol in milk fat by supercritical fluid chromatography. **Journal Chromatography A**, v.715, p.333-336, 1995.

- HUBER, W., MOLERO, A., PEREYRA, C. Dynamic supercritical CO₂ extraction for removal of cholesterol from anhydrous milk fat. **International Journal of Food Science and Technology**, v.31, p.143-151, 1996.
- HURST, W.J. High performance chromatographic analysis of cholesterol in milk. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.2192-2194, 1982.
- HUTH, M., DONGOWSKI, G., GEBHARD, E., FLAMME, W. Functional properties of Dietary Fibre Enriched Extrudates from Barley. **Journal of Cereal Science**, v.32, p.115-128, 2000.
- INDISTATE. <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/lipoproteins.html>. Acesso em 12 de setembro de 2002
- INGR, I., SIMEONOVÁ, J. A rapid determination of cholesterol in egg yolks using the Bio-La-Test. **Veterinari Medicina**, v.28, n.2, p.97-104, 1983.
- JACKESCHKY, H.W. Method of manufacturing a dietetic, cholesterol-reduced whole egg or egg yolk product. **United States Patent** nº 5.948.463, 1999.
- JEKEL, A.A., VAESSEN, H.A.M.G., SCHOTHORST, R.C. Capillary gas chromatographic method for determining non-derivatised sterols. Some results of analyzing the duplicate 24-h-diet samples collected in 1994. **Journal of Analytical Chemistry**, v.360, p 595-600, 1998.
- JENKINS, D.J.A., KENDALL, C.W.C., RANSOM, T.P.P. Dietary fiber, the evolution of the human diet and coronary heart disease. **Nutrition Research**, v.18, n.4, p.633-652, 1998.
- JOHANSSON, L., VIRKKI, L. et al. Structural characterization of water soluble β -glucan of oat bran. **Carbohydrate Polymers**, v.42, n.2, p.143-148, 2000.
- JOHNSON, B.R., CONTE JR., J.A. Production of low-cholesterol milk fat by solvent extraction, **United States Patent** nº 4.997.668, 1991.
- JONES, P.J., SARJAZ, M.R. Plant sterols and their derivatives: the current spread of results. **Nutrition Reviews**, v.59, n.1 (Part I), p.21-24, 2001.
- JONES, P.J.H., NTANIOS, F.Y., SARJAZ, M.R., VANSTONE, C.A. Cholesterol-lowering efficacy of a sitostanol-containing phytosterol mixture with a prudent diet in hyperlipidemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.1144-1150, 1999.
- KAHLON, T.S. et al. Cholesterol-lowering effects in hamsters of β -glucan-enriched barley fraction, dehulled whole barley, rice bran and oat bran and their combinations. **Cereal Chemistry**, v.70, n.4, p.435-440, 1993.

- KAHLON, T.S. et al. Cholesterol-lowering in hamster fed rice bran at various levels, defatted rice bran and rice bran oil. **Journal of Nutrition**, v.122, p.513-519, 1992.
- KAHLON, T.S. et al. Effects of extrusion on hypocholesterolemic properties of rice, oat, corn, and wheat bran diets in hamsters. **Cereal Chemistry**, v.75, n.6, p.897-903, 1998.
- KAHLON, T.S., CHOW, F.I. In vitro binding of bile acids by rice bran, oat bran, wheat bran and corn bran. **Cereal Chemistry**, v.77, n.4, p.518-521, 2000.
- KAHLON, T.S., EDWARDS, R.H., CHOW, F.I.A.D. Effect of extrusion on hypocholesterolemia properties of rice, oat, corn, and wheat bran diets in hamsters. **Cereal Chemistry**, v.75, n.6, p.897-903, 1998.
- KAHLON, T.S., WOODRUFF, C.L. In vitro binding of bile acids by rice bran, oat bran, barley and β -glucan-enriched barley. TEKTRAN. USDA. Agricultural Research Service. <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000012/26/0000122633.html>, 2001.
- KAHLON, T.S., WOODRUFF, C.L. In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. **Food Chemistry**, 2002 (*in press*).
- KALRA, S., JOOD, S. Effect of dietary barley β -glucan on cholesterol and lipoprotein fractions in rats. **Journal of Cereal Science**, v.31, p.141–145, 2000.
- KASTELEIN, J.J.P., STALENHOEF, A., JONKER, J. Daily consumption of non-esterified phytosterols from tall oil (PhytrolTM) in a chocolate matrix significantly lowers LDL cholesterol in moderately hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**, v.151, n.1, p.118, 2000.
- KATSANIDIS, E., ADDIS, P.B. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, n.11-12, p.1137-1140, 1999.
- KIM, E., GOLDBERG, M. Serum cholesterol assay using a stable Liebermann-Burchard reagent, **Clinical Chemistry**, v.15, n.12, p.1171-1179, 1969.
- KIRYLUK, J., KAWKA, A., GASIOROWSKI, H., CHALCARAZ, A., ANIO, A.J. Milling of barley to obtain β -glucan enriched products. **Die Nahrung**, v.44, n.4, p.238-241, 2000.

- KLAVER, F.A.M., MEER, R. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1120-1124, 1993.
- KLEMANN, L.P., FINLEY, J.W. Process for separation of sterol compounds from fluid mixtures. **United States Patent** n^o 5.064.668, 1991.
- KLEMANN, L.P., FINLEY, J.W. Processes for separation of sterol compounds from fluid mixtures using substantially insoluble compounds. **United States Patent** n^o 5.063.070, 1991a.
- KNUCKLES, B.E., CHIM, M.N., BETSCHART, A.A. β -glucan enriched fractions from laboratory-scale dry milling and sieving of barley and oats. **Cereal chemistry**, v.69, p.198-202, 1992.
- KOBAYASHI, K. et al. Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.57, n.4, p.769-771, 1995.
- KODALI, D.R. Phospholipid-based removal of sterols from fats and oils. **United States Patent** n^o 5.880.300, 1999.
- KODALI, D.R. Removal of sterols from fats and oils. **United States Patent** n^o 6.303.803, 2001
- KUKSIS, A. Review: Plasma non-cholesterol sterols. **Journal of Chromatography A**, v.935, n.1-2, p.203-236, 2001.
- KWAK, H.S., AHN, J.J., LEE, D.K. Method for removing cholesterol from milk and cream. **United States Patent** n^o 6.110.517, 2000.
- LADEN, B.P., PORTER, T.D. Resveratrol inhibits human squalene monooxygenase. **Nutrition Research**, v.21, n.5, p.747-753, 2001.
- LANZANI, A. et al. A new short-path distillation system applied to the reduction of cholesterol in butter and lard. **Journal of American Oil Chemists Society**, v.71, p.609-614, 1994.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo-SP: SAVIER, 1995. 839p.
- LEWIS, D. et al. Enzyme inhibition during the conversion of squalene to cholesterol. **Steroids**, v.60, n.7, p.475-483, 1995.

- LIA, A. et al. Oat β -glucan increases bile acid excretion and a barley fiber-rich fraction increases cholesterol excretion in ileostomy subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1245-1251, 1995.
- LIA, A. et al. Postprandial lipemia in relation to sterol and fat excretion in ileostomy subjects given oat-bran and wheat test meals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.66, n.2, p.357-365, 1997.
- LING, W.H., JONES, P.J.H. Enhanced efficacy of sitostanol-containing versus sitostanol-free phytosterol mixtures in altering lipoprotein cholesterol levels and synthesis in rats. **Atherosclerosis**, v.118, n.2, p.319-331, 1995.
- LSRO – LIFE SCIENCES RESEARCH OFFICE. Physiological Effects and Health Consequences of Dietary Fiber. Bethesda, Md: **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.236, 1987.
- MAKI, K.C. et al. Cholesterol Lowering With High-Viscosity Hydroxypropylmethylcellulose. **The American Journal of Cardiology**, v.84, p.1198-1203, 1999.
- MAKI, K.C. et al. Lipid responses to plant-sterol-enriched reduced-fat spreads incorporated into a National Cholesterol Education Program Step I diet. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, p.33-43, 2001.
- MÄLKKI, Y. and MYLLYMAKI, O. Method for enriching soluble dietary fibre. **United States Patent** n^o 5.846.590, 1998.
- MÄLKKI, Y., VIRTANEN, E. Gastrointestinal effects of oat bran and oat gum. A review. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, v.34, p.337-347, 2001.
- MANZI, P., PANFILI, G., PIZZOFERRATO, L. Normal and reversed phase HPLC for more complete evaluation of tocopherols, retinols, carotenes and sterols in dairy products. **Chromatographia**, v.43, p.89-93, 1996.
- MARASCHIELLO, C., DIAZ, I., GARCIA-REGUEIRO, J.A. Determination of cholesterol in fat and muscle of pig by HPLC and capillary gas chromatography with solvent venting injection. **HRC Journal of High Resolution Chromatography**, v.19, n.3, p.165-168, 1996.
- MARLETT, J.A. et al. Mechanism of serum cholesterol reduction by oat bran. **Hepatology**, v.20, p.1450-1457, 1994.
- MARSCHNER, S.S., FINE, J.B. Physical process for simultaneous deodorization and cholesterol reduction of fats and oils **United States Patent** n^o 4.804.555, 1989.

- McCANN, S.E., MOYSICH, K.B., METTLIN, C. Intakes of selected nutrients and food groups and risk of ovarian cancer. **Nutrition and Cancer**, v.39, p.19-28, 2001.
- McINTOSH, G.H. Barley and wheat foods: influence on plasma cholesterol concentrations in hypercholesterolemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, p.1205-1209, 1991.
- ME-FAE. Ministério da Educação - Fundação de Assistência ao Estudante, **Manual de Métodos Analíticos Oficiais de Controle de Qualidade**, p.87, 1988.
- MELBACH, R.L., HOCKENBERRY, P.S., KAAFARANI, B. Method of producing cholesterol-reduced whole egg products. **United States Patent** nº 5.487.912, 1996.
- MERCHANT, Z.M., WREZEL, P.W., SPURLOCK, L.L., CARPENTER, D.E. Oil extraction of cholesterol from milk products. **United States Patent** nº 5.378.487, 1995
- MILLER, W.L., HARIKRISHNA, J.A., BLACK, S.M. Cholesterol disposal fusion enzymes. **United States Patent** nº 5.547.868, 1996
- MOGHADASIAN, M.H. Pharmacological properties of plant sterols. In vivo and in vitro observations: Minireview. **Life Sciences**, v.67, p.605-615, 2000.
- MOGHADASIAN, M.H., NOVAK, E., FROHLICH, J.J., PRITCHARD, H. Comparison of cholesterol-lowering effects of hydrogenated tall oil phytosterols in apo-E-KO mice. **Atherosclerosis**, v.151, n.1, p.118, 2000.
- MOHAMED, R.S., NEVES, G.B.M, KIECKBUSCH, T.G. Reduction in cholesterol and fractionation of butter oil using supercritical CO₂ with adsorption on alumina. **International Journal of Food Science and Technology**, v.33, p.445-454, 1998.
- NICOLOSI et al. Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, n.2, p.208-212, 1999.
- 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.
- NILSSON, M., SAULNIER, L., ANDERSSON, R., AMAN, P. Water Unextractable Polysaccharides from Three Milling Fractions of Rye Grain. **Carbohydrate Polymers**, v.30, p.229-237, 1996.

- NORDSTROM, J.L., RODWELL, V.W., MITSCHELEN, J.J. **Journal of Biological Chemistry**, v.252, p.8924, 1977.
- NORRIS, R. Milk fat containing products and processes therefore. **United States Patent** nº 4.005.228, 1977.
- O'DONNELL, J.A. Future of milk fat by production or processing: integration of nutrition, food science, and animal science. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1797-1801, 1993.
- PARK, S.W., ADDIS, P.B. HPLC determination of C-7 oxidized cholesterol derivatives in foods. **Journal of Food Science**, v.50, p.1437-1441, 1985.
- PARK, Y. W. Cholesterol determination of U.S. and imported goat milk cheeses as quantified by different colorimetric methods. **Small Ruminant Research**, v.32, p.77-82, 1999.
- PEINADO, J., TORIBIO, F. Enzymatic determination of cholesterol, L-amino acids and linoléico acid with a novel redox indicator system. **Analytica Chimica Acta**, v.184, p.235-242, 1986.
- PIIRONEN, V., TOIVO, J., LAMPI, A.M. Natural sources of dietary plant sterols. 3rd International Food Data Conference. Rome, Italy, 1999. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, n.4, p.619-624, 2000.
- PIRILLO, A., JACOVIELLO, C., LONGONI, C., PELLEGGATTA, F., CATAPANO, A.L. Cholesterol biosynthesis pathway is involved in the heat shock protein and cytotoxic indicated by oxidized LDL in cultured human endothelial cells and smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v.134, n.1-2, p.251-252, 1997.
- PROSKY, L., ASP, N.G., FURDA, I., DEVRIES, J.W., SCHWEIZER, T.F., HARLAND, B.F. Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. **Journal of Associates of Analytical Chemistry**, v.68, p.677-679, 1985
- QURESHI, A.A. et al. Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk parameters of hypercholesterolemic humans. **Nutritional Biochemistry**, v.8, p.290-298, 1997.
- RASIC, J.L., VUJICIC, I.F., SKRINJAR, M. Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Biotechnology Letters**, v.14, p. 39-44, 1992.
- REGUEIRO, J.A.G., GIBER, J., DIAZ, I. Determination of neutral lipids from subcutaneous fat of cured ham by capillary gas chromatography and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.667, p.225-233, 1994.

- RENNER, E. Do we need cholesterol-reduced milk products? **Proceedings of the XXIII International Dairy Congress**, Montreal, v.3. 1991.
- RIECKHOFF, D. et al. Effects of different cereal fibers on cholesterol and bile acid metabolism in Syrian Golden hamster. **Cereal-Chemistry**, v.76, n.5, p.788-795, 1999.
- RODERBOURG, H., DALEMANS, D., BOUHON, R. Process for reducing the content of cholesterol and of free fatty acids in an animal fat. **United States Patent** n° 5.232.725, 1993.
- ROSE-SALLIN, C. Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [²H⁷] cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artefacts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.935-941, 1995.
- ROUBROEKS, J.P., ANDERSSON, R., AMAN, P. Structural features of (1→3)(1→4)- β-glucan and arabinoxylan fractions isolated from rye bran. **Carbohydrate Polymers**, v.42, p.3-11, 2000.
- RUDEL, L.L., MORRIS, M.D. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. **Journal of Lipid Research**, v.14, p.364, 1973.
- RUDNEY, H., SEXTON, R.C. Regulation of cholesterol biosynthesis. **Ann. Rev. Nutr.**, v.6, p.245-272, 1986.
- SAITOH, C. et al. Process for producing a *cholesterol-reduced* substance. **United States Patent Application** n° 20.010.034.041, 2001.
- SAITOH, C., SENDA, H., YOKOO, Y. Process for producing a *cholesterol-reduced* substance. **United States Patent** n° 5.503.988, 1996
- SALE, F.O., MARCHESINI, S.A. A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. **Analytical Biochemistry**, v.142, p.347-350, 1984.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.
- SAS. **Software**: version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1999.
- SAULNIER, L., GÉVAUDAN, S., THIBAUT, J.F. Extraction and partial characterization of β-glucan from the endosperms of two barley cultivars. **Journal of Cereal Science**, v.9, p.171-178, 1994.

- SCHRODER, B., BAER, R. Consumer evaluation of reduced-cholesterol butter. **Food Technology**, p.104-107, October 1991.
- SEARCY, R.L., BERGQUIST, L.M. A new color reaction for the quantitation of serum cholesterol. **Clinical Chimica Acta**, v.5, p.102, 1960.
- SHINNICK F, MATHEWS R, INK, S. Serum cholesterol reduction by oats and other fiber sources. **Cereal Foods World**, v.36, p.815-821, 1991
- SHUKLA, A., BHASKAR, A.R., RIZVI, S.S.H., MULVANEY, S.J. Physicochemical and rheological properties of butter made from supercritically fractionated milk fat. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.45-54, 1993.
- SIEBER, R. Cholesterol removal from animal food – Can it be justified?. **Lebensm. Wiss. U. Technol.**, v.26, p.375-387, 1993.
- SIERKSMA, A., WESTSTRATE, J.A., MEIJER, G.W. Spreads enriched with plant sterols, either esterified 4,4-dimethylsterols or free 4-desmethylsterols, and plasma total- and LDL-cholesterol concentrations. **British Journal of Nutrition**, v.82, p.273-282, 1999.
- SOLEAS, G.J., DIAMANDIS, E.P., GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, v.30, p.91-113, 1997.
- SOUTHGATE, D.A.T., HUDSON, G.J., ENGLYST, H. The Analysis of Dietary Fiber – the Choices of the Analyst. **Journal of Science and Food Agricultural**, v.29, p.979-988, 1978.
- STAPLETON, A., ALLEN, P.V., FRIEDMAN, M., BELKNAP, W.R. Purification and characterization of solanidine glucosyltransferase from the potato (*Solanum tuberosum*). **Journal of Agricultural and Biological Chemistry**, v.39, n.6, p.1187-1193, 1991.
- STEINER, S. et al. Cholesterol biosynthesis regulation and protein changes in rat liver following treatment with fluvastatin. **Toxicology Letters**, v.120, n.1-3, p.369-377, 2001.
- STEPHEN, A. Whole grains: impact of consuming whole grains on physiological effects of dietary fiber and starch. **Cult. Rev. Food. Sci. Nutr.**, v.34, n.5,6, p.499-511, 1994.
- STERIN-SPEZIALE, V.L. et al. Compartmental study of rat renal phospholipid metabolism. **Lipids**, v.27, p.10-14, 1992.

- STEWART, G., GOSSELIN, C., PANDIAN, S. Selected ion monitoring of tert-butyltrimethylsilyl cholesterol ethers for determination of total cholesterol of foods. **Food Chemistry**, v.44, p.377-380, 1992.
- SUGAWARA, T., MIYAZAWA, T. Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. **Lipids**, v.34, n.11, p.1231-1237, 1999.
- SUNDBERG, B., AMAN, P. Fractionation of Different Types of Barley by Roller Milling and Sieving. **Journal of Cereal Science**, v.19, p.179-184, 1994.
- SUNDFELD, E., KROCHTA, J.M., RICHARDSON, T. Aqueous process to remove cholesterol from food products. **United States Patent** nº 5.370.890, 1994.
- TANSEY, T., SCHECHTER, I. Review: Structure and regulation of mammalian squalene synthase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1529, n.1-3, p.49-62, 2000.
- TOIT, M. et al. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, p.93-104, 1998.
- TROWELL, H. et al. Dietary Fiber Redefined. **Lancet**, (i), p.67, 1976.
- TRZASKOSA, J.M. Oxysterols as modifiers of cholesterol biosynthesis. **Progress in Lipid Research**, v.34, n.2, p.99-116, 1995.
- VALENTE, G.F.S., **Remoção de colesterol da gordura de leite por adsorção em sílica gel**. Viçosa-MG: UFV, 2000. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- van HORN, L. Fiber, Lipids, and Coronary Heart Disease. **American Heart Association**, Circulation nº 95, p.2701-2704, 1997
- VANCE, D.E. e Van den BOSCH, H. Cholesterol in the year 2000. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1529, p. 1- 8, 2000.
- VARIAN. **Chrompack Application Note** nº 314-GC, 1998.
- WANG, L. et al. Barley beta-glucans alter intestinal viscosity and reduce plasma cholesterol concentrations in chicks. **Journal of Nutrition**, v.122, p.2292-2297, 1992.

- WANG, L. et al. Comparative cholesterol-lowering effects of barley beta-glucan and barley oil in Golden Syrian Hamsters. **Nutrition Research**, v.17, n.1, p.77-88, 1997.
- WANG, Q., WOOD, P.J., CUI, W., ROSS-MURPHY, S.B. The effect of autoclaving on the dispersibility and stability of three neutral polysaccharides in dilute aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v.45, p.355-362, 2001.
- WATARAI, S. et al. Inhibitory effect of liposomes containing sulfatide or cholesterol sulfate on syncytium formation induced by bovine immunodeficiency virus-infected cells. **Journal of Biochemistry Tokyo**, v.108, n.4, p.507-509, 1990.
- WATERS CORPORATION. Chromatography. (<http://www.waters.com>), Google site. 2001.
- WEBER, N., WEITKAMP, P., MUKHERJEE, K.D. Cholesterol-lowering food additives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters. **Food Research International**, v.35, p.177-181, 2002.
- WESTER, I. Cholesterol-lowering effect of plant sterols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.102, p.37-44, 2000.
- WESTERLUND, E., ANDERSSON, R., AMAN, P. Isolation and chemical characterization of water-soluble mixed-linked β -glucans and arabinoxylans in oat milling fractions. **Carbohydrate Polymers**, v.20, p.115-123, 1993.
- WESTSTRATE, J.A., AYESH, R., BAUER-PLANK, C., DREWITT, P.N. Safety evaluation of phytosterol esters. Part. 4. Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet with or without a phytosterol esterenriched margarine. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.1063-1071, 1999.
- WHITE, P.J., ARMSTRONG, L.S. Effect of selected oat sterols on the deterioration of heated soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.63, n.4, p.525-529, 1986.
- WIELAND, H. **The constitution of the bile acids and related substances.** Prêmio Nobel de Química, 1927
- WINDAUS, A. **The constitution of sterols and their connection with the vitamins.** Prêmio Nobel de Química, 1928.
- WOLLNY, T. et al. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. **British Journal of Pharmacology**, v.127, p.747-755, 1999.

- WOOD, P.J. Cereal β -glucans: structure, properties and health claims. In: McCleary, B.V and Prosky, L. (eds.). **Advanced Dietary Fibre Technology**. Oxford: Blackwell Science Co., p. 315-328, 2001.
- WOOD, P.J. et al. Oat beta-glucan physicochemical properties and physiological effects. **Trends Food Sci. Technol.**, v.2, p.311-314, 1991.
- WOOD, P.J., BEER, M.U. **Functional Foods**. Ch. 1 – Functional Oat Products. Edited by G.Mazza, Technomic Pub. Co. Inc., USA, 1998, 439p.
- WOOD, P.J., WEIZ, J., MAHN, W. Molecular characterization of cereal β -glucans. II. Size-exclusion chromatography for comparison of molecular weight. **Cereal Chemistry**, v.68, p.530-536, 1991a.
- WREZEL, P.W., KRISHNAMURTHY, R.G., HASENHUETTL, G.L. Method for removing cholesterol from edible oils. **United States Patent**, n.5, p.128.162, 1992.
- WU, Y.V., DOEHLERT, D.C. Enrichment of β -glucan in Oat Bran by Fine Grinding and Air Classification. **Lebensm-Wiss. u Technol.**, vol.35, p.30-33, 2002.
- XU, X-H., LI, R-K., CHEN, J., CHEN, P., LING, X-Y., RAO, P.F. Quantification of cholesterol in foods using non-aqueous capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**. Article in Press.
- ZEIDLER, G., PASIN, G., KING, A.N. Supercritical fluid extraction of cholesterol from liquid egg yolk. **United States Patent** n^o 5.514.401, 1996.
- ZIMMERMANN, S., ELMADFA, I. The unsaponifiable matter in some edible oils and the analysis of phytosterols by RP-HPLC and UV detection. **Ernaehrung**, v.21, n.5, p.205-20, 1997.