



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ESTUDO DO EFEITO DO CHÁ
(*CAMELLIA SINENSIS*) NO CONTEÚDO EM
COLESTEROL DOS OVOS**

**TESE DE MESTRADO EM TECNOLOGIA E
SEGURANÇA ALIMENTAR**

Liliana Maria Freitas Sousa

Angra do Heroísmo
2011



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ESTUDO DO EFEITO DO CHÁ
(*CAMELLIA SINENSIS*) NO CONTEÚDO EM
COLESTEROL DOS OVOS**

**TESE DE MESTRADO EM TECNOLOGIA E
SEGURANÇA ALIMENTAR**

Liliana Maria Freitas Sousa

Orientador: Prof.^a Doutora Célia Costa Gomes da Silva

Angra do Heroísmo
2011

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Célia Costa Gomes da Silva por me ter possibilitado a realização da presente tese. Pela sua sempre pronta ajuda, colaboração e orientação na realização de todos os trabalhos relacionados com a tese, sem a qual a concretização da mesma teria sido impossível. Estou-lhe muito grata.

Ao Centro de Investigação e Tecnologia Agrária dos Açores (CITA-A), na pessoa do Professor Doutor João Madruga, pelo apoio financeiro prestado para a concretização da presente tese.

Ao aviário AVITOSTE Lda., na pessoa do Doutor Pedro Toste e da Eng.^a Sofia Azevedo, pela incansável ajuda no esclarecimento de dúvidas relativas às galinhas, no empréstimo das galinhas para a realização da tese, bem como empréstimo das gaiolas e cedência da ração.

Ao Professor Doutor Henrique Rosa pela ajuda concedida na preparação do espaço para a realização do estudo, na pesagem das galinhas e na colheita do sangue para análise.

Às colegas do laboratório Sandra Câmara, Susana Ribeiro e Marina Lopes pelo acolhimento e disponibilidade.

Aos meus pais, irmãs, namorado e restante família pela motivação e compreensão com que sempre me acompanharam ao longo do meu percurso académico. Obrigada pelo amor e ajuda.

À minha entidade patronal, na pessoa da Eng.^a Madalena Rocha, pela compreensão demonstrada ao longo deste percurso.

A todos muito obrigada.

RESUMO

O chá, em particular o chá verde, é conhecido pelas propriedades anti-colesterolémicas. Estudos recentes apontam para a possibilidade de se utilizar o chá na redução do colesterol na gema dos ovos (Azeke & Ekpo, 2009), uma vez que os ovos contêm um elevado teor em colesterol, cerca de 200 mg, que corresponde quase ao valor máximo da ingestão diária recomendada pela Associação Americana do Coração (300 mg/dia). Com o presente estudo, pretendeu-se determinar o efeito da inclusão na alimentação das galinhas de chá açoriano (chá preto e chá verde) na diminuição do conteúdo em colesterol da gema de ovo. Utilizaram-se 20 galinhas ISA Brown com 53 semanas de idade, em gaiolas individuais, divididas aleatoriamente em 5 grupos, aos quais foram administrados dois tipos chá (preto e verde) da seguinte forma: controlo (ao qual foi administrada apenas água), chá preto a 0,5%, chá preto a 1%, chá verde a 0,5% e chá verde a 1%. Trinta dias após o início do tratamento foi aumentada a concentração do chá (preto e verde) de 0,5% para 2%. O estudo teve a duração de 9 semanas. Durante este período, o peso das galinhas e o rendimento da produção de ovos não foram afectados pelos tratamentos. A média diária de ingestão de chá não foi também afectada pelos tratamentos, excepto para os tratamentos com 0,5% de chá preto, 0,5% e 1% de chá verde, onde ocorreu um aumento significativo ($P<0,05$) da ingestão diária. Igualmente, não foram observadas alterações significativas no peso total dos ovos, embora se tenha observado uma redução significativa no peso da casca dos ovos dos grupos tratados com 1% de chá preto, 2% de chá preto e 1% de chá verde de 8,1%, 7,8% e 7,3%, respectivamente.

Todos os tratamentos com chá preto e chá verde a 1% e 2% resultaram em reduções significativas ($P<0,05$) no teor de colesterol total na gema do ovo, ao fim de 6 semanas de tratamento. Os tratamentos com chá preto a 1% e 2% e chá verde a 1% e 2% resultaram numa redução no teor de colesterol em relação ao controlo de 6,1%, 10,3%, 7,7% e 11,7%, respectivamente. No entanto, devido ao facto dos tratamentos provocarem um aumento do peso da gema ($P<0,05$), não se observaram alterações significativas no teor de colesterol total no ovo (mg/ovo). Apenas o tratamento com chá verde a 2% resultou numa redução significativa ($P<0,05$) no teor em colesterol total no plasma.

Consideramos desta forma que a utilização de chá dos Açores, chá preto e chá verde, pode consistir numa vantagem para a indústria avícola que poderá assim produzir ovos com um teor reduzido em colesterol.

Palavras-chave: Colesterol, gema de ovo, chá verde dos Açores, chá preto dos Açores.

ABSTRACT

Tea, especially green tea, is well known for anti-cholesterol properties. Recent studies use tea to reduce egg yolk cholesterol content (Azeke & Ekpo, 2009), because eggs have a high cholesterol content, about 200 mg, nearly to recommended maximum daily intake by the American Heart Association (300 mg/day). This study was conducted to determine the effect of inclusion of Azorean tea (black tea and green tea) in the hens diet to decrease the cholesterol content of egg yolk. Twenty ISA Brown hens aged 53 weeks were used, in individual cages, and divided randomly into five groups, which were fed with two types of tea (black and green) as follows: control (only water), 0,5% black tea, 1% black tea, 0,5% green tea and 1% green tea. After thirty days of treatments beginning 0,5% tea concentration (black and green) was increased to 2%. The study lasted 9 weeks. During this period hens weight and eggs production rate were not affected by treatments. The daily intake average of tea was not affected by treatments, with the exception of 0,5% black tea, 0,5% and 1% green tea treatments which shown significant increase ($P<0,05$) in the daily intake. Non-significant changes were noted in the total eggs weight, although there was a significant reduction in shell weight for 1% black tea, 2% black tea and 1% green tea treatments in 8,1%, 7,8% e 7,3%, respectively.

All black tea and green tea treatments in 1% and 2% concentrations resulted in significant reductions ($P<0,05$) in total egg yolk cholesterol (mg/g), after 6 weeks of treatment. 1% black tea, 2% black tea, 1% green tea and 2% green tea treatments resulted in cholesterol reductions of 6,1%, 10,3%, 7,7% and 11,7%, respectively, comparing with control group. However, because treatments causes an increase in yolk weight ($P<0,05$) there were no significant changes in egg total cholesterol (mg/egg). Only 2% green tea treatment results in significant reductions ($P<0,05$) in total cholesterol content in plasma.

We regard that Azorean tea (black and green tea) utilization can provide an advantage for poultry industry, to start producing eggs with low cholesterol content.

Key-words: Cholesterol, egg yolk, Azorean green tea, Azorean black tea.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE QUADROS	viii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O COLESTEROL	3
2.1.1 Estrutura.....	3
2.1.2 Síntese do colesterol	4
2.1.3 Derivados do colesterol	7
2.1.4 Esterificação do colesterol.....	7
2.1.5 Lipoproteínas do plasma.....	8
2.1.6 O colesterol na saúde humana	11
2.1.7 Alimentos utilizados na redução do colesterol no sangue	13
2.1.8 Metodologias de determinação do teor de colesterol total	16
2.2 O OVO	19
2.2.1 Estrutura.....	19
2.2.2 Composição química	20
2.2.3 Ovos com baixo teor em colesterol	21
2.3 O CHÁ	24
2.3.1 Breve história.....	24
2.3.2 A planta do chá e o seu cultivo nos Açores	24
2.3.3 Tipos de chá.....	25
2.3.4 Composição química	27
3 – MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 AMOSTRAGEM	30
3.2 PREPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS	32
3.3 RECOLHA DE DADOS	33
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COLESTEROL TOTAL NA GEMA DE OVO	33
3.4.1 Extracção de lípidos da gema de ovo	33
3.4.2 Doseamento do colesterol total.....	34
3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COLESTEROL TOTAL NO PLASMA.....	36

3.6 ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS	37
4 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	38
4.1 PESO DAS GALINHAS	38
4.2 RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE OVOS	39
4.3 VOLUME INGERIDO	40
4.4 CARACTERÍSTICAS DOS OVOS	42
4.5 TEOR DE COLESTEROL TOTAL NA GEMA DE OVO	46
4.6 TEOR DE COLESTEROL TOTAL NO PLASMA	49
5 – CONCLUSÃO	51
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	53
ANEXOS	60
A. DADOS ESTATÍSTICOS DO PESO DAS GALINHAS	60
B. DADOS ESTATÍSTICOS DO RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE OVOS	60
C. DADOS ESTATÍSTICOS DO VOLUME INGERIDO	61
a. Volume ingerido dia 1 a 29	61
b. Volume ingerido dia 30 a 40	61
c. Volume ingerido dia 41 a 62	62
D. DADOS ESTATÍSTICOS DO PESO TOTAL DO OVO	63
a. Dia 0 a 29	63
b. Dia 0 a 29 – Semanas	63
c. Dia 30 a 40	65
d. Dia 41 a 63	65
E. DADOS ESTATÍSTICOS DO PESO DA CASCA	66
a. Dia 0 a 29	66
b. Dia 0 a 29 – Semanas	66
c. Dia 30 a 40	68
d. Dia 41 a 63	69
F. DADOS ESTATÍSTICOS DO PESO DA CLARA	69
a. Dia 0 a 29	69
b. Dia 0 a 29 - Semanas	70
c. Dia 30 a 40	71
d. Dia 41 a 63	72
G. DADOS ESTATÍSTICOS DO PESO DA GEMA	72
a. Dia 0 a 29	72
b. Dia 0 a 29 - Semanas	73
c. Dia 30 a 40	74
d. Dia 41 a 63	75

H.	DADOS ESTATÍSTICOS DO TEOR DE COLESTEROL TOTAL NA GEMA DE OVO.....	75
a.	Dia 0 a 28.....	75
b.	Dia 30 a 40.....	76
c.	Dia 42 a 63.....	76
I.	DADOS ESTATÍSTICOS DO TEOR DE COLESTEROL TOTAL NO OVO.....	77
a.	Dia 0 a 28.....	77
b.	Dia 30 a 40.....	77
c.	Dia 42 a 63.....	78
J.	DADOS ESTATÍSTICOS DO TEOR DE COLESTEROL TOTAL NO PLASMA	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do colesterol e éster de colesterol (Adaptado de Champe <i>et al.</i> , 2008).....	3
Figura 2 – Formação do mevalonato a partir do 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (Adaptado de Berg <i>et al.</i> , 2006).....	4
Figura 3 – Síntese do mevalonato em 3-isopentilpirofosfato (Adaptado de Berg <i>et al.</i> , 2006).....	5
Figura 4 – Isomerização do isopentilpirofosfato em dimetilalilpirofosfato (Adaptado de Berg <i>et al.</i> , 2006).....	5
Figura 5 – Formação do escaleno a partir da molécula de dimetilalilpirofosfato (Adaptado de Berg <i>et al.</i> , 2006).....	6
Figura 6 – Síntese do colesterol a partir do lanosterol (Adaptado de Berg <i>et al.</i> , 2006).....	6
Figura 7 – Vias metabólicas de síntese dos ácidos biliares, hormonas esteróides e vitamina D (Adaptado de Gurr <i>et al.</i> , 2002).....	7
Figura 8 – Estrutura típica de uma lipoproteína (Adaptado de Champe <i>et al.</i> , 2008).....	8
Figura 9 – Esquema da síntese exógena e endógena das lipoproteínas do plasma (Adaptado de Nelson & Cox, 2004).....	9
Figura 10 – Representação de uma artéria normal (A) e de uma artéria bloqueada com placa aterosclerótica (B) (Adaptado de Berg <i>et al.</i> , 2006).....	11
Figura 11 – Principais causas de morte em Portugal (Instituto Nacional de Estatística, 2011a).....	12
Figura 12 – Estrutura do ovo: casca, membrana da casca, clara e gema (Adaptado de Mine, 2008).....	19
Figura 13 – Principais grupos estruturais de flavonóides (Paula, 2008).....	27
Figura 14 – Gaiolas individuais das galinhas.....	30
Figura 15 – Identificação das galinhas nas gaiolas.....	31
Figura 16 – Chá preto e chá verde Gorreana.....	32
Figura 17 – Pesagem das galinhas.....	33
Figura 18 – Fotografias de algumas etapas da determinação do teor de colesterol na gema de ovo.....	35
Figura 19 – Recta de calibração para o doseamento do colesterol total na gema do ovo.....	36
Figura 20 – Recta de calibração para o doseamento do colesterol no plasma utilizando o kit de diagnóstico Cholesterin CHOD-PAP-SYSL (Boehringer).....	36
Figura 21 – Volume médio diário de água (C), chá preto a 0,5% (C.P.0,5%), chá preto a 1% (C.P.1%), chá preto a 2% (C.P.2%), chá verde a 0,5 (C.V.0,5%), chá verde a 1% (C.V.1%) e chá verde a 2% (C.V.2%) ingeridos por cada grupo durante o tratamento, durante os 3 períodos estudados.....	40
Figura 22 – Concentração média do teor de colesterol total na gema de ovo (mg/g) durante 63 dias de tratamento, para os grupos controlo (C), chá preto a 0,5% (C.P.0,5%), chá preto a 1% (C.P.1%), chá	

preto a 2% (C.P.2,0%), chá verde a 0,5 (C.V.0,5%), chá verde a 1% (C.V.1%) e chá verde a 2% (C.V.2%).	46
Figura 23 – Concentração média do teor de colesterol total no ovo (mg/ovo) durante 63 dias de tratamento, para os grupos controlo (C), chá preto a 0,5% (C.P.0,5%), chá preto a 1% (C.P.1%), chá preto a 2% (C.P.2,0%), chá verde a 0,5 (C.V.0,5%), chá verde a 1% (C.V.1%) e chá verde a 2% (C.V.2%).	47

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Características das lipoproteínas do plasma (Adaptado de Berg <i>et al.</i> , 2006). Abreviaturas: TAG-Triacilgliceróis, EC-Ésteres de colesterol, CL-Colesterol livre, FL-Fosfolípidos, P-Proteína.....	9
Quadro 2 – Principais causas de morte no mundo (Adaptado de World Health Organization, 2008).....	12
Quadro 3 – Composição química média do ovo de galinha por 100g de parte edível (Adaptado de Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2007).....	20
Quadro 4 – Consumo humano anual de ovos per capita (kg/hab.), em Portugal (Adaptado de INE, 2011b).....	21
Quadro 5 – Composição química (% de matéria seca) das folhas de chá frescas e fermentadas e de chá preto preparado (Adaptado de Belitz <i>et al.</i> , 2009).	28
Quadro 6 – Composição química da ração utilizada na alimentação das galinhas.	31
Quadro 7 – Divisão das galinhas por tratamento.....	32
Quadro 8 – Efeito dos tratamentos com chá preto a 1% e 2% e com chá verde a 1% e 2% no peso final das galinhas (os resultados encontram-se sob a forma de média±SD, n=4 por tratamento).	38
Quadro 9 - Efeito dos tratamentos com chá preto a 1% e 2% e com chá verde a 1% e 2% no rendimento da produção de ovos (%) (os resultados encontram-se sob a forma de média±SD, n=4 por tratamento).39	
Quadro 10 - Efeito dos tratamentos com chá preto a 0,5%, 1% e 2% e com chá verde a 0,5% 1% e 2% no volume médio diário ingerido por cada grupo de tratamento para os três períodos estudados (os resultados encontram-se sob a forma de média±SD).	41
Quadro 11 - Efeito dos tratamentos com chá preto a 0,5%,1% e 2% e com chá verde a 0,5%, 1% e 2% no peso total do ovo, da casca, da clara e da gema (os resultados apresentam-se sob a forma de média ±SD).	44
Quadro 12 - Efeito dos tratamentos com chá preto a 0,5% e 1% e com chá verde a 0,5% e 1% no peso total do ovo, casca, clara e gema, durante as quatro primeiras semanas de tratamento (os resultados apresentam-se sob a forma de média ±SD).	45
Quadro 13 – Efeito dos tratamentos com chá preto a 0,5%, 1% e 2% e com chá verde a 0,5%, 1% e 2% no teor de colesterol total na gema de ovo e no teor de colesterol total no ovo (os resultados apresentam-se sob a forma de média ±SD).....	48

Quadro 14 – Efeito dos tratamentos com chá preto a 1% e 2% e com chá verde a 1% e 2% no teor de colesterol total no plasma das galinhas no final do tratamento (os resultados encontram-se sob a forma de média±SD).....	49
--	----

1 - INTRODUÇÃO

O chá, em particular o chá verde, é conhecido pelas propriedades anti-colesterolémicas (Maron *et al.*, 2003; Cabrera *et al.*, 2006). Alguns estudos têm demonstrado que a ingestão diária de chá pode resultar na diminuição sanguínea de colesterol total e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Tokunaga, *et al.*, 2002; Maron *et al.*, 2003). Outros estudos demonstram ainda que a ingestão de chá verde, em particular, altera a distribuição da gordura corporal, sugerindo um efeito dos componentes do chá (flavonóides e outros) no metabolismo lipídico (Cabrera *et al.*, 2006).

Estudos recentes apontam também para a possibilidade de se utilizar o chá na redução do colesterol na gema dos ovos (Azeke & Ekpo, 2009). Os ovos são um alimento muito rico e completo a nível nutricional, mas que contém um elevado teor em colesterol. Um ovo contém cerca de 200 mg de colesterol (United States Department of Agriculture, 2007) que corresponde quase ao valor máximo da ingestão diária recomendada pela Associação Americana do Coração, que é de 300 mg (Lichtenstein *et al.*, 2006). Por essa razão estabeleceu-se a ideia generalizada de que uma dieta rica em ovos (superior a 2 ovos por semana) pode conduzir a níveis de colesterol elevados na circulação sanguínea e a doenças cardiovasculares. Embora a relação causa/efeito do consumo elevado de ovos provocar um risco elevado de doenças cardiovasculares esteja ainda por demonstrar, muitos consumidores elegem os ovos com alimento a evitar. Desse modo, consistirá uma vantagem para a indústria a produção de ovos com reduzido teor em colesterol.

O presente estudo tem como objectivo determinar o efeito da inclusão na alimentação das galinhas de chá açoriano (chá preto e chá verde) na diminuição do conteúdo em colesterol da gema de ovo. Pretende-se também estudar o mecanismo pelo qual é reduzida a concentração de colesterol através da manipulação da alimentação das galinhas. Para isso serão estudados os efeitos dos tratamentos com chá preto e chá verde no teor de colesterol total na gema do ovo. Será também estudado o efeito dos tratamentos no peso das galinhas, no volume ingerido de cada tratamento, no rendimento da produção de ovos, nas características dos ovos e no teor de colesterol total no plasma das galinhas.

Esta tese encontra-se dividida em 5 capítulos. No primeiro capítulo – Introdução é feito um enquadramento do estudo, são apresentados os objectivos e é explicada a estrutura da tese.

No segundo capítulo – Revisão Bibliográfica é feita uma abordagem ao colesterol, às lipoproteínas do plasma, às doenças que podem estar associadas a valores de colesterol elevados no sangue, bem como são apresentados alguns alimentos utilizados na diminuição do teor de colesterol no sangue e num último ponto a metodologia utilizada na determinação do teor de colesterol. Apresentam-se depois as principais características do ovo, bem como alguns estudos científicos realizados com objectivo de diminuir o teor de colesterol na gema de ovo. Neste capítulo é feita ainda uma abordagem

ao chá, no que concerne à sua história, características da planta do chá, cultivo nos Açores, variedades de chá e composição química.

No terceiro capítulo – Material e Métodos é feita uma descrição da amostra estudada, são descritos os procedimentos utilizados na preparação dos tratamentos, na determinação do teor de colesterol total da gema de ovo e na determinação do teor de colesterol total no plasma. Apresentam-se ainda as ferramentas utilizadas no tratamento estatísticas dos dados.

No quarto capítulo – Apresentação e Discussão de Resultados apresentam-se, analisam-se e discutem-se os resultados obtidos para cada um dos parâmetros estudados.

No quinto e último capítulo – Conclusão, são expostas as conclusões do estudo e apresentadas sugestões para futuras investigações sobre o efeito do chá dos Açores (chá preto e chá verde) na redução do teor de colesterol total na gema do ovo.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O COLESTEROL

2.1.1 Estrutura

O colesterol é um esteroide incluído no grupo dos lípidos e característico dos tecidos animais. Os tecidos vegetais sintetizam uma mistura de esteróides designados por fitoesteróides, como sejam o β -sitosterol, ergosterol e estigmasterol (Geissler & Powers, 2005).

A molécula do colesterol pode aparecer na sua forma livre (não esterificada) ou esterificada com um ácido gordo, como representado na Figura 1. Sabe-se que cerca de 30% do teor de colesterol no plasma apresenta-se na forma livre, enquanto o restante está na forma esterificada (Devlin, 2007).

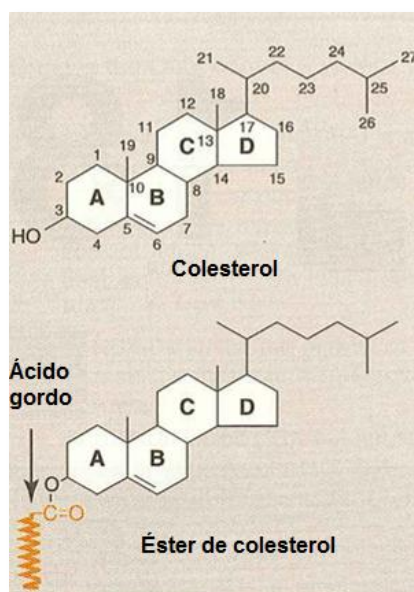


Figura 1 – Estrutura do colesterol e éster de colesterol (Adaptado de Champe *et al.*, 2008).

A molécula de colesterol, na sua forma livre, é constituída por quatro anéis que formam os núcleos esteróides, por uma cadeia alifática em C-17, por dois grupos metilo em C-10 e C-13, por uma dupla ligação entre C-5 e C-6 e por um grupo hidroxilo em C-3. A forma esterificada do colesterol, também designada por éster de colesterol, caracteriza-se por possuir um ácido gordo no carbono C-3, que torna a molécula ainda mais hidrofóbica.

2.1.2 Síntese do colesterol

O colesterol presente no organismo pode ser obtido por duas formas: por via exógena, através da ingestão de alimentos ricos em colesterol (alimentos de origem animal), ou por via endógena por síntese do colesterol. A síntese de colesterol ocorre em todas as células, mas é o fígado que tem um papel principal nesta síntese (Devlin, 2007). A síntese de colesterol inicia-se com o acetil-CoA e desenrola-se em 3 passos principais, que são apresentados de seguida.

1º Formação do mevalonato:

A síntese do mevalonato inicia-se com a formação do 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Este composto é formado a partir de duas moléculas de acetil-CoA que catalisadas pela tiolase formam a acetacetil-CoA. Esta molécula previamente formada condensa-se com uma terceira molécula de acetil-CoA, dando origem ao composto 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). O HMG-CoA presente no citoplasma, ao ser reduzido pela HMG-CoA redutase, que consome duas moléculas de NADPH e liberta CoA, converte-se em mevalonato (Devlin, 2007). Esta última reacção é irreversível e limitante na formação do colesterol (Champe *et al.*, 2008). Na matriz mitocondrial o HMG-CoA é um precursor dos corpos cetónicos, por reacção da HMG-CoA liase (Broody, 1999).

Todas as reacções acima descritas encontram-se esquematizadas na Figura 2.

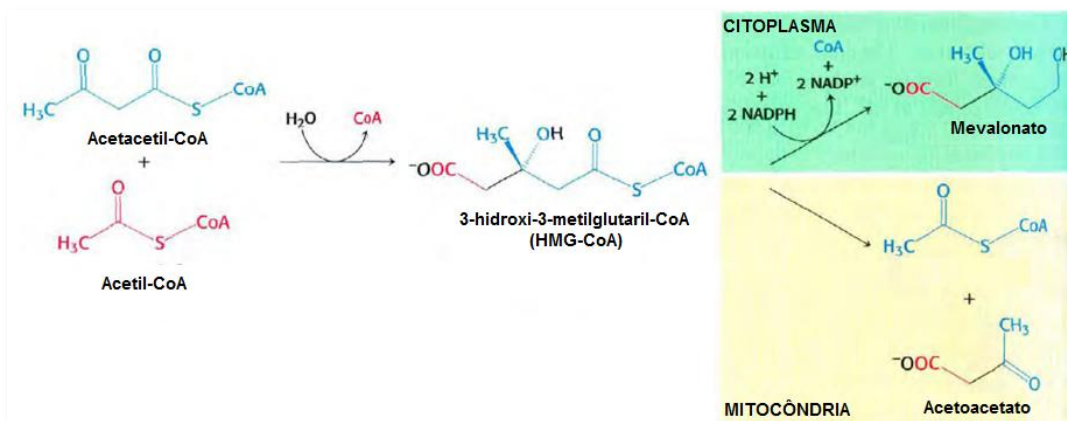


Figura 2 – Formação do mevalonato a partir do 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (Adaptado de Berg *et al.*, 2006).

2º Conversão do mevalonato em escaleno:

A segunda etapa da síntese do colesterol é a conversão do mevalonato em escaleno. O mevalonato é transformado em 3-isopentilpirofosfato, numa série de reacções que consomem ATP e envolvem fosforilação e descarboxilação (Broody, 1999), e que se encontram representadas na Figura 3.

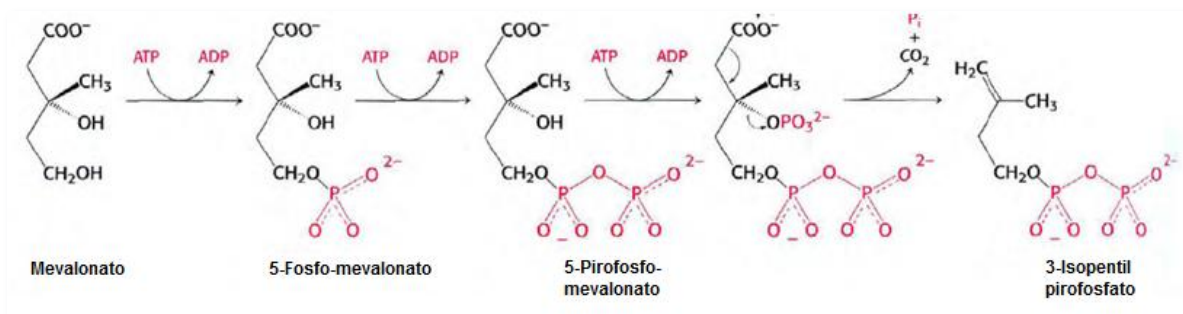


Figura 3 – Síntese do mevalonato em 3-isopentilpirofosfato (Adaptado de Berg *et al.*, 2006).

A molécula de 3-isopentilpirofosfato é depois isomerizada em dimetilalilpirofosfato, reacção esta que se encontra representada na Figura 4.

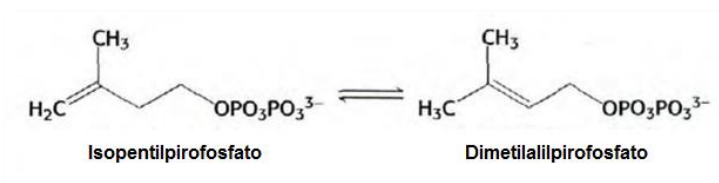


Figura 4 – Isomerização do isopentilpirofosfato em dimetilalilpirofosfato (Adaptado de Berg *et al.*, 2006).

De seguida estes dois intermediários condensam-se produzindo uma molécula de geranylpirofosfato (C_{10}). Uma nova molécula de isopentilpirofosfato reage com o composto formado anteriormente, originando a molécula de farnesilpirofosfato (C_{15}). O escaleno (C_{30}) forma-se então por condensação de duas moléculas de farnesilpirofosfato, numa reacção que requer NADPH e liberta dois grupos pirofosfato (Broody, 1999). Estas reacções encontram-se representadas na Figura 5.

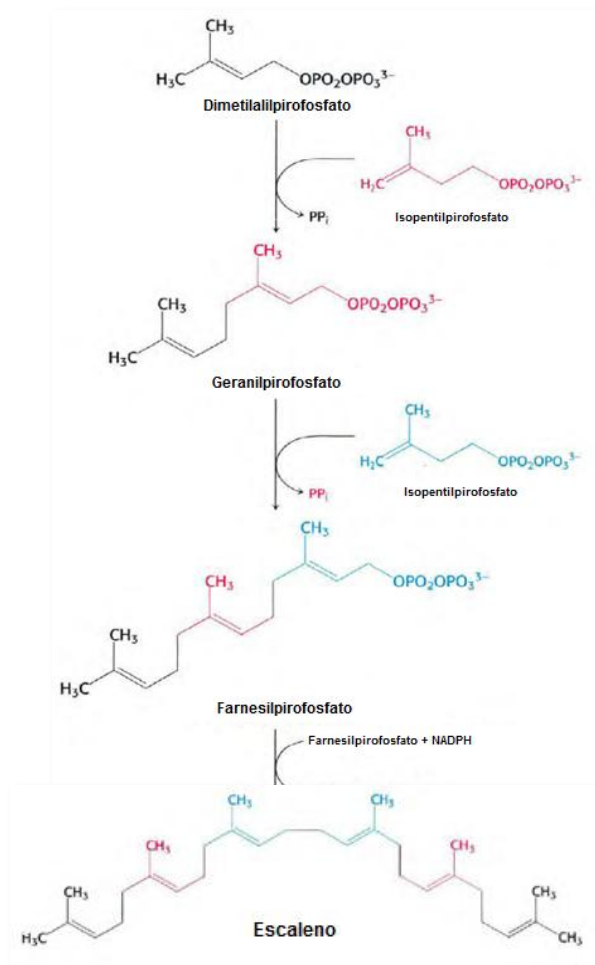


Figura 5 – Formação do esceleno a partir da molécula de dimetilalilpirofosfato (Adaptado de Berg *et al.*, 2006).

3º Conversão do esceleno em colesterol:

A última etapa da síntese do colesterol começa com a ciclização do esceleno. Forma-se a molécula esceleno 2,3-epóxido numa reacção que requer oxigénio molecular e NADPH. O epóxido de esceleno é depois convertido em lanosterol por intermédio de uma ciclase. O lanosterol transforma-se depois em colesterol, como representado na Figura 6, por diversas reacções que incluem: remoção do grupo metilo de C-14, remoção de dois grupos metilo em C-4, migração da dupla ligação de C-8 para C-5 e redução da dupla ligação entre C-24 e C-25 da cadeia lateral (Devlin, 2007).

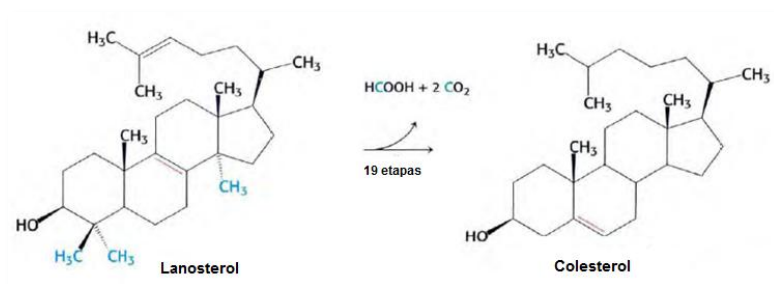


Figura 6 – Síntese do colesterol a partir do lanosterol (Adaptado de Berg *et al.*, 2006).

2.1.3 Derivados do colesterol

Além de constituir um componente importante das membranas celulares, conferindo fluidez às membranas dos tecidos animais, o colesterol é também o precursor das hormonas esteróides, dos ácidos biliares e seus sais (Gurr *et al.*, 2002) e da vitamina D (Champe *et al.*, 2008).

Os ácidos biliares são sintetizados no fígado a partir do colesterol. As hormonas esteróides incluem os gestagénios de que a progesterona é um exemplo, as hormonas sexuais, como os androgénios e estrogénios, os glucocorticoides (cortisol) e mineralcorticoides (aldosterona). O colesterol fornece ainda o substrato para a produção fotoquímica da vitamina D (Devlin, 2007). Na Figura 7 encontram-se ilustradas as vias metabólicas de transformação do colesterol em ácidos biliares, hormonas esteróides e vitamina D.

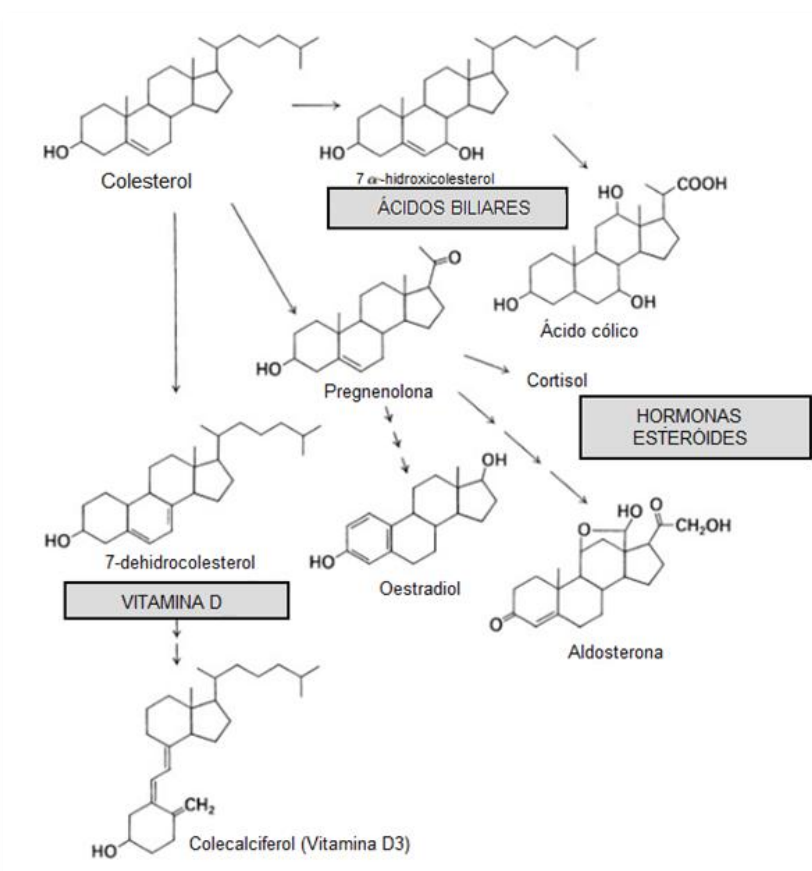


Figura 7 – Vias metabólicas de síntese dos ácidos biliares, hormonas esteróides e vitamina D (Adaptado de Gurr *et al.*, 2002).

2.1.4 Esterificação do colesterol

O excesso de colesterol é armazenado sob a forma de éster de colesterol, a forma esterificada do colesterol. Esta esterificação é realizada pela enzima acil transferase (acilCoA:colesterol acil transferase - ACAT) que se situa no retículo endoplasmático. O éster de colesterol caracteriza-se por possuir um ácido gordo no carbono C-3. Deste modo, a enzima ACAT mantém no nível de “colesterol livre” adequado, esterificando o colesterol em excesso (Geissler & Powers, 2005).

2.1.5 Lipoproteínas do plasma

Devido à sua propriedade hidrofóbica, o colesterol e os seus ésteres não conseguem ser transportados livremente no sangue, necessitando para isso de uma estrutura especializada: as lipoproteínas do plasma.

As lipoproteínas do plasma, cuja estrutura típica se encontra representada na Figura 8, são partículas esféricas que possuem um núcleo hidrofóbico de triacilgliceróis e ésteres de colesterol, e uma superfície hidrofílica de fosfolípidos e colesterol livre (não esterificado). A superfície exterior é também composta por proteínas específicas, as apoproteínas. As apoproteínas são sintetizadas no fígado (Berg *et al.*, 2006) e têm como principal função manter a solubilidade das lipoproteínas, reconhecer e interagir com receptores específicos na superfície celular (Geissler & Powers, 2005) e servir como activadores ou co-enzimas para enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas (Champe *et al.*, 2008). Os fosfolípidos e as apoproteínas presentes à superfície das lipoproteínas é que as tornam hidrossolúveis (Devlin, 2007).

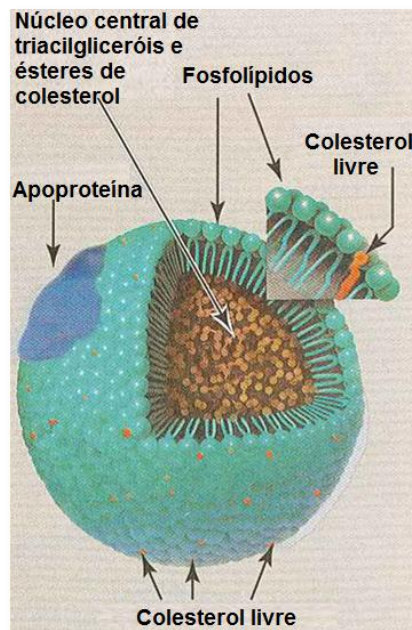


Figura 8 – Estrutura típica de uma lipoproteína (Adaptado de Champe *et al.*, 2008).

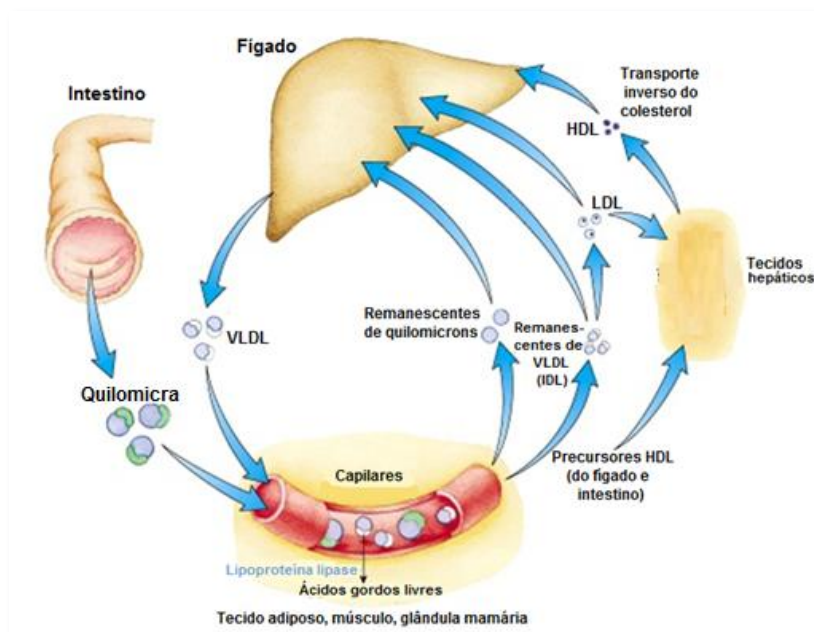
As lipoproteínas do plasma classificam-se, de acordo com a sua densidade crescente, em quilomicra, remanescente de quilomicra, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de densidade elevada (HDL) (Berg *et al.*, 2006). Estas partículas diferem entre si no que diz respeito à densidade, diâmetro e composição. No Quadro 1 encontram-se descritas algumas das características das lipoproteínas do plasma.

Quadro 1 – Características das lipoproteínas do plasma (Adaptado de Berg *et al.*, 2006). Abreviaturas: TAG-Triacilgliceróis, EC-Ésteres de colesterol, CL-Colesterol livre, FL-Fosfolípidos, P-Proteína.

	Densidade (g/ml)	Diâmetro (nm)	Apoproteína	Composição (%)				
				TAG	EC	CL	FL	P
Quilomicron	<0,95	75-1200	B48, C, E	86	3	1	8	2
Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL)	0,95-1,006	30-80	B100, C, E	52	14	7	18	8
Lipoproteína de densidade intermédia (IDL)	1,006-1,019	15-35	B100, E	38	30	8	23	11
Lipoproteína de baixa densidade (LDL)	1,019-1,063	18-25	B100	10	38	8	22	21
Lipoproteína de alta densidade (HDL)	1,063-1,21	7,5-20	A	5-10	14-21	3-7	19-29	33-57

As lipoproteínas podem ter uma origem exógena ou endógena. Estas duas vias encontram-se representadas na Figura 9.

Após ingestão dos alimentos, os triacilgliceróis, colesterol e outros lípidos provenientes da dieta alimentar são absorvidos no intestino delgado e agrupados nos quilomicra, que transportam estes componentes desde o intestino delgado até ao tecido adiposo e muscular, através da corrente sanguínea. (Geissler & Powers, 2005). Nos tecidos capilares, a lipoproteína-lipase (LPL) hidrolisa os triacilgliceróis e liberta os ácidos gordos do quilomicron, ácidos gordos estes que são rapidamente absorvidos pelo tecido adiposo, músculo e glândulas mamárias. A partícula resultante da hidrólise anterior, continua a sofrer a acção da LPL que hidrolisa os triacilgliceróis, colesterol, fosfolípidos e apoproteínas, e transforma-se numa molécula designada por remanescente de quilomicron, rica em colesterol, e que é incorporada pelo fígado (Geissler & Powers, 2005).

**Figura 9** – Esquema da síntese exógena e endógena das lipoproteínas do plasma (Adaptado de Nelson & Cox, 2004).

O fígado desempenha um papel essencial na síntese do colesterol. As moléculas de triacilgliceróis e colesterol em excesso no fígado são libertadas por este para a corrente sanguínea sob a forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (Berg *et al.*, 2006). As VLDL são hidrolisadas, tal como os quilomicra, pela LPL nos capilares do tecido adiposo, muscular e glândula mamária, originando as lipoproteínas de densidade intermédia (IDL), partículas ricas em ésteres de colesterol. As IDL podem ser encaminhadas para dois destinos diferentes: podem ser captadas pelo fígado ligando-se através das apoproteínas E e B-100, a receptores da membrana do fígado, ou ser transformadas em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Geissler & Powers, 2005), como ilustrado na Figura 9.

As LDL continuam a circular no sangue, podendo incorporar o colesterol em vários tecidos ou ser absorvidas pelo fígado ligando-se através da apoproteína B-100 a receptores específicos, designados receptores LDL (Figura 9). Como a afinidade entre a apoproteína B-100 e os receptores é baixa, as LDL ficam mais tempo em circulação (Broody, 1999). As LDL têm como função o transporte do colesterol para os tecidos periféricos e são utilizadas na síntese dos esteróides a partir do colesterol (Berg *et al.*, 2006).

Como foi anteriormente referido, as LDL são incorporadas na membrana plasmática do fígado, através de receptores localizados nesta, também designados receptores LDL. Os receptores reconhecem a apoproteína B-100 e incorporam as LDL em vesículas, por endocitose. Estas vesículas fundem-se com as lisossomas que possuem enzimas líticas. Os receptores separam-se das LDL e voltam à superfície da membrana. As LDL são então hidrolisadas libertando aminoácidos, ácidos gordos e colesterol “livre”. O colesterol “livre” inibe a HMG-CoA redutase e suprime a síntese da enzima, ao mesmo tempo que activa a enzima acil transferase (acilCoA:colesterol acil transferase-ACAT) levando à formação dos ésteres de colesterol. O colesterol que se vai acumular na célula condiciona a síntese de novos receptores, bloqueando a incorporação do colesterol proveniente das LDL e aumentando os níveis das LDL no sangue (Devlin, 2007).

As lipoproteínas de densidade elevada (HDL) são sintetizadas principalmente pelo fígado, mas também pelo intestino, embora em menor quantidade. Estas são responsáveis pelo transporte inverso do colesterol, isto é, o excesso de colesterol que exista nas células é transportado para o fígado ou para os tecidos que necessitam de colesterol (Broody, 1999), como ilustrado na Figura 9. As HDL que sejam encaminhadas para o fígado podem ser excretadas por este juntamente com a bÍlis na forma de colesterol ou após conversão podem ser excretadas em sais biliares (Devlin, 2007).

O colesterol nas membranas celulares aparece na sua forma livre. Após a morte celular, este é removido e transferido para as HDL em circulação através da sua esterificação pela lecitina: colesterol acil transferase (LCAT), enzima que é sintetizada pelo fígado (Broody, 1999). Esta esterificação contínua faz com que as HDL alterem a sua forma inicial de disco para uma forma esférica. Os ésteres de colesterol que se vão formando ficam agrupados no núcleo das HDL, passando as HDL a funcionar como “esponjas de colesterol” (Geissler & Powers, 2005).

2.1.6 O colesterol na saúde humana

Os níveis elevados de colesterol na circulação sanguínea estão geralmente associados às doenças cardiovasculares. As principais consequências das doenças cardiovasculares são o enfarte do miocárdio e o acidente vascular cerebral (AVC).

O aumento das LDL no sangue, além de provocar a deposição do colesterol em vários tecidos pode levar à aterosclerose. A aterosclerose é uma lesão patológica que se caracteriza pela formação de placas de colesterol, também designadas por placas ateroscleróticas, nas artérias e que tendem a obstruí-las (Geissler & Powers, 2005), dificultando a circulação sanguínea e causando as doenças cardiovasculares. Na Figura 10 encontra-se representada uma placa aterosclerótica.

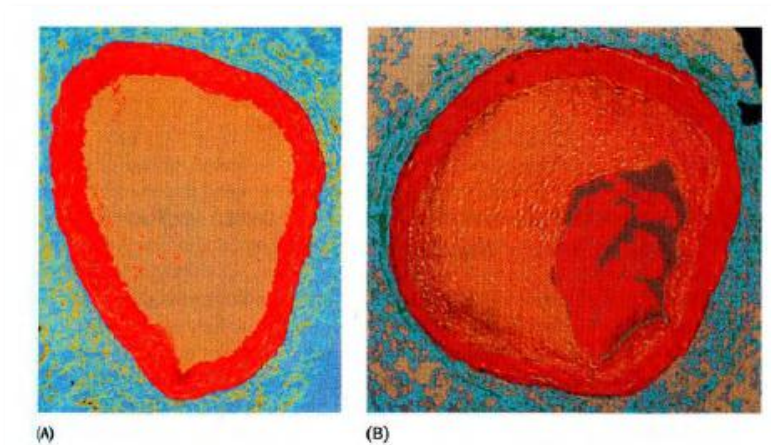


Figura 10 – Representação de uma artéria normal (A) e de uma artéria bloqueada com placa aterosclerótica (B)
(Adaptado de Berg *et al.*, 2006).

A Sociedade Europeia de Aterosclerose recomenda que a concentração de colesterol total no sangue deve ser inferior a 5 mmol/L (190 mg/dL), e a concentração do colesterol LDL inferior a 3 mmol/L (115 mg/dL). Estudos clínicos demonstraram que uma redução de 10% na concentração total de colesterol no plasma reduz em 25% na incidência de doença coronária após 5 anos e uma redução das LDL de 1 mmol/L (~40 mg/dL) é acompanhada por uma redução em 20% no risco de vir a sofrer um ataque cardíaco ou um AVC (European Society of Cardiology, 2007).

Segundo dados da World Health Organization relativos a 2008, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. No Quadro 2 encontram-se listadas as principais causas de morte no mundo.

Quadro 2 – Principais causas de morte no mundo (Adaptado de World Health Organization, 2008).

	<i>Mortes (milhões)</i>	<i>% de mortes</i>
Doença isquémica cardíaca	7,25	12,8
Acidente vascular cerebral e outras doenças cerebrovasculares	6,15	10,8
Infecções respiratórias	3,46	6,1
Doença pulmonar obstrutiva crónica	3,28	5,8
Doenças diarréicas	2,46	4,3
VIH/SIDA	1,78	3,1
Cancro da traqueia, brônquios e pulmão	1,39	2,4
Tuberculose	1,34	2,4
Diabetes <i>mellitus</i>	1,26	2,2
Acidentes rodoviários	1,21	2,1

Em Portugal, dados do Instituto Nacional de Estatística referentes a 2009 revelam que as doenças do aparelho circulatório, nas quais se incluem as doenças cardiovasculares, são responsáveis por 31,9% das mortes. Na Figura 11 estão representadas as principais causas de morte em Portugal.

	<i>%</i>	
1º Doenças do aparelho circulatório	31,9	<i>Diseases of the circulatory system</i>
2º Tumores malignos	23,2	<i>Malignant neoplasms</i>
3º Doenças do aparelho respiratório	11,6	<i>Diseases of the respiratory system</i>
4º Outras causas por doenças	11,3	<i>Other causes resulting from diseases</i>
5º Sintomas, sinais, exames anormais, causas mal definidas	9,4	<i>Symptoms, signs, abnormal findings, ill-defined causes</i>
	<i>%</i>	

Figura 11 – Principais causas de morte em Portugal (Instituto Nacional de Estatística, 2011a).

O aumento do teor de colesterol no sangue pode ser devido a dois factores: uma deficiência genética nos receptores das LDL – hipercolesterolemia familiar, ou devido a uma dieta alimentar rica em lípidos e colesterol.

O valor máximo da ingestão diária de colesterol recomendado pela Associação Americana do Coração é de 300 mg (Lichtenstein *et al.*, 2006). Na alimentação humana o colesterol encontra-se principalmente nas gorduras animais, sendo que os principais alimentos identificados como fontes de colesterol são os ovos, os produtos lácteos e as carnes vermelhas. O excesso de colesterol da dieta alimentar reduz a síntese dos receptores LDL, levando ao aumento da concentração destas lipoproteínas no sangue, com o conseqüente aumento no teor de colesterol total (Devlin, 2007).

A hipercolesterolemia familiar é uma doença que se caracteriza por uma deficiência no gene responsável pela síntese dos receptores LDL, o que faz com que estes não sejam sintetizados ou existam em pouca quantidade, resultando na ausência de ligação das LDL aos receptores, aumentando os níveis destas lipoproteínas no sangue (Devlin, 2007).

2.1.7 Alimentos utilizados na redução do colesterol no sangue

A preocupação dos investigadores tem sido crescente na pesquisa de alimentos que possam baixar o teor de colesterol no sangue. Neste sentido têm sido realizados diversos estudos com o objectivo de determinar o efeito de certos alimentos na diminuição do teor de colesterol no plasma sanguíneo, como sejam o alho, os cominhos, a inulina, os produtos lácteos enriquecidos com fitoesteróis e o chá.

Alho

O alho (*Allium sativum*) encontra-se difundido e é utilizado em todo o mundo como especiaria e planta medicinal, sendo utilizado na prevenção e tratamento de variadas doenças, desde infecções a doenças do coração.

Nos últimos anos têm sido estudados os seus efeitos na redução do teor de colesterol no sangue. O alho possui diversos compostos biologicamente activos responsáveis pelas suas propriedades terapêuticas, como a alicina. Este composto é responsável pela redução dos níveis de colesterol no sangue, triglicérides e lipoproteínas LDL, sendo utilizado para tratar e prevenir doenças cardiovasculares (Canogullari *et al.*, 2009). Estudos com animais sugerem que dietas suplementadas com alho podem inibir a síntese do colesterol e ácidos gordos no fígado (Yeh & Liu, 2001 *in* Azeke & Ekpo, 2009).

Cominhos pretos

As sementes de cominhos pretos (*Nigella Sativa L.*) crescem na Ásia e nos países do Mediterrâneo (Aydin *et al.*, 2008) e são principalmente utilizadas como especiaria (Goreja, 2003). Estão referenciadas como tendo propriedades biológicas como sejam contra a asma, anti-tumor, anti-parasitária, anti-diabética, diurética e actividade bactericida (Yalçin *et al.*, 2009).

Gargari *et al.* (2009) estudaram o efeito das sementes de cominhos pretos no perfil lipídico do soro, na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante de coelhos hiperlipidémicos. Utilizaram 24 coelhos que antes do início do tratamento e durante um mês foram sujeitos a uma dieta alimentar rica em 0,5% de colesterol. De seguida foram divididos em dois grupos: o grupo de controlo, tratado com uma dieta alimentar com 0,5% de colesterol, e o grupo das sementes de cominhos pretos, que foram alimentados com 7,5g/kg /dia de sementes de cominhos pretos esmagadas juntamente com uma dieta alimentar com 0,5% de colesterol, durante 2 meses.

A concentração de colesterol total, triglicérides e lipoproteínas LDL no soro diminuiu significativamente no grupo alimentado com sementes de cominhos em 46,7%, 32,6% e 48,2%, respectivamente, quando comparados com o grupo de controlo. Demonstraram assim que uma dieta alimentar com sementes de cominhos pretos diminui o perfil lipídico no soro em coelhos hiperlipidémicos.

Inulina

A inulina é um polissacárido de frutose de origem vegetal, com 2-60 unidades de frutose ligadas entre si por ligações $\beta(1-2)$ (Gibson & Williams, 2000). Pode ser encontrada na cebola, no alho, nas raízes da chicória, de onde é extraída industrialmente, e também na alcachofra (Williams, 1999). É uma fibra alimentar solúvel que pode ser utilizada na indústria como adoçante uma vez que tem um poder adoçante que corresponde a 15% do da sacarose, ou pode ser utilizada para melhorar a textura dos alimentos, em substituição dos lípidos (Gibson & Williams, 2000).

Têm sido realizados diversos estudos para comprovar as propriedades da inulina. Além da sua influência positiva no equilíbrio da microflora intestinal, onde estimula o crescimento das bifidobactérias, a inulina tem sido referenciada também como responsável pela diminuição do teor de colesterol total e triglicérides do plasma do sangue (Gibson & Williams, 2000).

Produtos lácteos enriquecidos com fitoesteróis

Como referenciado anteriormente, os fitoesteróis são as moléculas esteróides dos tecidos vegetais. Recentemente têm surgido no mercado produtos lácteos enriquecidos com fitoesteróis, cujo objectivo é a redução do teor de colesterol no plasma. Os alimentos que, para além da função básica de nutrir, têm também outras funções benéficas para a saúde, são designados alimentos funcionais, e os produtos lácteos enriquecidos com fitoesteróis são um exemplo destes alimentos (Gonçalves *et al.*, 2007).

As características dos fitoesteróis em reduzir o colesterol no plasma são conhecidas desde cerca de 1950, quando foi testada a propriedade de redução do colesterol pelo consumo de fitoesteróis na sua forma cristalina. Com o passar dos anos foi descoberto que, se os fitoesteróis estiverem dissolvidos em produtos alimentares, aumentam a eficiência da redução do teor de colesterol no plasma (Gonçalves *et al.*, 2007).

Em 2004, Clifton *et al.* estudaram o efeito de 4 alimentos enriquecidos com fitoesteróis (pão, cereais, leite e iogurte) nos lípidos do soro e fitoesteróis do plasma. A população alvo era constituída por homens e mulheres com hipercolesterolemia média, divididos por 3 centros de investigação. Os tratamentos foram divididos em 4 períodos de 3 semanas cada, em que um dos períodos era um período de controlo. Durante cada período os indivíduos em teste ingeriram o equivalente a 1,6g/dia de fitoesteróis como ésteres de esterois. Findo o período de tratamento, os autores demonstraram que o efeito dos fitoesteróis na redução do teor de colesterol depende do alimento no qual estão inseridos.

O consumo de alimentos enriquecidos com fitoesteróis reduziu significativamente os níveis de colesterol total e das lipoproteínas LDL do soro: o leite reduziu 8,7 e 15,9% e o iogurte reduziu 5,6 e 8,6%, respectivamente. Com o consumo de pão e de cereais houve uma diminuição de 6,5% e 4,5% respectivamente, na concentração das lipoproteínas LDL do soro, tendo estes dois alimentos sido menos eficazes nesta redução do que o leite enriquecido com fitoesteróis, que foi quase 3 vezes mais eficaz. Houve também um aumento das concentrações de fitoesteróis no plasma nos grupos que foram alimentados com leite e pão enriquecidos com fitoesteróis (sitosterol aumentou 17% e 23% e o campesterol aumentou 48% e 52%, respectivamente).

Em 2007 também Gonçalves *et al.* investigaram a redução do teor de colesterol no plasma, utilizando o leite como meio para dissolução dos fitoesteróis. Estudaram 22 indivíduos saudáveis e 19 indivíduos com hipercolesterolemia, aos quais foi administrado leite enriquecido em fitoesteróis (2g/dia). O grupo de controlo foi constituído por 15 indivíduos com hipercolesterolemia. Após 15 dias de tratamento, o grupo de indivíduos saudáveis demonstrou uma diminuição do colesterol total e das lipoproteínas LDL no plasma de 8,3% e 11%, respectivamente. Após 30 dias de estudo não foram notadas alterações significativas nestes parâmetros. Os indivíduos que sofriam de hipercolesterolemia e foram tratados com o leite enriquecido em fitoesteróis, após 15 dias de tratamento demonstraram uma diminuição no teor de colesterol total e nas lipoproteínas LDL do plasma de 9,6% e 12,2%, respectivamente. Concluíram assim que o leite enriquecido com fitoesteróis tem papel activo na redução do teor de colesterol do plasma de indivíduos normais e hipercolesterolémicos.

Chá

Bingham *et al.* (1997) estudaram o efeito da ingestão de seis chávenas diárias de chá preto nos lípidos do sangue e na pressão arterial de homens e mulheres de meia-idade, durante um período de 4 semanas. Não foram detectadas alterações nos valores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL), triacilgliceróis e na pressão arterial, quando comparados com o grupo de controlo.

Yang e Koo (1997) testaram os efeitos de chás chineses, com diferentes graus de fermentação, na redução do teor de colesterol no sangue de ratos. Para tal utilizaram ratos com um nível aumentado de colesterol no sangue, resultado de um tratamento com uma dieta enriquecida em colesterol, durante 1 semana. Findo esse período, os ratos foram tratados durante 8 semanas com extractos de diferentes chás e com uma dieta enriquecida em colesterol. Estes autores concluíram que os ratos tratados com chás com menor grau de fermentação apresentam uma diminuição significativa dos valores de colesterol no sangue e fígado. No referido estudo, os valores do colesterol HDL e os níveis de triglicérideos não foram afectados significativamente. Os chás responsáveis por uma maior redução do teor de colesterol possuíam valores mais elevados de catequinas, após análise por HPLC, quando comparados com os outros chás em estudo. Assim, estes chás podem levar a uma maior inibição da absorção de lípidos no

intestino, o que pode prevenir um aumento excessivo dos níveis de colesterol no sangue e a acumulação de lípidos no fígado.

Maron *et al.* (2003) estudaram o impacto de um extracto de chá verde enriquecido com teaflavina nos lípidos e lipoproteínas de um grupo de 240 homens e mulheres, com idades superiores a 18 anos, que sofriam de hipercolesterolemia média a moderada, durante 12 semanas. Concluíram que o extracto de chá verde enriquecido com teaflavina é um complemento eficaz de uma dieta pobre em gorduras saturadas, de forma a reduzir o teor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na população estudada.

Num estudo mais recente, Wang *et al.* (2010) investigaram a relação entre o consumo de chá verde e a doença arterial coronária, numa amostra da população chinesa. Concluíram que o consumo de chá verde está associado a uma menor incidência de doenças cardíacas em pacientes chineses do sexo masculino, mas não em pacientes do sexo feminino.

2.1.8 Metodologias de determinação do teor de colesterol total

Extracção dos lípidos

O primeiro passo para a determinação do teor de colesterol consiste na extracção dos lípidos totais do tecido. O isolamento de lípidos a partir de um tecido natural baseia-se no facto de serem menos polares que a maioria dos componentes da célula. Podem assim ser extraídos selectivamente com solventes orgânicos, sendo que os solventes são escolhidos de acordo com a natureza dos lípidos presentes e de acordo com o tipo de amostra (tecido animal ou vegetal) (Holme & Peck, 1998). O método mais utilizado na extracção de "lípidos totais" é o método de Folch *et al.* (1957), em que a extracção é geralmente feita com uma mistura clorofórmio:metanol (2:1). O metanol quebra as ligações lípido-proteína e inactiva as lipases e o clorofórmio dissolve os lípidos. A amostra é homogeneizada com a mistura de solventes, seguindo-se uma filtração que permite separar a parte sólida. O filtrado é posto em contacto com uma solução salina (CaCl_2), em conjunto com uma nova mistura de solventes, obtendo-se um sistema difásico. A presença do sal facilita a extracção de contaminantes não lipídicos para a fase aquosa, diminuindo também a tendência de dissociação dos lípidos com carácter ácido, que se mantêm deste modo na fase orgânica (Holme & Peck, 1998).

Os lípidos totais extraídos deste modo podem ser posteriormente analisados para a quantificação do "colesterol total" (colesterol livre + ésteres do colesterol).

Os solventes utilizados na extracção dos lípidos, como por exemplo o clorofórmio:metanol, são no geral adequados para a extracção de todos os tipos de lípidos. No entanto, através de métodos cromatográficos conseguem-se extrair diferentes classes lipídicas selectivamente, consoante a sua solubilidade, através da adição de um solvente (Holme & Peck, 1998).

Os princípios da cromatografia baseiam-se na separação dos componentes de uma mistura através da partição destes por duas fases: uma móvel e uma estacionária. São possíveis vários pares de fases, sendo as mais comuns líquido-sólido e gás-líquido (Gurr et al., 2002). Existem duas formas geométricas para a fase estacionária: em coluna ou em filme, também designado por camada fina.

Doseamento do colesterol

A última etapa para a determinação do teor de colesterol total é o doseamento. Este pode ser realizado por métodos químicos, por métodos enzimáticos, por cromatografia gasosa (GC) ou por HPLC (cromatografia líquida de alta eficácia).

Métodos químicos

Dos métodos químicos existentes o mais utilizado é o método de Liebermann-Burchard (Tel & Berends, 1980). Este método tem como fundamento a reacção do colesterol e seus ésteres com anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado, da qual resulta a formação de um complexo corado de azul esverdeado, que é posteriormente doseado por espectrofotometria a 550 nm (Aurand *et al.*, 1987). Este método é sensível à luz, à temperatura e a pequenas quantidades de humidade (Beyer & Jensen, 1989).

Existem outros métodos químicos para doseamento do colesterol, como por exemplo o método de Zlatkis *et al.* (1958), no qual o colesterol reage com o cloreto férrico (FeCl_3). Alguns autores indicam que este método tem como desvantagem o facto de sobrestimar o valor de colesterol devido à presença de ácidos gordos polinsaturados e de ser menos exacto na determinação do teor de colesterol devido à interferência de proteínas, esteróides e vitamina A (Beyer & Jensen, 1989).

Com o objectivo de reduzir as interferências referidas anteriormente, Searcy & Bergquist (1960) propuseram um novo método em que substituíram o FeCl_3 por sulfato ferroso (FeSO_4), no entanto não conseguiram eliminar os problemas de interferências (Beyer & Jensen, 1989).

Os métodos químicos têm como desvantagem o facto de serem métodos, morosos e que envolvem reagentes corrosivos (Holme & Peck, 1998; Pasin *et al.*, 1998). Estes métodos sobrestimam o valor do colesterol devido à interferência de outras substâncias presentes na amostra a analisar, sendo necessária a extracção e purificação prévia do colesterol (Beyer & Jensen, 1989). Uma das principais vantagens dos métodos químicos é o facto de serem pouco dispendiosos e não necessitarem de equipamentos sofisticados, comparativamente aos métodos por GC ou HPLC.

Métodos enzimáticos

Os métodos enzimáticos são mais simples, precisos e fiáveis que os métodos químicos. São métodos geralmente rápidos e que não envolvem reagentes corrosivos, sendo no entanto mais dispendiosos (Holme & Peck, 1998; Pasin *et al.*, 1998).

Estes métodos baseiam-se na hidrólise do éster de colesterol (colesterol esterificado) em colesterol que depois é oxidado em 4-Colesten-3-ona, com produção de peróxido de hidrogénio. Qualquer um dos produtos resultantes da reacção, 4-Colesten-3-ona ou peróxido de hidrogénio, podem ser medidos sendo

a sua concentração proporcional à quantidade de colesterol inicial. A 4-Colesten-3-ona tem uma absorvância máxima a 240nm, sendo que a sua concentração pode ser calculada a partir do coeficiente de absorção molar, não necessitando assim de soluções padrão de colesterol. Em alternativa é medido o peróxido de hidrogénio produzido, sendo o método mais comum a medição do composto corado (iminoquinona), resultante da reacção de 4-Amino-antiprina e p-Hidroxibenzeno-sulfonato na presença da peroxidase. Este composto apresenta uma absorvância máxima de 500nm (Holme & Peck, 1998).

Recentemente tem sido utilizada a fluorimetria, como meio de detecção nos métodos enzimáticos em substituição da espectrometria visível (500nm). A fluorimetria é uma técnica que se baseia na capacidade de determinados compostos químicos emitirem fluorescência, quando há emissão de radiação (Pomeranz & Meloan, 2000).

A principal vantagem da fluorimetria é a possibilidade de medição de quantidades na ordem dos nanogramas. Este método tem como desvantagem o facto de existir uma série de substâncias e condições que podem inibir a emissão da radiação fluorescente e interferir nos resultados (Holme & Peck, 1998).

Cromatografia gasosa (GC)

A cromatografia gasosa (GC), também designada cromatografia gás-líquido (CGL) constitui um dos principais métodos de separação e identificação dos lípidos. A cromatografia gasosa (GC) apenas pode ser utilizada para compostos que possam ser volatilizados sem decomposição (Gurr *et al.*, 2002), sendo muito utilizada na análise de lípidos pois permite a separação de compostos muito semelhantes dentro da mesma classe lipídica (Holme & Peck, 1998). Por essa razão tem sido também aplicada no doseamento do colesterol.

HPLC (cromatografia líquida de alta eficácia)

A cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC) é uma técnica de cromatografia em coluna que foi também aplicada na separação e análise dos lípidos. O sistema de HPLC caracteriza-se por utilizar uma fase móvel líquida e uma fase estacionária cujas colunas são constituídas por partículas compactadas de tamanho reduzido que opera a pressões elevadas, com vista a obter um fluxo elevado (Holme & Peck, 1998). Ao serem utilizadas partículas de menor dimensão no interior da coluna, a área de adsorção é também maior o que faz com que a separação dos componentes da amostra seja mais eficiente.

O método HPLC tem sido recentemente utilizado no doseamento do teor de colesterol. Este é identificado como sendo o método de determinação do teor de colesterol mais consistente devido à sua sensibilidade e precisão (Osman & Chin, 2006), no entanto é um dos métodos mais caros, devido ao investimento necessário para a aquisição dos equipamentos.

Beyer e Jensen (1989) compararam diferentes metodologias para a determinação do colesterol na gema de ovo e concluíram que a maioria dos métodos colorimétricos utilizados (químicos e enzimáticos) sobrestimava o conteúdo em colesterol em comparação com o método por HPLC. Obtiveram 10,97 mg de colesterol por g de gema por HPLC em comparação com 13,9 mg/g pelos

métodos colorimétricos. Concluíram que a extracção e purificação do colesterol antes da medição era essencial para evitar a interferência de outros cromogéneos da gema e que os valores indicados nas tabelas de composição dos alimentos apresentavam valores mais elevados em cerca de 20% para o conteúdo de colesterol na gema de ovo.

2.2 O OVO

2.2.1 Estrutura

Os ovos são constituídos por 3 partes principais: a gema, que se situa no centro, a clara que envolve a gema e a casca (com a membrana da casca), que protege toda a estrutura do ovo. A estrutura do ovo encontra-se representada na Figura 12.

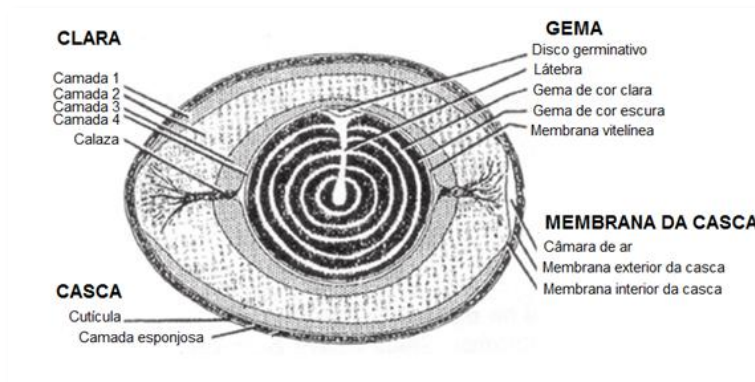


Figura 12 – Estrutura do ovo: casca, membrana da casca, clara e gema (Adaptado de Mine, 2008).

O centro do ovo é constituído pela gema, que representa 32% do peso total do ovo (Kirk & Sawyer, 1991). A sua estrutura consiste no disco germinativo, na látebra, seguido de camadas de gema de cor clara e gema de cor escura alternadas, envolvidas pela membrana vitelínea (Figura 12). Para Mine (2008) “a gema é um sistema complexo, com partículas variadas suspensas numa solução proteica e envolvidas por uma membrana vitelínea”.

A envolver a gema do ovo encontra-se a clara, também designada de albúmen, e que representa cerca de 57% do peso total do ovo (Kirk & Sawyer, 1991). Esta é composta por 4 camadas e por uma estrutura designada de calaza, cujas proporções podem variar, de acordo com diversos factores como sejam a raça da galinha, o tamanho do ovo e as condições ambientais (Stadelman & Cotterill, 1995). A camada 4 da clara (Figura 12) é uma camada gelatinosa que envolve toda a gema. Esta camada, encontra-se torcida nas duas extremidades do eixo longitudinal do ovo, formando uma estrutura semelhante a uma corda (calaza) e que estica até à extremidade da camada 1, permitindo que a gema fique suspensa no centro do ovo (Mine, 2008).

A casca do ovo representa 11% do peso total do ovo (Kirk & Sawyer, 1991) e é constituída pela cutícula, por uma camada de carbonato de cálcio e por duas camadas de membranas da casca. Possui entre 7000 a 17000 poros distribuídos de forma irregular pela superfície do ovo (Mine, 2008), e que apesar de estarem parcialmente fechados por proteína (queratina) continuam a permitir a saída de dióxido de carbono e água (Stadelman & Cotterill, 1995). A cutícula, a camada mais exterior da casca, cobre os poros e protege o ovo de contaminações microbianas (Mine, 2008).

A câmara de ar, existente na membrana da casca, forma-se por uma separação entre as membranas exterior e interior da casca, à medida que o teor em água do ovo vai diminuindo com o tempo de armazenamento. As membranas da casca, membrana interior e exterior, funcionam como um escudo protector da defesa do ovo, contra contaminações microbianas (Stadelman & Cotterill, 1995).

2.2.2 Composição química

Os ovos são uma excelente fonte de aminoácidos, ácidos gordos, vitaminas, minerais e contêm cerca de 200 mg de colesterol (United States Department of Agriculture, 2007) que corresponde quase ao valor máximo da ingestão diária recomendada pela Associação Americana do Coração, que é de 300 mg (Lichtenstein *et al.*, 2006).

Um ovo inteiro é constituído por cerca de 75,3g de água, 13g de proteína, 10,8 g de lípidos e 0,9g de cinzas, por 100g de parte edível. A gema de ovo contém 30,9g de lípidos, enquanto a clara contém apenas 0,3g. Sendo assim, a gema é responsável pela maior quantidade de colesterol no ovo com 1280mg em 100g de parte edível, enquanto a clara não contém qualquer vestígio de colesterol. A gema é também rica em ácidos gordos monoinsaturados. No Quadro 3 apresenta-se a composição química média de um ovo de galinha, por 100g de parte edível.

Quadro 3 – Composição química média do ovo de galinha por 100g de parte edível (Adaptado de Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2007).			
	<i>Ovo inteiro</i>	<i>Clara</i>	<i>Gema</i>
Água (g)	75,3	87,4	51
Proteína (g)	13	11	16
Lípidos (g)	10,8	0,3	30,9
Colesterol (mg)	408	0	1280
Ácidos gordos saturados (g)	2,7	0,1	8,3
Ácidos gordos monoinsaturados (g)	3,9	0,1	11,7
Ácidos gordos polinsaturados (g)	2,1	0	4,6
Ácidos gordos trans (g)	0	0	0,1
Ácido linoleico (g)	1,9	0	3,9
Cinza (g)	0,9	1,3	1,7

Têm sido realizadas várias investigações com o objectivo de estudar a relação causa/efeito entre o consumo elevado de ovos e o risco de doenças cardiovasculares.

Qureshi *et. al* (2007) investigaram a relação entre um consumo regular de ovos e as doenças cardiovasculares. Para tal utilizaram uma amostra 9734 adultos com idades compreendidas entre os 25 e os 74 anos, que foram seguidos por mais de 20 anos. Não foram encontradas diferenças significativas entre as pessoas que consumiam mais de 6 ovos por semana e as que consumiam menos de um ovo por semana, no que diz respeito ao risco relativo de ataque cardíaco, de doença isquémica ou de doença arterial coronária. Detectaram apenas no subgrupo dos diabéticos, que um consumo de mais de 6 ovos por semana estaria associado a um aumento do risco de doença arterial coronária (2%).

Num estudo publicado recentemente, Zazpe *et al.* (2011) investigaram a relação entre o consumo de ovos e a incidência de doenças cardiovasculares, num grupo de 14185 licenciados do Mediterrâneo. O consumo de ovos foi categorizado em 4 classes: menos de 1 ovo, 1 ovo, entre 2 e 4 ovos e mais de 4 ovos por semana. Os modelos de regressão foram ajustados para estimar a taxa de risco para doenças cardiovasculares. Durante o período da investigação que teve duração média de 6,1 anos não foi encontrada ligação entre o consumo de ovos e a incidência de doenças cardiovasculares entre a classe de consumo mais elevado e a classe de consumo mais baixo de ovos.

Desta forma, está ainda por demonstrar a relação causa/efeito do consumo elevado de ovos provocar um aumento das doenças cardiovasculares. No entanto, muitos consumidores elegem os ovos com alimento a evitar, devido ao seu elevado teor em colesterol.

No Quadro 4 encontram-se os dados relativos ao consumo anual de ovos per capita em Portugal, desde 2006. Em 2010 o consumo anual de ovos era de 9,3kg per capita o que revela um ligeiro aumento relativamente ao ano de 2009.

Quadro 4 – Consumo humano anual de ovos per capita (kg/hab.), em Portugal (Adaptado de INE, 2011b)	
<i>Período de referência dos dados</i>	<i>Kg/hab</i>
2010	9,3
2009	8,9
2008	8,8
2007	8,9
2006	8,5

2.2.3 Ovos com baixo teor em colesterol

Devido às suas características, e atendendo à preocupação crescente do consumidor em diminuir os valores de colesterol no sangue, é de todo benéfico para a saúde que seja possível produzir ovos com baixo teor em colesterol. Têm sido realizadas diversas investigações com o objectivo de determinar o efeito de alguns alimentos na diminuição do teor de colesterol na gema de ovo. No entanto, este

objectivo tem-se provado difícil, pois muitos dos tratamentos que provocam uma diminuição do teor em colesterol também influenciam negativamente outros parâmetros, como a postura e o tamanho dos ovos (Aydin *et al.*, 2008).

Alho

Yalçın *et al.* (2006) investigaram o efeito do alho em pó na redução do teor de colesterol na gema de ovo e no sangue. Para tal utilizaram 162 galinhas, com 21 semanas de idade, divididas por 3 grupos de tratamento cuja alimentação foi suplementada com alho em pó nas concentrações de 0 (controlo), 5 e 10g/kg (0; 0,5 e 1% respectivamente) durante um período de 22 semanas. O estudo demonstrou uma redução significativa de 10% na concentração de colesterol total na gema de ovo (13 mg/g) para uma concentração de alho em pó de 1%, sem alteração da produção diária. Demonstrou também que a suplementação da dieta com alho em pó a 0,5% e 1% traduz-se uma redução significativa no teor de colesterol total no soro de 6,5% e 18% respectivamente, e nos triglicérides do soro de 9,8% e 10,3%, respectivamente.

Canogullari *et al.* (2009) também estudaram o efeito do alho em pó na redução do teor de colesterol na gema de ovo e na concentração de colesterol no plasma. O estudo durou 12 semanas e consistiu no tratamento de 140 galinhas com 50 semanas de idade, divididas em 4 grupos, em que a alimentação de cada grupo foi suplementada com alho em pó nas concentrações de 0 (controlo), 0,5; 1 e 2%. Concluíram que a concentração de colesterol total na gema de ovo diminuiu (cerca de 35%) para todas as concentrações de alho em pó. No entanto, o valor apresentado neste estudo para o teor de colesterol total na gema de ovo do grupo controle (0% de suplementação) é bastante elevado (20mg/g). No global, a concentração de colesterol na gema de ovo dos animais tratados com alho (13 mg/g) não difere do estudo de Yalçın *et al.* (2006). Ainda neste estudo, os valores mais elevados de alho (2%) conduziram a uma diminuição do tamanho dos ovos, gema, produção diária e peso das galinhas. A concentração das lipoproteínas LDL no plasma diminuiu linearmente com o aumento da concentração de alho em pó, mas já as lipoproteínas HDL não foram influenciadas pela dieta suplementada com alho.

Cominhos pretos

Os cominhos pretos têm sido utilizados como alternativa aos tradicionais aditivos alimentares anti-bacterianos com objectivo de aumentar a rentabilidade das aves, ajudando no controlo de bactérias patogénicas e promovendo o aumento de peso. Esta alternativa surge devido ao desenvolvimento da resistência de algumas bactérias patogénicas quando são utilizados antibióticos nas dietas alimentares (Aydin *et al.*, 2008).

Aydin *et al.* (2008) estudaram o efeito de sementes de cominhos pretos na redução do teor de colesterol das gemas de ovos. Para tal utilizaram galinhas com 27 semanas de idade que foram divididas em grupos e tratadas com uma dieta alimentar suplementada com sementes de cominhos durante 5

semanas. Demonstraram que as sementes de cominhos pretos nas concentrações de 2% e 3% diminuem significativamente ($P<0,05$) o teor de colesterol total na gema de ovo e têm um efeito positivo na produção de ovos.

Num estudo semelhante, Yalçın *et al.* (2009) estudaram o efeito de sementes de cominhos pretos na redução do teor de colesterol total da gema de ovo, durante um período de 12 semanas. Foram utilizadas 160 galinhas com 36 semanas de idade. Neste estudo, a inclusão de cominhos pretos na alimentação na concentração de 1% e 1,5% diminuiu significativamente ($P<0,01$) o teor de colesterol total dos ovos em cerca de 11%. O referido estudo demonstrou também que as sementes de cominhos não tiveram qualquer efeito na produção de ovos e no teor de colesterol total e triglicerídeos no sangue.

Inulina

A inulina tem sido estudada por revelar uma influência positiva no equilíbrio da microflora intestinal, onde estimula o crescimento das bifidobactérias, com efeitos benéficos ao nível da absorção de alguns minerais e no perfil lipídico do sangue.

Shang *et al.* (2010) estudaram os efeitos do consumo de inulina na redução do teor de colesterol na gema de ovo de galinhas. Utilizaram 360 galinhas com 50 semanas de idade, divididas por 6 grupos de tratamento cuja dieta alimentar foi suplementada com inulina esmagada, durante um período de 4 semanas. Findo o estudo concluíram que para as concentrações de inulina de 0,1%; 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2% há uma redução linear do valor de colesterol total na gema de ovo de 6,9%; 8,2%; 10,5%; 13,6% e 18,8% respectivamente, quando comparados com o grupo de controlo. Concluíram também que com o aumento da concentração de inulina há uma diminuição da concentração de LDL e há um aumento da concentração de HDL no soro sanguíneo.

Chá

Embora estejam publicados vários estudos sobre o efeito do chá no crescimento e qualidade da carcaça de galinhas, os estudos sobre o efeito do chá nos ovos são escassos. Num dos raros estudos publicados, Azeke e Ekpo (2009) estudaram o efeito do chá preto e do alho (em separado e em conjunto) na redução do teor de colesterol da gema de ovo, em galinhas “black leghorn” de 21 semanas de idade. Neste estudo, o tratamento com chá preto a 2% provocou numa redução do colesterol da gema de ovo de 66%, após 4 semanas de tratamento. No entanto, os valores apresentados para o controlo (79,33 mg/g) são demasiado elevados para poderem ser comparáveis com outros estudos. Este ensaio apresenta também reduções de 65% no teor de colesterol da gema em animais tratados com 2% de alho, o que não é confirmado por todos os outros estudos.

2.3 O CHÁ

O chá é a segunda bebida mais consumida no mundo (Cadenas & Packer, 2005), logo a seguir à água, ultrapassando o café, refrigerantes e até bebidas alcoólicas, com um consumo mundial *per capita* de aproximadamente 0,12L/ano (McKay & Blumberg, 2002). O chá preto é o chá mais consumido no mundo – 76 a 78%, seguindo-se o chá verde – 20 a 22% e por fim o chá oolong <2%. O chá preto é consumido principalmente nos Estados Unidos e Europa, enquanto o chá verde é consumido em países como a China e o Japão (Wang *et al.*, 2010).

2.3.1 Breve história

Pensa-se que a planta do chá, *Camellia sinensis* (L.), foi descoberta na China cerca de 350 anos a.C. (McWilliams, 2007) por um Imperador chinês que ao descansar debaixo de uma árvore com um copo de água fervida, viu cair neste algumas folhas de uns arbustos que conferiram à água um tom acastanhado. O Imperador decidiu provar, surpreendendo-se com o sabor agradável, ficando adepto do chá.

O chá chegou a Portugal trazido pelas naus portuguesas, que chegavam ao porto de Lisboa com carregamentos de chá, reexportando depois para a Europa. Foram, no entanto, os Ingleses e os Holandeses os responsáveis no séc. XVIII pela comercialização em grande escala na Europa, tendo chegado mais tarde à América.

A planta do chá chegou a São Miguel em 1820 através de Jacinto Leite que trouxe as sementes do Brasil. No entanto, foi em 1878 com a crise da laranja, que o cultivo do chá em São Miguel foi incentivado, quando a Sociedade Promotora da Agricultura Micaelense mandou vir dois chineses para São Miguel, que trouxeram mais sementes para a plantação (www.gorreana.net). Neste momento a ilha de São Miguel é o único local da Europa com plantações de chá para fins industriais (Macedo, 2008).

2.3.2 A planta do chá e o seu cultivo nos Açores

A planta do chá, *Camellia sinensis* (L.), apresenta-se sob a forma de arbusto, sendo a sua propagação por meio de estacas. Na idade adulta esta pode atingir dimensões elevadas, mas para cultivo esta deve ser podada para uma altura entre 0,9 a 1,5 metros, de forma a facilitar a colheita (Belitz *et al.*, 2009). A planta do chá demora em média 4 a 5 anos até que possam ser colhidas as suas primeiras folhas para o fabrico do chá. Durante esse período os arbustos são podados cuidadosamente, conseguindo cada planta manter um tempo de vida útil de cerca de 70 anos (Belitz *et al.*, 2009).

A planta do chá requer climas tropicais e subtropicais, humidade elevada (Belitz *et al.*, 2009) e pluviosidade moderada (McWilliams, 2007). Nos Açores o clima é temperado com temperaturas médias

de 13°C no Inverno e 24°C no Verão. Este é o clima ideal para esta cultura, uma vez que as chuvas estão distribuídas ao longo do ano e as temperaturas não são muito elevadas. Como nos Açores não há estação das chuvas nem uma estação seca, não é necessária a aplicação de insecticidas ou fungicidas na planta do chá para o combate das pragas associadas a estas estações, sendo por isso considerado por muitos um produto ecológico (www.gorreana.net).

As características do solo têm também um papel importante na cultura da planta do chá. O solo dos Açores, mais concretamente o da Ilha de São Miguel, da zona onde estão instaladas as únicas produções de chá (Gorreana e Porto Formoso), é argiloso e ácido, o que dá origem a um chá muito perfumado e de travo agradável (www.gorreana.net).

2.3.3 Tipos de chá

A partir das folhas da planta do chá, é possível obter diferentes tipos de chá dependendo do tratamento a que estas são sujeitas. Geralmente o chá é dividido em chá verde, chá preto e chá oolong.

Genericamente, as folhas da planta do chá passam pelas seguintes etapas, de acordo com o tipo de chá que se pretende: murcha ou secagem, vaporização/rotação ou rotação/oxidação, secagem e selecção.

Chá verde:

Na produção de chá verde os processos oxidativos são indesejáveis, por isso as enzimas são inactivadas logo no início e as suas reacções substituídas por processos térmicos. Este tipo de chá é também conhecido por chá não fermentado (Belitz *et al.*, 2009).

Após a colheita, as folhas da planta do chá são colocadas em prateleiras ou tambores de secagem nos quais permanecem entre 4 a 18 horas, a uma temperatura de 20 a 35°C, para redução da humidade inicial. Esta etapa é designada de murcha ou secagem, sendo importante que as folhas murchem, para que na etapa de rotação não quebrem (Belitz *et al.*, 2009). As folhas sofrem depois um escaldão com vapor, sendo a temperatura utilizada suficiente para inactivar as enzimas responsáveis pelos processos oxidativos (polifenol oxidase), o que faz com que as folhas nesta etapa apresentem uma coloração verde (McWilliams, 2007).

Seguidamente as folhas são enroladas, numa etapa designada por rotação ou rolagem, de forma a absorver a seiva libertada no escaldão. A secagem é a etapa seguinte, em que as folhas são sujeitas a temperaturas elevadas. Esta etapa encontra-se geralmente dividida em duas fases que diferem entre si na temperatura aplicada ou no tempo de duração de cada fase. Com a secagem, as folhas ficam com um teor de humidade de apenas 3%, factor que permite que estas sejam armazenadas durante longos períodos de tempo após embalamento. Após a secagem, as folhas apresentam um tom verde suave (McWilliams, 2007).

As folhas da planta do chá são depois separadas, de acordo com o seu tamanho e qualidade.

Chá preto:

As folhas da planta do chá, após colheita, sofrem o processo de murcha ou secagem semelhante ao descrito no chá verde.

A etapa seguinte é a rotação ou rolagem, na qual as folhas são enroladas vigorosamente por um sistema de rolos, acção esta que tem por objectivo distribuir uniformemente a enzima polifenol oxidase. Seguidamente as folhas são colocadas em tanques fechados, durante 3,5 a 4 horas, a uma temperatura de 20 a 25°C, até oxidarem, sendo esta etapa designada por oxidação ou fermentação (Belitz *et al.*, 2009). Nesta etapa ocorre a oxidação dos polifenóis pela polifenol oxidase, a enzima que se encontra presente nas folhas do chá, o que confere ao chá um tom avermelhado escuro (Kuroda & Hara, 2004). O chá fermentado é seco em secadores contra-corrente, no qual as folhas são aquecidas a 80°C, o suficiente para inactivar a polifenol oxidase (Belitz *et al.*, 2009). No final desta etapa o chá apresenta uma cor avermelhada escura ou preta.

Por último as folhas são separadas de acordo com o seu tamanho e a qualidade. Consoante a folha utilizada, o chá preto pode ser classificado em diferentes variedades (McWilliams, 2007). Na fábrica de chá Gorreana este é dividido em 3 variedades: o Orange Pekoe, de qualidade superior, é feito do gomo terminal e da primeira folha; o Pekoe, de qualidade intermédia, é feito da segunda folha e o Broken Leaf, de qualidade inferior, é feito da terceira folha (Macedo, 2008).

Chá oolong:

O chá oolong é um tipo de chá que se situa entre o chá verde e o chá preto. Passa pelas mesmas etapas pelas quais passa o chá preto, sendo que a única diferença reside na etapa de oxidação ou fermentação. A fermentação deste tipo de chá caracteriza-se por ser uma fermentação muito curta, que é interrompida logo no início, não havendo tempo para que ocorra a oxidação dos polifenóis (McWilliams, 2007). Desta forma obtém-se um chá com sabor suave, cujas características se situam entre as do chá verde e as do chá preto.

As etapas seguintes pelas quais as folhas de chá passam são em tudo idênticas às do chá preto, sendo as folhas da planta do chá seleccionadas também no final, quanto ao seu tamanho e qualidade.

Recentemente surgiu uma outra variante do chá, que alguns autores consideram como sendo um quarto tipo de chá: o chá branco. Este chá já era conhecido dos chineses, mas só recentemente ficou conhecido a nível mundial. Este tipo de chá é muito raro pois é colhido antes dos botões das folhas abrirem completamente e quando ainda se encontram cobertos por uma “penugem” branca, daí a designação de chá branco. Apresenta uma cor semelhante à do chá verde, pois o processo de oxidação é interrompido cedo, e tem um sabor mais suave.

Qualquer tipo de chá, independentemente do tratamento que possa sofrer, pode receber a adição de outras folhas, frutos secos ou flores, cujo sabor se irá misturar com o seu, originando assim os chamados chás aromatizados.

2.3.4 Composição química

A composição química do chá pode variar com o tipo de tratamento aplicado às folhas do chá, a estação do ano, a idade da folha, o clima, o tipo de solo e as práticas de cultivo (Baptista et al., 1999; McKay & Blumberg, 2002).

O chá é uma fonte de compostos polifenólicos, principalmente flavonóides (McKay & Blumberg, 2002). Os compostos fenólicos caracterizam-se por terem um ou mais grupos hidroxilo, ligados directamente a um anel aromático.

Do vasto grupo dos fenóis, distinguem-se os flavonóides que além de se encontrarem no chá, estão também presentes nas frutas, nos vegetais e no vinho (Cadenas & Packer, 2005). Os flavonóides são compostos C-15, todos com a estrutura carbonada C₆-C₃-C₆ (Grotewold, 2006), composta por dois anéis aromáticos e um anel não aromático, que pode apresentar-se sob diferentes estados de oxidação (Cadenas & Packer, 2005). Dependendo do grau de oxidação do anel central os flavonóides podem diferenciar-se em vários tipos (Figura 13) (Paula, 2008):

- 2(3)-fenilbenzopirona: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas (com anel pirânico aberto) e auronas (homólogos de flavonas com heterociclo pentagonal);
- 2-fenilbenzopirano: 3-flavanóis (catequinas), 3,4-flavanodióis (leucoantocianinas);
- 2-fenilbenzopirilo (catião flavílio): antocianinas.

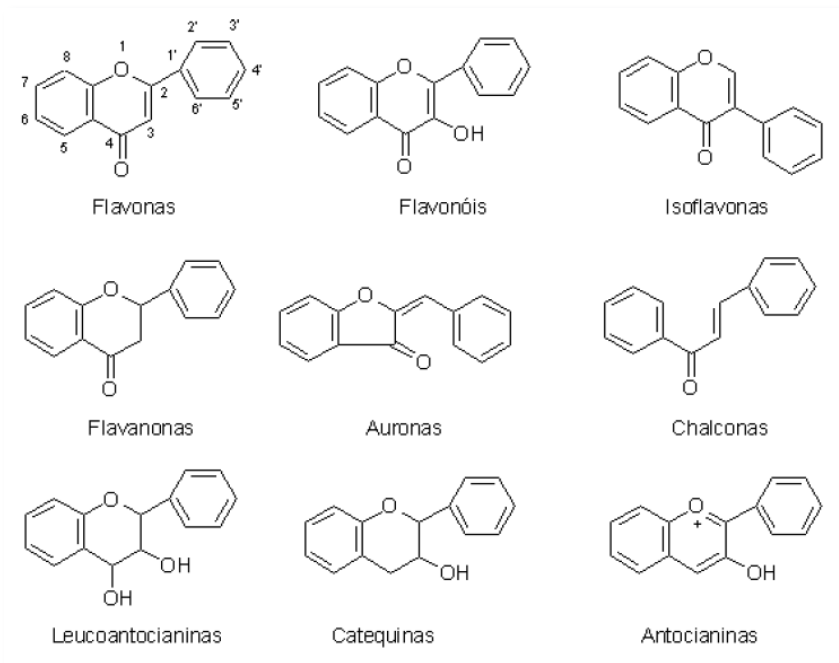


Figura 13 – Principais grupos estruturais de flavonóides (Paula, 2008).

Os principais flavonóides das folhas frescas do chá são os flavonóis e as catequinas, que representam 30% do peso seco das folhas do chá, sendo as catequinas os compostos que se apresentam em maior quantidade na folha fresca do chá (Frejnagel, 2007). Os flavonóis presentes na folha fresca do

chá são a quercetina, o canferol, a miricitina e ainda, os 3-glucósidos derivados destes compostos (Cadenas & Packer, 2005). As principais catequinas encontradas são a epicatequina (EC), a epicatequina-3-galato (ECG), a epigallocatequina (EGC) e a epigallocatequina-3-galato (EGCG) (Baptista *et al.*, 1999).

No chá verde, os flavonóides mais abundantes são as catequinas, pois como foi anteriormente referido, as folhas de chá são sujeitas a um tratamento térmico que inactiva a enzima polifenol oxidase, responsável pela oxidação dos polifenóis em compostos mais complexos, como os do chá preto ou chá oolong. Como há inactivação da enzima as catequinas não são oxidadas, apresentando-se assim em maior concentração no chá verde (Cadenas & Packer, 2005).

No chá preto, a fermentação e o aquecimento das folhas na fase de secagem resulta na oxidação das catequinas (Petisca, 2008), formando pigmentos de cor avermelhado escuro ou preto, que incluem a teaflavina e a tearubiginas (McKay & Blumberg, 2002). Na etapa de murcha ou secagem, o chá verde pode sofrer uma ligeira oxidação das catequinas, podendo aparecer pequenas quantidades destes pigmentos, como as teaflavinas (flavonóides característicos do chá preto), na composição do chá verde (Cadenas & Packer, 2005).

No Quadro 5 é apresentada a composição química das folhas de chá frescas e fermentadas e a composição da infusão do chá preto (chá preparado). As enzimas presentes na folha do chá são responsáveis pela oxidação dos flavonóis e das catequinas durante a fermentação. A enzima mais importante é a polifenol oxidase cuja actividade aumenta na etapa de murcha e na etapa de rotação e diminui na fase de oxidação (também designada de fermentação) (Belitz *et al.*, 2009). Dos aminoácidos presentes no chá o mais abundante é a teanina (5-N-etilglutamina), presente em maior quantidade no chá verde. Os compostos voláteis e semi-voláteis são responsáveis pelo sabor do chá (Baptista *et al.*, 1999).

Quadro 5 – Composição química (% de matéria seca) das folhas de chá frescas e fermentadas e de chá preto preparado (Adaptado de Belitz *et al.*, 2009).

	<i>Folhas frescas</i>	<i>Chá preto</i>	<i>Chá preto preparado^a</i>
Compostos fenólicos ^b	30	5	4,5
Compostos fenólicos oxidados ^c	0	25	15
Proteínas	15	15	<i>Vest.</i>
Aminoácidos	4	4	3,5
Cafeína	4	4	3,2
Fibra	26	26	0
Outros hidratos de carbono	7	7	4
Lípidos	7	7	<i>Vest.</i>
Pigmentos ^d	2	2	<i>Vest.</i>
Compostos voláteis	0,1	0,1	0,1
Minerais	5	5	4,5

^a Tempo de preparação 3 minutos. ^b Principalmente flavonóides. ^c Principalmente tearubiginas. ^d Clorofila e carotenóides.

Desde os primórdios do consumo de chá que este é utilizado como uma bebida benéfica à saúde, com as mais diversas funções. Com vista a comprovar as funcionalidades e propriedades do chá têm sido desenvolvidos inúmeros estudos, que têm atribuído ao chá diversas actividades como sejam antioxidante, anti-carcinogénica, anti-mutagénica e anti-bacteriana (McKay & Blumberg, 2002) e propriedades hipocolesterolémica (Yang & Koo, 1997) e cardioprotectiva (no caso do chá verde) (Wang *et al.*, 2010).

Os constituintes do chá mais estudados e aos quais são atribuídas praticamente todas as propriedades anteriores são as catequinas (Kuroda & Hara, 2004), principalmente a epigallocatequina-3-galato (EGCG), predominante nas folhas do chá verde. Este composto tem uma forte actividade antioxidante, sendo de extrema importância na defesa dos radicais livres responsáveis pelo envelhecimento celular. A actividade das catequinas presentes no chá verde explica também o efeito preventivo deste na arteriosclerose coronária e na hipertensão (Wang *et al.*, 2010). A bioactividade das catequinas não depende apenas da actividade antioxidante, mas também de efeitos fisiológicos directos (Mueller *et al.*, 2010). Pensa-se, igualmente, que a actividade anti-carcinogénica do chá, principalmente do chá verde, se deve às catequinas e bioflavonóides que estão na sua composição, e que bloqueiam as alterações celulares que estão na origem dos tumores (Macedo, 2008).

Um estudo efectuado por Baptista *et al.* (1998) comparou as catequinas e os compostos responsáveis pelo aroma de chás verdes de diferentes origens. O chá verde dos Açores (Gorreana), comparativamente com chás verdes de outras origens, apresenta um maior teor de epigallocatequina-3-galato (EGCG) e uma menor concentração de cafeína, possuindo assim um rácio EGCG:cafeína quatro vezes superior ao rácio de outros chás. Relativamente aos aromas, o chá verde possui aromas diferentes dos do chá preto ou chá oolong, devido às etapas de fabrico distintas pelas quais estes tipos de chá passam. Comparativamente com outros chás verdes, o chá verde dos Açores (Gorreana) apresenta um perfil de compostos voláteis único e que contribui para um aroma floral, frutado e doce, característico deste chás. Este perfil único de compostos voláteis deve-se à influência do clima, do solo vulcânico, dos nutrientes utilizados durante o crescimento da planta do chá e das diferentes práticas agrícolas e de fabrico utilizadas nos Açores (Baptista *et al.*, 1999).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

O presente estudo teve lugar na Universidade dos Açores, Polo de Angra do Heroísmo nas instalações da Terra Chã. Foram utilizadas 20 galinhas ISA Brown, com 53 semanas de idade, cedidas para estudo pelo aviário AVITOSTE, Lda., tendo sido devolvidas ao mesmo no final do estudo.

As galinhas foram colocadas em gaiolas individuais, também cedidas pelo aviário, com as dimensões 48x50x43 (CxLxA), apresentadas na Figura 14. As gaiolas possuíam uma ligeira inclinação para que o ovo rolasse e ficasse depositado numa grelha inferior. As galinhas tiveram acesso à ração e bebida *ad libitum*. A ração era colocada numa calha que se situava na parte da frente da gaiola enquanto que a água ou chá eram colocados em copos de plástico presos às grades das gaiolas de modo a que cada galinha apenas tivesse acesso ao conteúdo do seu copo. Esses copos eram amovíveis para medição do volume rejeitado e, por diferença, era obtido o volume bebido. As galinhas foram sujeitas a 10-12 horas diárias de luz (natural e/ou artificial).



Figura 14 – Gaiolas individuais das galinhas.

As galinhas foram distribuídas aleatoriamente por 5 grupos: 1 grupo de controlo e 4 grupos de tratamento, sendo cada grupo composto por 4 galinhas, identificadas pela combinação de letras (A e B) e números (1 a 10) como indicado na Figura 15. Os grupos foram também distribuídos aleatoriamente pelas gaiolas tendo o cuidado de colocar igual número de tratamentos nas gaiolas A (viradas para a frente) e B (viradas para a parede).



Figura 15 – Identificação das galinhas nas gaiolas.

Todas as galinhas foram sujeitas a um período de adaptação de uma semana antes do início do tratamento para que se adaptassem às novas condições, de forma a minimizar possíveis alterações na postura. Durante esse período as galinhas foram colocadas nas gaiolas e alimentadas com ração *ad libitum* e com água. A ração utilizada é constituída pelos ingredientes: milho, bagaço de soja, carbonato de cálcio, soja integral extrudida, bagaço de colza, fosfato de cálcio, óleo de soja, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, DL-metionina, sepiolita, oligoelementos e cantaxantina. A composição química da ração encontra-se no Quadro 6.

Quadro 6 – Composição química da ração utilizada na alimentação das galinhas.

Proteína bruta (%)	17,2
Gordura bruta (%)	3,6
Cinzas totais (%)	12,5
Sódio (%)	0,15
Celulose bruta (%)	3,70
Cálcio (%)	3,80
Fósforo (%)	0,65
Metionina (%)	0,42
Metionina etiqueta (%)	0,42
Lisina (%)	0,95
Vitamina A (UI/kg)	10.000
Vitamina D3 (UI/kg)	2500
Vitamina E (alfatocoferol) (mg/kg)	9
Cobre (sulfato de cobre pentahidratado) (mg/kg)	5
Sulfato de ferro heptahidratado (mg/kg)	11
Iodo (iodeto de potássio) (mg/kg)	0,5
Zinco (óxido de zinco) (mg/kg)	36
Cobalto (carbonato básico de cobalto) (mg/kg)	0,5
Selénio (selenito de sódio) (mg/kg)	0,13
Óxido de manganês (mg/kg)	37

3.2 PREPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS

O presente estudo teve uma duração de 9 semanas, durante as quais as galinhas foram alimentadas *ad libitum* com ração e com o tratamento de chá aplicado em cada caso, descritos no Quadro 7.

Quadro 7 – Divisão das galinhas por tratamento.	
	<i>Galinhas</i>
Controlo (C)	A1, A4, B4, B6
Chá preto 0,5% (CP 0,5%)*	A2, A10, B5, B8
Chá preto 1% (CP 1%)	A3, A7, B1, B7
Chá verde 0,5% (CV 0,5%)**	A6, A9, B3, B9
Chá verde 1% (CV 1%)	A5, A8, B2, B10

* Foi substituído por chá preto a 2% (CP2%) ao fim de 30 dias.

** Foi substituído por chá verde a 2% (CV2%) ao fim de 30 dias.

O chá utilizado foi o da marca Gorreana, por ser a única empresa a comercializar chá verde dos Açores e foi adquirido no mercado local. O chá preto utilizado foi da variedade Broken Leaf, e o chá verde o Hysson, ilustrados na Figura 16.



Figura 16 – Chá preto e chá verde Gorreana.

O chá era preparado e administrado diariamente a cada galinha utilizando copos de plástico com capacidade de 300 ml ou 450ml. As concentrações de chá utilizadas durante o tratamento foram: chá preto a 0,5%, chá preto a 1%, chá preto a 2%, chá verde a 0,5%, chá verde a 1% e chá verde a 2%. Ao fim de 30 dias de tratamento as galinhas que estavam a ser tratadas com o chá preto a 0,5% passaram a ser tratadas com chá preto a 2% e as galinhas que estavam a ser tratadas com chá verde a 0,5% passaram a ser tratadas com chá verde a 2%. Esta alteração deveu-se ao facto de, após análise prévia dos dados, não terem sido registadas alterações significativas entre o dia 0 e o dia 30 no que diz respeito ao teor de colesterol total na gema do ovo. Alterou-se assim a concentração de 0,5% para 2%, mantendo-se a concentração de 1%, com o objectivo de verificar se a ausência de reduções significativas no teor de colesterol total da gema de ovo era devida às baixas concentrações do chá utilizadas ou ao curto período de tempo decorrido desde o início do tratamento

Para preparação do chá preto aqueceu-se a água até à ebulição numa chaleira eléctrica, vertendo-se a água quente sobre as folhas de chá previamente pesadas. Na preparação do chá verde a água foi aquecida até aos 75°C e vertida sobre as folhas de chá já pesadas. Para ambos os tipos de chá a mistura foi agitada durante 20 a 40 minutos, tendo sido depois coada e deixada a arrefecer até à temperatura ambiente antes de ser fornecida às galinhas. No grupo de controlo foi utilizada água potável natural.

3.3 RECOLHA DE DADOS

No início e no final dos tratamentos as galinhas foram pesadas individualmente, com recurso à balança identificada na Figura 17.



Figura 17 – Pesagem das galinhas.

Para cálculo do volume ingerido diariamente e antes da administração da bebida às galinhas (água ou chá) era medida e registada a quantidade de bebida que restava em cada um dos copos.

Todos os dias eram recolhidos e identificados todos os ovos e registado o número de ovos postos por cada galinha. Para determinação do conteúdo em colesterol, foram analisados os ovos do dia 0 (ovos iniciais sem efeito do tratamento) e os ovos dos dias pares dos tratamentos (dia sim, dia não), bem como os ovos do último dia e os ovos recolhidos 4 dias após o fim dos tratamentos. Sempre que uma galinha não tivesse colocado ovo no dia correspondente ao que tinha de ser analisado, utilizava-se, se possível, o ovo do dia anterior para a determinação do colesterol. Para todos os ovos recolhidos diariamente registou-se o peso do ovo, da casca, da clara e da gema.

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COLESTEROL TOTAL NA GEMA DE OVO

3.4.1 Extracção de lípidos da gema de ovo

Pesou-se o ovo inteiro (Figura 18-B), partiu-se e separou-se a gema da clara com o cuidado de separar completamente toda a clara da gema. Pesou-se a gema para um saco e depois a casca. Com o

auxílio de uma pipeta pesou-se 1g de gema de ovo para um tubo de ensaio como indicado na Figura 18-C, e registou-se o peso, até aos décimos de grama. Ao tubo de ensaio adicionaram-se 10 ml de mistura clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) (Figura 18-D) e homogeneizou-se no vórtex. De seguida filtrou-se para um tubo de ensaio com tampa, utilizando papel de filtro sem gordura (Whatman nº3), como ilustrado na Figura 18-E. Ao tubo de ensaio adicionaram-se 2ml da solução CaCl_2 0.02% (p/v) (Figura 18-F) e agitou-se no vórtex durante 1 minuto, ficando os tubos com o aspecto testemunhado na Figura 18-G. Adicionaram-se depois 2 ml de uma mistura clorofórmio:metanol:água (2:50:50, v/v/v) (Figura 18-H) e agitou-se novamente no vórtex, durante cerca de 1 minuto. Deixou-se a mistura em repouso de um dia para o outro, em local escuro, para separação das fases.

3.4.2 Doseamento do colesterol total

No doseamento do colesterol total utilizou-se o método de Liebermann-Burchard. O reagente de Liebermann-Burchard utilizado foi previamente preparado na hotte da seguinte forma: sobre 60 ml de anidrido acético, contido num copo arrefecido no gelo, verteu-se gota a gota e com agitação constante, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado. Juntaram-se 30 ml de ácido acético glacial, seguido de 0,6 g de sulfato de sódio anidro.

Após separação das fases como ilustrado na Figura 18-I, retiraram-se do tubo de ensaio, 2ml do extracto lipídico (fase inferior) para um frasco de vidro com tampa (Figura 18-J). Para avaliar o volume total do extracto, verteu-se o conteúdo restante do tubo de ensaio para um tubo de centrifuga, e centrifugou-se a 4332 x g, a 22°C durante 15 minutos (centrifuga Eppendorf 5804 R). No final mediu-se o volume da fase inferior (Figura 18-K) ao qual se somaram os 2 ml retirados inicialmente. Obteve-se assim o volume total extraído.

Para a recta de calibração, em séries triplas de tubos de ensaio adicionaram-se 0,25ml de clorofórmio (branco) ou solução padrão de colesterol em clorofórmio nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 4 mg/ml. Para a análise de colesterol nas amostras, adicionaram-se 0,25ml do extracto lipídico em séries triplas de tubos de ensaio. A todos os tubos anteriores adicionaram-se 2,5 ml do reagente de Liebermann-Burchard, com uma pipeta automática (Eppendorf), e agitou-se no vórtex. Incubaram-se os tubos em banho-maria (modelo Julabo SW22) a 25°C, durante 20 minutos. No final apresentaram a coloração ilustrada na Figura 18-L.

Mediu-se a absorvância de todos os tubos num espectrofotómetro (Hitachi U-2900) a um comprimento de onda de 550nm. Após a obtenção da recta de calibração, com as soluções padrão de colesterol, foram determinadas as concentrações de colesterol das amostras. Na Figura 19 encontra-se representado um exemplo da recta de calibração para o doseamento do teor de colesterol total na gema de ovo, utilizando soluções padrão de colesterol em clorofórmio (0,5, 1, 2, 3 e 4 mg/ml).






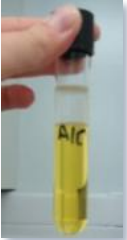
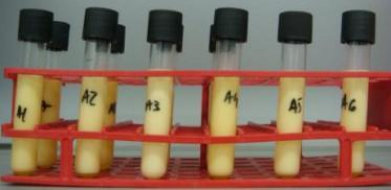
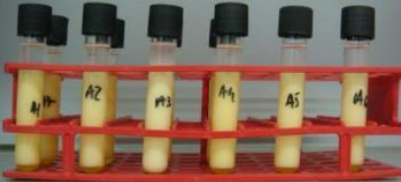
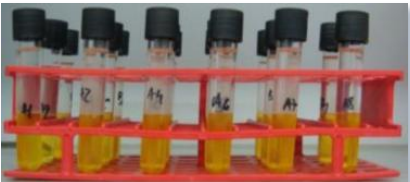



 <p>A. Identificação dos ovos;</p>	 <p>B. Pesagem da gema;</p>	 <p>C. Pesagem da toma de 1g;</p>
 <p>D. Aspecto dos tubos após adição da mistura clorofórmio:metanol 2:1 (v/v);</p>	 <p>E. Filtração da mistura anterior;</p>	 <p>F. Adição da solução CaCl₂ 0,02% (p/v);</p>
 <p>G. Aspecto do tubo após agitação da mistura anterior;</p>	 <p>H. Aspecto dos tubos após adição da solução clorofórmio:metanol:água (2:50:50, v/v/v);</p>	 <p>I. Aspecto dos tubos com fases separadas, após repouso;</p>
 <p>J. Amostra de extracto lipídico para determinação do teor de colesterol total;</p>	 <p>K. Aspecto do tubo após centrifugação para determinação do volume total extraído;</p>	 <p>L. Coloração dos tubos após a reacção de Lieberman-Burchard.</p>

Figura 18 – Fotografias de algumas etapas da determinação do teor de colesterol na gema de ovo.

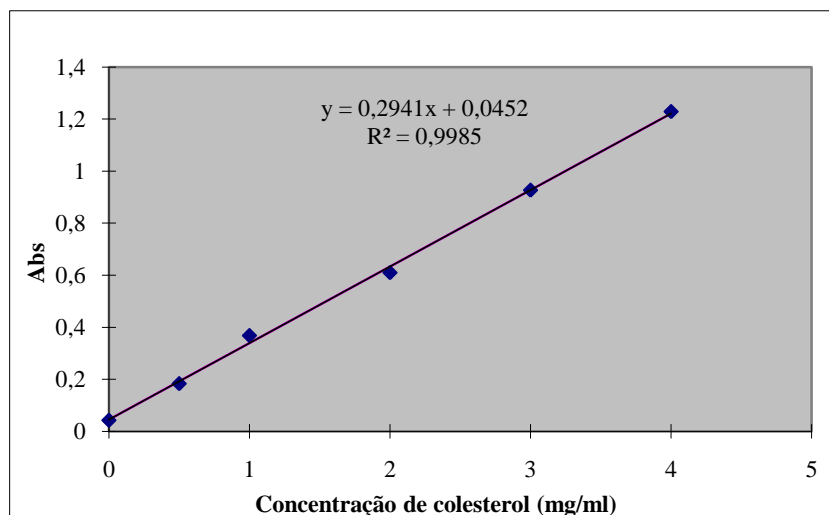


Figura 19 – Recta de calibração para o doseamento do colesterol total na gema do ovo.

3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COLESTEROL TOTAL NO PLASMA

No final do ensaio foi colhida uma amostra de sangue de cada uma das 20 galinhas, da veia *vena brachialis*, que se situa debaixo da asa. O sangue foi recolhido através de uma seringa heparinizada de 5 ml, com uma agulha 25 gauge x 15 mm, e colocado em tubos de centrífuga no gelo. As amostras foram de seguida centrifugadas durante 10 minutos à velocidade de 3000 x g, à temperatura de 4°C (Shang *et al.*, 2010). O plasma foi recolhido e congelado para posterior análise. Para a determinação do teor de colesterol total no plasma sanguíneo foi utilizado o kit enzimático de doseamento de colesterol da Boehringer (Cholesterin CHOD-PAP-SYSL). As amostras foram descongeladas, colocando-se 10µl de cada amostra directamente em cuvettes de espectrofotómetro e adicionando-se 1 ml do reagente (CHOL). Deixou-se a incubar durante 10 minutos a 20°C, medindo-se de seguida a absorvância num espectrofotómetro (Hitachi U-2900) a um comprimento de onda de 500nm. A recta de calibração foi realizada utilizando-se soluções padrão de colesterol (1, 2 e 4 mg/ml) e é apresentada na Figura 20.

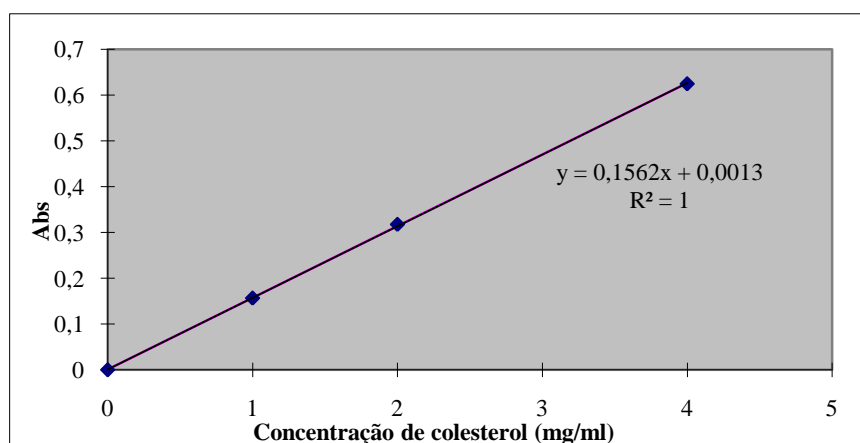


Figura 20 – Recta de calibração para o doseamento do colesterol no plasma utilizando o kit de diagnóstico Cholesterin CHOD-PAP-SYSL (Boehringer).

3.6 ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados relativos ao peso das galinhas foram analisados estatisticamente por análise factorial, onde os dias (inicial, final) e os tratamentos (controlo, chá preto a 1%, chá preto a 2%, chá verde a 1% e chá verde a 2%) constituíram as variáveis independentes e o peso das galinhas a variável dependente.

O rendimento da produção de ovos (%) de cada grupo de tratamento foi calculado, correspondendo à média de 1 ovo por dia o valor de 100%. Foi avaliado o efeito dos tratamentos na postura através da análise de variância (ANOVA) simples.

Os dados relativos ao volume ingerido, às características dos ovos, ao colesterol total na gema do ovo e ao colesterol total no ovo foram divididos em 3 períodos. O 1º período, do dia 0 ao dia 29, correspondeu ao período em que as galinhas foram tratadas com chá preto a 0,5%, chá preto a 1%, chá verde a 0,5% e chá verde a 1%. No 2º e 3º períodos as galinhas foram tratadas com chá preto a 1%, chá preto a 2%, chá verde a 1% e chá verde a 2%. Estes dois períodos foram divididos para análise estatística da seguinte forma: 2º período (dia 30 ao dia 40) em que o teor de colesterol total na gema do ovo se manteve constante (ver Figura 22); 3º período (dia 41 ao dia 63) em que se observou uma descida no teor de colesterol total na gema de ovo em todos os tratamentos. Esta divisão facilitou a análise de dados por análise factorial (ANOVA factorial), em que as variáveis independentes foram os tratamentos e as variáveis dependentes o volume ingerido e os dias do tratamento em cada período. O peso do ovo e suas fracções (peso da casca, clara e gema) foram também desta forma analisados por análise factorial, em que as variáveis independentes foram os tratamentos e as variáveis dependentes o peso do ovo ou suas fracções e os dias do tratamento. Para análise do colesterol total na gema do ovo e do colesterol total no ovo, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas para avaliar o efeito dos tratamentos em cada um dos três períodos.

O efeito dos tratamentos no teor de colesterol total no plasma foi analisado por ANOVA simples.

Nos casos em que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (valores de $P < 0,05$) na ANOVA, foi aplicado o teste post-hoc Fisher PLSD (Protected Least Significant Difference). Toda a análise estatística foi efectuada pelo programa StatView 4 (SAS) e em anexo apresentam-se todos os resultados do programa.

4 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

4.1 PESO DAS GALINHAS

No Quadro 8 são apresentadas as médias (\pm SD) do peso inicial e do peso final das galinhas do grupo de controlo, das galinhas tratadas com chá preto a 1% e 2% (concentração final) e das galinhas tratadas com chá verde a 1% e 2% (concentração final). Os tratamentos aplicados a cada grupo não apresentam efeito significativo no peso das galinhas. Estes dados vêm confirmar o bom estado de saúde das galinhas no final do estudo, no qual não foram registados casos de perda de peso ou mortalidade.

Quadro 8 – Efeito dos tratamentos com chá preto a 1% e 2% e com chá verde a 1% e 2% no peso final das galinhas (os resultados encontram-se sob a forma de média \pm SD, $n=4$ por tratamento).

	Tratamentos				
	<i>Controlo</i>	<i>Chá preto 1%</i>	<i>Chá preto 2%*</i>	<i>Chá verde 1%</i>	<i>Chá verde 2%*</i>
Peso inicial das galinhas (kg)	2,0 \pm 0,050	2,0 \pm 0,096	2,0 \pm 0,082	2,0 \pm 0,082	2,0 \pm 0,96
Peso final das galinhas (kg)	2,1 \pm 0,096	2,1 \pm 0,1	2,0 \pm 0	2,1 \pm 0,129	2,0 \pm 0,96

* Concentração de chá no final do período de tratamento.

Os dados apresentados no Quadro 8 vão de encontro aos publicados por Azeke e Ekpo (2009) que também não encontraram efeitos significativos no peso das galinhas quando estas foram tratadas com chá preto a 1% e 2%.

Em concordância com os dados apresentados estão também os publicados por Sarker *et al.* (2010) que ao estudarem o efeito do chá verde na performance de crescimento e composição corporal de galinhas, quando este foi incorporado na dieta alimentar nas concentrações de 0,5% e 1%, não notaram alterações significativas no peso das galinhas. Panja (2007) também não encontrou alterações significativas no peso das galinhas quando a dieta alimentar destas foi suplementada com folhas de *Camellia sinensis* nas percentagens de 0,5%; 1%; 1,5% e 2%. O mesmo foi reportado por Biswas e Wakita (2001a) que relatam efeitos não significativos no peso das galinhas, quando a dieta alimentar era suplementada com chá verde solúvel (em pó) a 0,3%.

Além dos estudos com chá, existem também dados publicados sobre a utilização de outros alimentos na redução do teor de colesterol na gema de ovo, com consequente análise dos diversos parâmetros associados a esses tratamentos, como seja o peso das galinhas.

Azeke e Ekpo (2009) ao utilizarem alho em pó na dieta alimentar, para diminuição do teor de colesterol na gema, descobriram que o alho na concentração de 1% aumentava significativamente o peso médio das galinhas em 10%. Estes dados são contrários aos publicados por Yalçın *et al.* (2006), que para concentrações de 0,5% e 1% de alho em pó suplementado na dieta alimentar não encontraram alterações significativas no peso das galinhas. Também Canogullari *et al.* (2009) não reportaram

diferenças significativas no peso das galinhas cuja dieta alimentar foi suplementada com alho em pó a 0,5% e 1%. No entanto descobriram um aumento significativo de 14,34% no peso das galinhas tratadas com alho em pó a 2%, quando comparado com o peso inicial.

Outro alimento utilizado para redução do teor de colesterol na gema de ovo são os cominhos pretos. Aydin *et al.* (2008) não encontraram diferenças significativas do peso das galinhas tratadas com sementes de cominhos pretos a 1%, 2% e 3%. Resultados semelhantes foram publicados por Yalçin *et al.* (2009) que também não descobriram alterações significativas no peso das galinhas, quando estas foram tratadas com sementes de cominhos pretos nas concentrações de 0,5%; 1,0% e 1,5%.

Shang *et al.* (2010) ao utilizarem a inulina nas concentrações de 0,1%; 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2% para diminuição do teor de colesterol na gema de ovo também não detectaram alterações significativas no peso das galinhas.

4.2 RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE OVOS

O rendimento da produção de ovos para cada grupo ao longo do tratamento encontra-se representado no Quadro 9. Não foram encontradas diferenças significativas no que diz respeito ao rendimento da produção de ovos ($P=0,79$). A variação encontrada no rendimento da postura situa-se no intervalo de 85% a 94,5%.

Quadro 9 - Efeito dos tratamentos com chá preto a 1% e 2% e com chá verde a 1% e 2% no rendimento da produção de ovos (%) (os resultados encontram-se sob a forma de média±SD, $n=4$ por tratamento).

	Tratamentos				
	Controlo	Chá preto 1%	Chá preto 2%	Chá verde 1%	Chá verde 2%
Rendimento da produção de ovos (%)	89,85±10,66	94,53±0,90	87,50±15,25	85,16±18,34	92,97±4,69

Azeke e Ekpo (2009), à semelhança dos dados apresentados no Quadro 9, não encontraram alterações significativas no rendimento da produção de ovos, quando utilizaram chá preto nas concentrações de 1% e 2%. Resultados semelhantes foram publicados por Biswas e Wakita (2001a) que ao utilizarem 0,3% de chá verde em pó na dieta alimentar de galinhas para determinar a influência deste na postura e na qualidade dos ovos, também não encontraram efeitos significativos dos tratamentos no rendimento da produção de ovos.

Canogullari *et al.* (2009), ao utilizarem alho em pó nas concentrações de 0,5% e 1% durante 12 semanas conseguiram um aumento significativo no rendimento da produção de ovos de 1,4% e 1,8% respectivamente. Por outro lado Yalçin *et al.* (2006) ao utilizarem alho em pó nas concentrações de 0,5% e 1% na dieta alimentar das galinhas durante 12 semanas, não conseguiram encontrar alterações significativas no rendimento da produção de ovos.

Ao utilizarem sementes de cominhos pretos como suplemento da dieta alimentar das galinhas nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5%, Yalçın *et al.* (2009) não encontraram alterações significativas no rendimento da produção de ovos. Já Aydin *et al.* (2008) ao utilizarem sementes de cominhos pretos na concentração de 3% referem alterações significativas do rendimento da produção de ovos, com uma média de 83,71%, mais 9,3% que o grupo de controlo.

Shang *et al.* (2010) ao utilizarem inulina como suplemento da dieta alimentar nas concentrações 0,1%; 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0%, também não encontraram alterações significativas no rendimento da produção de ovos.

4.3 VOLUME INGERIDO

Na Figura 21 estão representadas as médias diárias do volume ingerido por cada grupo de tratamento, durante os 3 períodos estudados.

O volume ingerido por cada animal era, sempre que possível, medido à mesma hora. Contudo isso nem sempre aconteceu, pois como se pode observar na Figura 21 a queda no volume ingerido registada no dia 25 deveu-se a uma diminuição do intervalo de tempo que mediou duas medições consecutivas.

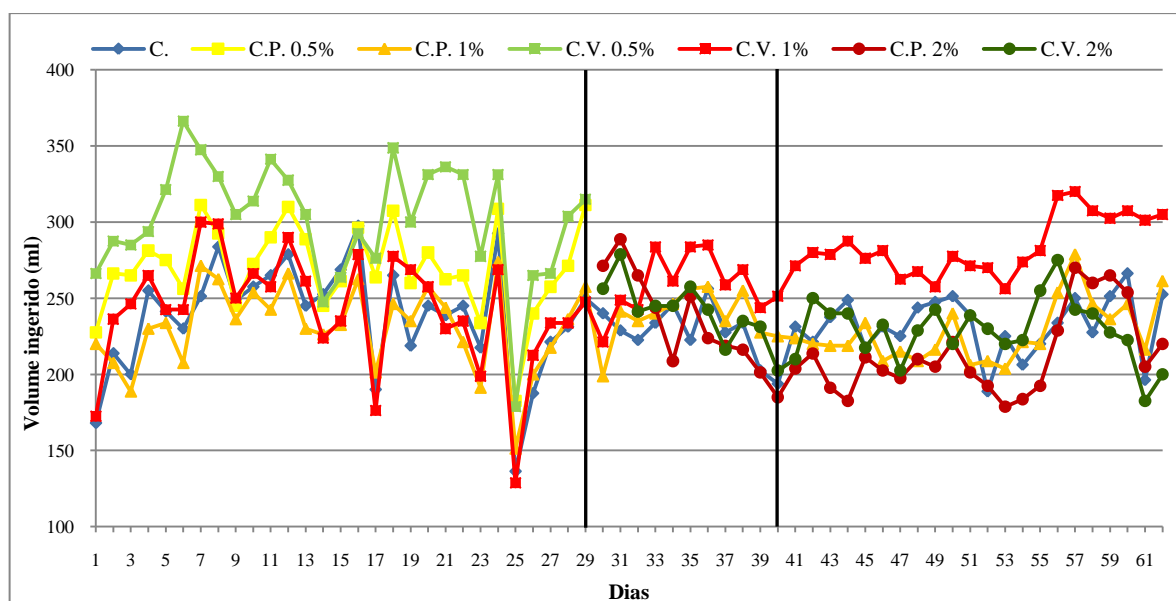


Figura 21 – Volume médio diário de água (C), chá preto a 0,5% (C.P.0,5%), chá preto a 1% (C.P.1%), chá preto a 2% (C.P.2%), chá verde a 0,5 (C.V.0,5%), chá verde a 1% (C.V.1%) e chá verde a 2% (C.V.2%) ingeridos por cada grupo durante o tratamento, durante os 3 períodos estudados.

No Quadro 10 são apresentados os valores médios do volume ingerido em cada um dos grupos de tratamentos (chá preto a 0,5%, 1% e 2% e chá verde a 0,5%, 1% e 2%) nos três períodos estudados.

Para o 1º período do tratamento (dia 1 ao dia 29), observou-se um valor mais elevado de volume ingerido nos grupos tratados com chá verde a 0,5% e chá preto a 0,5% ($P < 0,05$), em relação ao grupo de

4 – Apresentação e Discussão de Resultados

controlo, com uma média diária de ingestão de 270 ml e 302 ml, respectivamente, mais 13% e 27% do que o ingerido pelo grupo de controlo.

Relativamente ao 2º período, altura em que foram alteradas as concentrações de chá de 0,5% para 2% (chá preto e verde), verificou-se uma tendência para a diminuição do volume ingerido por estes dois grupos de tratamento, provavelmente devido ao sabor intenso das concentrações mais elevadas (Quadro 10). Observou-se, no entanto, um aumento do volume de chá ingerido pelo grupo tratado com chá verde a 1% ($P < 0,05$), apresentando uma média de consumo diário de 259 ml diários, mais 14% que o ingerido pelo grupo de controlo.

No que diz respeito ao volume de chá ingerido durante o 3º período do tratamento, manteve-se a tendência para uma maior ingestão de chá verde a 1%, mantendo-se a média de ingestão diária dos outros grupos de tratamento, excepto para o chá preto a 2% que diminuiu em relação ao controlo (-8%). Neste período o volume ingerido de chá preto a 1% continua a ser significativamente diferente ($P < 0,05$) do volume ingerido pelo grupo de controlo, tal como aconteceu no período anterior. O grupo do chá verde a 1% apresentou um consumo diário de 284 ml de chá, registando-se um aumento de 22% em relação ao grupo de controlo.

Quadro 10 - Efeito dos tratamentos com chá preto a 0,5%, 1% e 2% e com chá verde a 0,5% 1% e 2% no volume médio diário ingerido por cada grupo de tratamento para os três períodos estudados (os resultados encontram-se sob a forma de média±SD).

		Tratamentos						
		Controlo	Chá preto 0,5%	Chá preto 1%	Chá preto 2%	Chá verde 0,5%	Chá verde 1%	Chá verde 2%
Volume ingerido (ml/dia)	1º Período (dia 1 a 29) (n=116)	238±54,2	270±69,1* (+13,4%)**	231±64,0	----	302±67,5* (+26,9%)**	243±50,9	----
	2º Período (dia 30 a 40) (n=44)	228±32,4	----	238±52,8	234±57,9	----	259±31,1* (+13,6%)**	241±44,8
	3º Período (dia 41 a 62) (n=88)	232±50,7	----	227±57,3	213±58,8* (-8,2%)**	----	284±40,3* (+22,4%)**	229±46,0

* Diferenças significativas, para um nível de significância de 5%, quando comparado com o grupo de controlo.

** Os resultados entre parêntesis representam a % de alteração relativamente ao grupo de controlo.

Verifica-se assim, para os períodos apresentados, a tendência para a ingestão de um maior volume de chá pelos grupos com concentrações de tratamento mais baixas e de um menor volume de chá pelos grupos tratados com chá nas concentrações mais elevadas. Isto deverá dever-se ao facto do chá, nas suas concentrações mais elevadas, apresentar um sabor mais intenso, que funciona como impeditivo para a sua ingestão, quando comparado com o grupo que bebeu apenas água (controlo).

Em trabalhos previamente publicados, a administração de chá é em geral realizada na alimentação juntamente com a ração, e não como bebida, não existindo assim dados publicados que permitam uma comparação directa com os dados obtidos no presente estudo.

No entanto, Azeke e Ekpo (2009) quando utilizaram chá preto solúvel nas concentrações de 1% e 2% administrado juntamente com a ração, não encontraram efeitos significativos do chá no consumo da ração. Também Sarker *et al.* (2010) não reportaram efeitos significativos no consumo de alimento, quando utilizaram folhas de chá verde juntamente com a ração, nas concentrações de 0,5% e 1%. Outros estudos referem igualmente não haver diminuição no consumo de ração em galinhas suplementadas com chá verde (Biswas e Wakita, 2001b, Panja, 2007). No entanto Biswas e Wakita (2001a) referem reduções significativas de 8% no consumo da ração suplementada com 0,3% de chá verde em pó.

4.4 CARACTERÍSTICAS DOS OVOS

O efeito dos tratamentos com chá preto a 0,5%, 1% e 2% e com chá verde a 0,5%, 1% e 2% no peso total do ovo, da casca, da clara e da gema, ao longo do período em estudo, encontra-se indicado nos Quadros 11 e 12.

Em relação ao peso total do ovo, observou-se que, logo no primeiro período do tratamento, o peso médio dos ovos tratados com chá verde a 0,5% era significativamente maior ($P < 0,05$) que o peso médio dos ovos do grupo controle (Quadro 11). Analisando as médias semanais dos pesos dos ovos durante o primeiro período do tratamento (Quadro 12), verificamos que este valor é mais elevado desde a primeira semana, o que indica que estes ovos já eram maiores no início do tratamento.

Comparando os dados do peso total dos ovos do grupo tratado com chá verde a 0,5% no primeiro período, com os dados do grupo tratado com chá verde a 2% no 2º e 3º período (as mesmas galinhas em que a concentração de chá foi aumentada), verificamos que os pesos totais dos ovos destes grupos se mantêm praticamente semelhantes, desde o início do tratamento (Quadro 11). De notar também que as galinhas tratadas com chá verde a 1% puseram ovos com pesos semelhantes aos do grupo controle (água). Contudo, não poderemos excluir a hipótese de que estas galinhas por ingerirem um maior volume de líquidos (cerca de 27% mais chá verde a 0,5% ingerido em comparação com a água) também ponham ovos maiores.

No que diz respeito ao peso da casca, durante o primeiro período do tratamento foram encontradas alterações significativas para os ovos dos grupos tratados com chá preto a 1% e chá verde a 0,5%. O grupo do chá preto a 1% apresentou uma redução significativa ($P < 0,05$) no peso da casca de 6,7% relativamente ao grupo de controlo que, de acordo com os dados do Quadro 12, apenas foi sentida na 2ª semana do tratamento. Já o grupo tratado com chá verde a 0,5% apresentou um aumento significativo ($P < 0,05$) do peso da casca do ovo de 8,2%, quando comparado com o grupo de controlo. Se compararmos este aumento com os dados do Quadro 12 verificamos que na primeira semana do tratamento já existiam estas diferenças significativas ($P < 0,05$) no peso da casca, o que nos leva a

concluir que este valor mais elevado é explicado pelo facto dos ovos já terem uma casca mais pesada no início do tratamento, e não será devido à ingestão do chá.

No segundo período do tratamento foram encontradas reduções significativas ($P<0,05$) no peso da casca dos ovos tratados com chá preto a 2% e chá verde a 1%, reduções estas de 6,7% e 4,3% respectivamente, quando comparadas com o grupo de controlo.

Para o terceiro e último período do tratamento foram observadas reduções significativas ($P<0,05$) no peso da casca dos ovos dos grupos tratados com chá preto a 1%, chá preto a 2% e chá verde a 2% de 8,1%, 7,8% e 7,3% respectivamente, quando comparados com o grupo de controlo (Quadro 11).

Relativamente ao peso da clara, durante o primeiro período observamos no Quadro 11 que o peso da clara do grupo tratado com chá verde a 0,5% apresenta um valor mais elevado ($P<0,05$) (11,6% mais pesada que o grupo de controlo). No entanto, ao compararmos com os dados do Quadro 12, verificamos que esta alteração existe apenas na primeira semana, levando-nos a concluir que estes ovos apresentavam uma clara maior, relativamente ao grupo de controlo, no início do tratamento. Para o terceiro período do tratamento, o peso da clara do grupo tratado com chá verde a 2% mantém-se mais elevado ($P<0,05$), quando comparado com o grupo de controlo (11,7% mais pesada, Quadro 11).

No início do tratamento observou-se um valor mais elevado do peso da gema para os grupos tratados com chá preto a 0,5% e chá verde a 0,5%, quando comparados com o grupo de controlo (Quadro 11). Ao avaliar os dados correspondentes a cada semana de tratamento (Quadro 12), verificamos que o peso da gema dos ovos das galinhas que beberam chá verde a 0,5% aumentou na 2ª e 3ª semana (sendo significativo na 3ª semana, $P<0,05$) provavelmente devido ao aumento da ingestão de chá observado neste grupo (Quadro 10). Este aumento, juntamente com os valores mais elevados dos pesos da casca e clara observados no grupo que ingeriu 0,5% de chá verde, contribuiu para um aumento global no peso dos ovos observado neste grupo durante este 1º período.

Para o segundo período do tratamento observou-se um aumento significativo ($P<0,05$) no peso da gema de ovo, nos grupos tratados com chá preto a 1%, chá preto a 2% e chá verde a 2%, aumentos em relação ao controlo de 5,5%, 8,4% e 8,1%, respectivamente.

Relativamente ao terceiro período do tratamento manteve-se esta tendência para o aumento do tamanho da gema nos grupos tratados com chá preto a 2%, chá verde a 1% e chá verde a 2%, quando comparados com o grupo que bebeu água ($P<0,05$). Estes aumentos foram de 10,9%, 4,7% e 9,8% respectivamente (Quadro 11).

4 – Apresentação e Discussão de Resultados

Quadro 11 - Efeito dos tratamentos com chá preto a 0,5%, 1% e 2% e com chá verde a 0,5%, 1% e 2% no peso total do ovo, da casca, da clara e da gema (os resultados apresentam-se sob a forma de média \pm SD).

		Tratamentos						
		<i>Controlo</i>	<i>Chá preto 0,5%</i>	<i>Chá preto 1%</i>	<i>Chá preto 2%</i>	<i>Chá verde 0,5%</i>	<i>Chá verde 1%</i>	<i>Chá verde 2%</i>
Peso total do ovo (g)	1º Período (dia 0 a 29) (n=30)	61,12 \pm 2,29	62,26 \pm 2,27	61,37 \pm 2,39	----	67,34 \pm 2,79* (+10,2%)**	62,00 \pm 2,43	----
	2º Período (dia 30 a 40) (n=11)	62,32 \pm 2,55	----	62,58 \pm 2,87	61,84 \pm 3,29	----	61,73 \pm 4,16	67,23 \pm 3,13* (+7,9%)**
	3º Período (dia 41 a 63) (n=23)	63,25 \pm 1,94	----	62,61 \pm 2,80	64,46 \pm 2,76	----	62,43 \pm 2,17	69,24 \pm 2,65* (+9,5%)**
Peso da casca (g)	1º Período (dia 0 a 29) (n=30)	8,07 \pm 0,61	8,04 \pm 0,35	7,80 \pm 0,45* (-3,3%)**	----	8,73 \pm 0,44* (+8,2%)**	7,97 \pm 0,62	----
	2º Período (dia 30 a 40) (n=11)	8,32 \pm 0,30	----	8,03 \pm 0,32	7,76 \pm 0,57* (-6,7%)**	----	7,96 \pm 0,43* (-4,3%)**	8,55 \pm 0,42
	3º Período (dia 41 a 63) (n=23)	8,49 \pm 0,31	----	7,80 \pm 0,37* (-8,1%)**	7,83 \pm 0,49* (-7,8%)**	----	7,87 \pm 0,44* (-7,3%)**	8,49 \pm 0,53
Peso da clara (g)	1º Período (dia 0 a 29) (n=30)	36,85 \pm 2,67	36,54 \pm 2,72	36,69 \pm 2,50	----	41,12 \pm 2,95* (+11,6%)**	37,29 \pm 2,60	----
	2º Período (dia 30 a 40) (n=11)	37,50 \pm 3,17	----	37,14 \pm 3,35	36,19 \pm 4,01	----	37,67 \pm 5,00	40,84 \pm 3,78
	3º Período (dia 41 a 63) (n=23)	38,21 \pm 2,56	----	37,82 \pm 3,18	38,27 \pm 3,34	----	37,35 \pm 3,00	42,66 \pm 3,48* (+11,7%)**
Peso da gema (g)	1º Período (dia 0 a 29) (n=30)	16,56 \pm 1,02	17,76 \pm 1,53* (+7,3%)**	16,84 \pm 1,37	----	17,73 \pm 1,37* (+7,1%)**	17,00 \pm 0,99	----
	2º Período (dia 30 a 40) (n=11)	16,51 \pm 0,70	----	17,42 \pm 0,99* (+5,5%)**	17,90 \pm 0,96* (+8,4%)**	----	16,91 \pm 0,91	17,84 \pm 1,06* (+8,1%)**
	3º Período (dia 41 a 63) (n=23)	16,55 \pm 0,79	----	17,09 \pm 0,89	18,36 \pm 0,90* (+10,9%)**	----	17,32 \pm 0,99* (+4,7%)**	18,17 \pm 1,25* (+9,8%)**

* Diferenças significativas, para um nível de significância de 5%, quando comparado com o grupo de controlo.

** Os resultados entre parêntesis representam a % de alteração relativamente ao grupo de controlo.

De um modo geral, e comparando os pesos dos ovos assinalados no Quadro 11 com os dados do volume ingerido por cada grupo de tratamento representados no Quadro 10, verificamos que o peso dos ovos não está relacionado directamente com o volume ingerido, pois alguns dos grupos de tratamento que ingeriram maior volume de chá, como o grupo do chá verde a 1%, não apresentam ovos maiores por esse facto.

4 – Apresentação e Discussão de Resultados

Quadro 12 - Efeito dos tratamentos com chá preto a 0,5% e 1% e com chá verde a 0,5% e 1% no peso total do ovo, casca, clara e gema, durante as quatro primeiras semanas de tratamento (os resultados apresentam-se sob a forma de média \pm SD).

		Tratamentos				
		Controlo	Chá preto 0,5%	Chá preto 1%	Chá verde 0,5%	Chá verde 1%
Peso total do ovo (g) (n=7)	1ª semana	59,80 \pm 1,06	61,81 \pm 2,12	60,61 \pm 3,06	67,70 \pm 2,03* (+13,2%)**	61,64 \pm 2,61
	2ª semana	62,37 \pm 2,37	62,54 \pm 1,05	60,26 \pm 2,04	67,63 \pm 1,80* (+8,4%)**	62,3 \pm 2,62
	3ª semana	60,73 \pm 2,45	63,12 \pm 2,81	62,83 \pm 1,85	67,86 \pm 3,32* (+11,7%)**	62,29 \pm 2,18
	4ª semana	60,65 \pm 2,51	61,44 \pm 3,06	61,60 \pm 2,10	65,64 \pm 3,31* (+8,2%)**	61,84 \pm 3,08
Peso da casca (g) (n=7)	1ª semana	7,30 \pm 0,49	8,03 \pm 0,38	7,55 \pm 0,59	9,04 \pm 0,55* (+23,8%)**	8,47 \pm 1,00* (+16,0%)**
	2ª semana	8,52 \pm 0,51	7,86 \pm 0,34* (-7,8%)**	7,70 \pm 0,47* (-9,6%)**	8,60 \pm 0,31	7,77 \pm 0,29* (-8,8%)**
	3ª semana	8,25 \pm 0,26	8,21 \pm 0,28	8,04 \pm 0,16	8,76 \pm 0,13* (+6,2%)**	7,96 \pm 0,33* (-3,5%)**
	4ª semana	7,94 \pm 0,35	7,96 \pm 0,41	7,92 \pm 0,41	8,38 \pm 0,42	7,77 \pm 0,52
Peso da clara (g) (n=7)	1ª semana	35,71 \pm 1,06	36,33 \pm 2,18	36,04 \pm 2,62	40,94 \pm 2,04* (+14,7%)**	36,91 \pm 2,29
	2ª semana	37,22 \pm 2,59	36,47 \pm 1,94	36,6 \pm 2,83	40,42 \pm 2,36	37,67 \pm 2,75
	3ª semana	36,51 \pm 2,55	36,76 \pm 3,55	37,37 \pm 2,79	41,35 \pm 4,26	37,35 \pm 2,80
	4ª semana	35,93 \pm 2,87	36,77 \pm 3,64	35,50 \pm 2,25	41,06 \pm 3,62	37,04 \pm 3,35
Peso da gema (g) (n=7)	1ª semana	16,79 \pm 1,57	16,94 \pm 2,33	17,02 \pm 1,41	17,72 \pm 1,85	16,61 \pm 1,59
	2ª semana	17,15 \pm 0,93	18,22 \pm 1,39	15,78 \pm 1,42	18,40 \pm 1,44	16,96 \pm 0,61
	3ª semana	15,97 \pm 0,44	18,15 \pm 0,86* (+13,7%)**	17,42 \pm 1,69* (+9,1%)**	17,75 \pm 1,65* (+11,2%)**	17,28 \pm 0,81
	4ª semana	16,79 \pm 0,70	17,60 \pm 1,04	17,18 \pm 0,60	17,57 \pm 0,74	17,23 \pm 0,76

* Diferenças significativas, para um nível de significância de 5%, quando comparado com o grupo de controlo.

** Os resultados entre parêntesis representam a % de alteração relativamente ao grupo de controlo.

Ao contrário dos resultados deste estudo, Azeke e Ekpo (2009) não encontraram diferenças significativas no peso total do ovo e dos seus constituintes para os tratamentos com chá preto a 1% e chá preto a 2%. Neste estudo apenas foram encontrados aumentos significativos no peso total do ovo (7%) e no peso da gema (6%) no grupo tratado com alho em pó a 1%, quando comparado com o grupo de controlo. Igualmente, Biswas e Wakita (2001a) não reportaram alterações significativas no peso total dos ovos, para um tratamento com chá verde em pó a 0,3%.

Dada a escassez de estudos realizados com a administração de chá, podemos reportar-nos a outros trabalhos realizados com o objectivo de diminuir o teor de colesterol nos ovos. Deste modo, em estudos onde foi utilizado o alho em pó (Canogullari *et al.*, 2009) foram observadas reduções no peso dos ovos para concentrações de alho de 2% (uma redução de 1,4%). Em contraste, num outro estudo com alho em pó nas concentrações de 0,5% e 1% observou-se um aumento significativo do peso total do ovo de cerca de 2% (Yalçin *et al.*, 2006). Igualmente, em estudos realizados com sementes de cominhos pretos foi

detectado um aumento de cerca de 6% do peso dos ovos para os tratamentos com concentrações mais elevadas (2 e 3%) de sementes (Aydin *et al.*, 2008 e Yalçin *et al.*, 2009).

No que diz respeito à casca dos ovos, foram também relatadas reduções significativas no peso da casca de 3,7%, 2,2% e 3,1% para os tratamentos com 0,5%, 1% e 2% de alho em pó, respectivamente (Canogullari *et al.*, 2009).

Relativamente ao peso da gema do ovo, em estudos onde foram administrados alho e inulina, não foram encontradas alterações significativas (Yalçin *et al.*, 2006, Canogullari *et al.*, 2009, Shang *et al.*, 2010). No entanto, no tratamento com sementes de cominhos pretos observaram-se aumentos no peso da gema de 10%, para os animais suplementados com 1% de sementes (Aydin *et al.*, 2008), valores próximos dos detectados no presente estudo.

4.5 TEOR DE COLESTEROL TOTAL NA GEMA DE OVO

Na Figura 22 estão representadas as concentrações médias do teor de colesterol total na gema de ovo, para todos os grupos de tratamento ao longo do estudo, divididas em 3 períodos (representados por uma linha vertical preta). Verifica-se que até ao dia 28, altura em que as galinhas estavam a ser tratadas com chá preto a 0,5% e 1% e chá verde a 0,5% e 1%, não houve variações do teor de colesterol total dos grupos de tratamento, quando comparados com o grupo de controlo. Por essa razão foram alteradas as concentrações de chá preto de 0,5% para 2% e as concentrações do chá verde de 0,5% para 2%. No entanto, a partir do dia 42 (após 6 semanas), começa a haver uma diminuição da concentração média do teor de colesterol total na gema de ovo observada em todos os tratamentos em relação ao grupo de controlo.

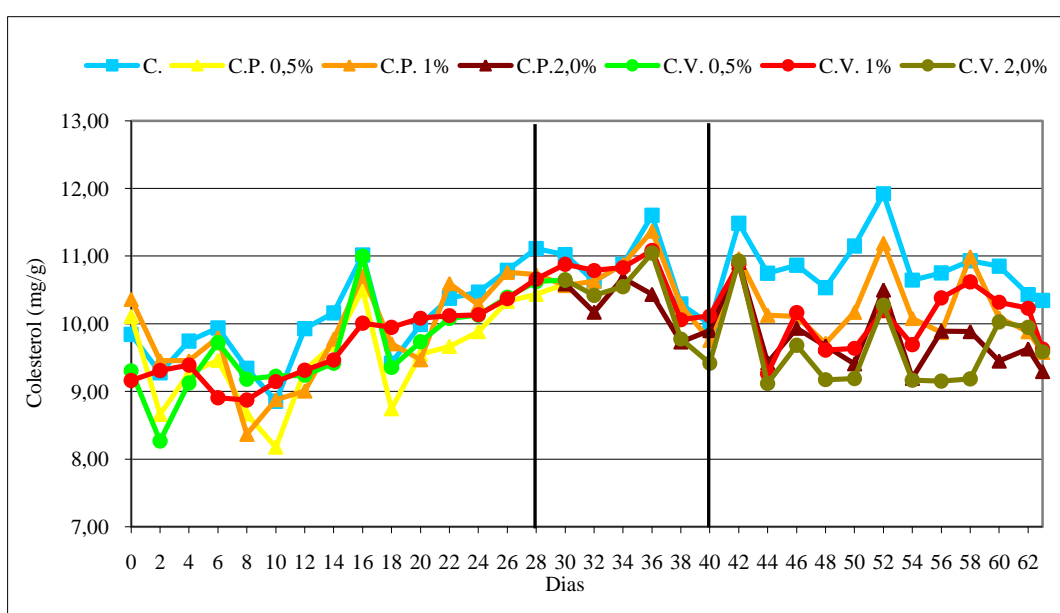


Figura 22 – Concentração média do teor de colesterol total na gema de ovo (mg/g) durante 63 dias de tratamento, para os grupos controlo (C), chá preto a 0,5% (C.P.0,5%), chá preto a 1% (C.P.1%), chá preto a 2% (C.P.2,0%), chá verde a 0,5 (C.V.0,5%), chá verde a 1% (C.V.1%) e chá verde a 2% (C.V.2%).

4 – Apresentação e Discussão de Resultados

A média do teor de colesterol total no ovo, para cada grupo de tratamento encontra-se representada na Figura 23, dividida nos mesmos 3 períodos indicados na Figura 22 (divididos por uma linha vertical preta). Ao longo do tempo nota-se que não existem diferenças substanciais entre os grupos de tratamento e o grupo de controlo. Mesmo a partir do dia 44, altura em que foram registadas alterações no teor de colesterol na gema de ovo nos animais tratados (Figura 22), o teor de colesterol total no ovo não apresentou a mesma redução.

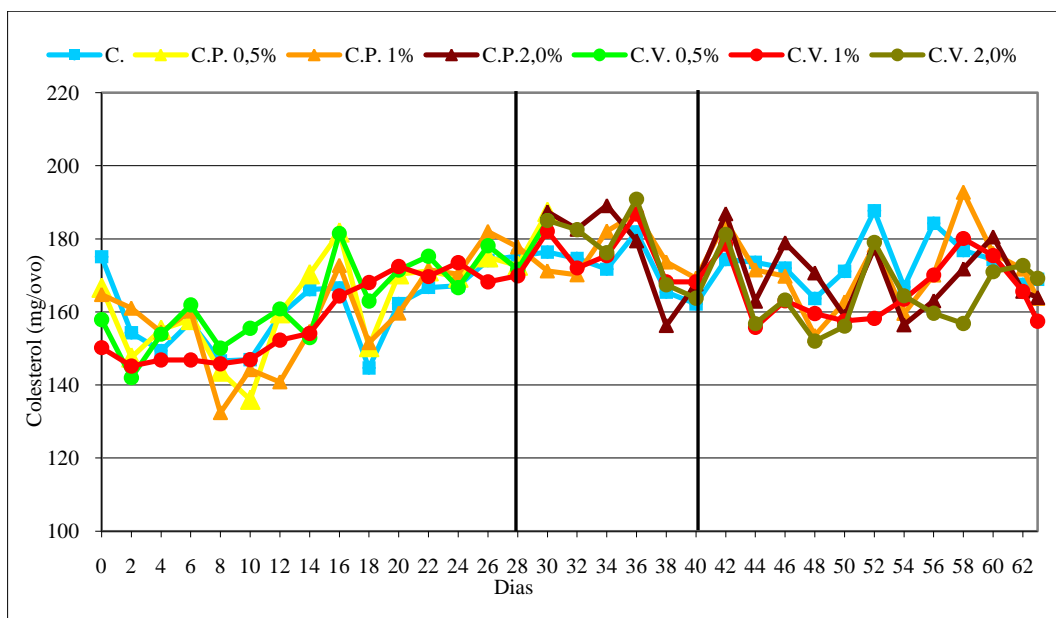


Figura 23 – Concentração média do teor de colesterol total no ovo (mg/ovo) durante 63 dias de tratamento, para os grupos controlo (C), chá preto a 0,5% (C.P.0,5%), chá preto a 1% (C.P.1%), chá preto a 2% (C.P.2,0%), chá verde a 0,5 (C.V.0,5%), chá verde a 1% (C.V.1%) e chá verde a 2% (C.V.2%).

No Quadro 13 são apresentados os valores médios da concentração de colesterol na gema de ovo (mg/g) no grupo controlo e em cada um dos grupos de tratamento (chá preto a 0,5%, 1% e 2% e chá verde a 0,5%, 1% e 2%) divididos pelos três períodos estudados (1º período: 0 a 30; 2º período: 30 a 40; 3º período: 40 a 63).

Os tratamentos com chá preto (1% e 2%) e chá verde (1% e 2%) resultaram em diminuições significativas no teor de colesterol total na gema de ovo, no 3º período do tratamento (após 6 semanas de tratamento). Para este intervalo de tempo, as galinhas que foram tratadas com chá preto a 1% e 2% apresentaram uma média de teor de colesterol total na gema de ovo de 10,23 mg/g e 9,77 mg/g, respectivamente, menos 6,1% e 10,3% que os valores do grupo de controlo. As galinhas às quais foi administrado chá verde a 1% e 2% apresentaram uma média de teor de colesterol total na gema de ovo de 10,05 mg/g e 9,62 mg/g, respectivamente, representando uma redução no teor de colesterol em relação ao grupo de controlo de 7,7% e 11,7%, respectivamente.

Apesar das reduções significativas na concentração de colesterol na gema de ovo já referidas, não foram encontradas alterações significativas no teor de colesterol total no ovo, para nenhum dos tratamentos. Isto deve-se ao facto de, para o período em que foram encontradas alterações significativas

4 – Apresentação e Discussão de Resultados

no teor de colesterol total na gema de ovo, ter havido um aumento significativo do tamanho da gema, (Quadro 11), o que nos leva a concluir que a diminuição da concentração de colesterol está relacionada com um efeito de diluição, não sendo por isso reflectida na quantidade de colesterol no total do ovo.

Quadro 13 – Efeito dos tratamentos com chá preto a 0,5%, 1% e 2% e com chá verde a 0,5%, 1% e 2% no teor de colesterol total na gema de ovo e no teor de colesterol total no ovo (os resultados apresentam-se sob a forma de média \pm SD).

		Tratamentos						
		Controlo	Chá preto 0,5%	Chá preto 1%	Chá preto 2%	Chá verde 0,5%	Chá verde 1%	Chá verde 2%
Teor de colesterol total na gema de ovo (mg/g)	1º Período (dia 0 a 28) (n=60)	10,02 \pm 1,01	9,50 \pm 1,00	9,82 \pm 0,97	----	9,65 \pm 1,04	9,67 \pm 0,72	----
	2º Período (dia 30 a 40) (n=24)	10,74 \pm 0,71	----	10,58 \pm 0,76	10,25 \pm 0,71	----	10,63 \pm 0,74	10,31 \pm 0,78
	3º Período (dia 42 a 63) (n=48)	10,89 \pm 0,84	----	10,23 \pm 0,76* (-6,1%)**	9,77 \pm 0,80* (-10,3%)**	----	10,05 \pm 0,86* (-7,7%)**	9,62 \pm 0,79* (-11,7%)**
Teor de colesterol total no ovo (mg/ovo)	1º Período (dia 0 a 28) (n=60)	160,8 \pm 24,7	161,9 \pm 20,5	159,9 \pm 21,6	----	162,8 \pm 21,9	158,3 \pm 14,3	----
	2º Período (dia 30 a 40) (n=24)	172,0 \pm 16,2	----	175,5 \pm 17,6	177,1 \pm 21,1	----	175,5 \pm 14,0	177,6 \pm 11,9
	3º Período (dia 42 a 63) (n=48)	173,4 \pm 19,3	----	171,2 \pm 20,1	169,8 \pm 20,5	----	165,4 \pm 18,5	165,2 \pm 14,5

* Diferenças significativas, para um nível de significância de 5%, quando comparado com o grupo de controlo.

** Os resultados entre parêntesis representam a % de alteração relativamente ao grupo de controlo.

Os resultados apresentados vão em parte de encontro aos publicados por Azeke e Ekpo (2009), que para uma concentração de chá preto a 2% reportam uma diminuição significativa no teor de colesterol na gema de ovo, embora de uma ordem de grandeza bastante superior (diminuição de 66%), para um período de tratamento de 4 semanas. Neste mesmo estudo, Azeke e Ekpo (2009) utilizaram também alho em pó, tendo publicado que, nas concentrações de 1% e 2% de alho em pó havia também uma redução muito elevada do teor de colesterol total na gema de ovo de 70% e 65%, respectivamente, valor este que não é confirmado em nenhum outro estudo com o alho. Também os valores apresentados por estes autores, para o teor em colesterol, são muito elevados (79 mg/g no grupo controlo e 18 mg/g para o chá a 2%), muito acima dos valores publicados para a gema de ovo (10 a 12 mg/g).

O alho, como já anteriormente referido, é outro dos alimentos utilizados na redução do teor de colesterol. Yalçin *et al.* (2006) ao utilizarem alho em pó na concentração de 1% descrevem uma redução significativa no teor de colesterol total da gema de ovo de 10,3%. No entanto, à semelhança dos dados do presente estudo (Quadro 13), estes autores também não encontraram alterações significativas na quantidade total de colesterol do ovo. Num outro estudo com alho em pó (Canogullari *et al.*, 2009), foram encontradas reduções mais elevadas (cerca de 35%) no teor de colesterol total na gema de ovo. No entanto, também estes autores apresentam valores muito elevados no teor de colesterol na gema (20,3 mg/g no grupo de controlo).

Estudos com outros alimentos referem também efeitos semelhantes aos apresentados no presente trabalho. Por exemplo, ao utilizarem cominhos pretos nas concentrações de 1,0% e 1,5%, Yalçin *et al.* (2009) conseguiram reduções significativas do teor de colesterol total na gema de ovo de 10,9% e 11,6%, respectivamente. No entanto, ao contrário dos resultados do presente estudo (Quadro 13) estes autores reportaram reduções significativas no teor de colesterol total no ovo de cerca de 16%. Igualmente, Shang *et al.* (2010) ao utilizaram inulina na redução do teor de colesterol total na gema de ovo observaram que uma concentração de 2% de inulina reduzia significativamente o teor de colesterol total na gema de ovo e o teor de colesterol total no ovo em 18,3% e 18,8%, respectivamente.

Após terminarem os tratamentos, as galinhas foram deixadas em postura por mais 4 dias. Durante esse período foram tratadas *ad libitum* com ração e água, findo o qual os ovos foram colhidos e sujeitos a análise do teor de colesterol total na gema de ovo. Após análise, o grupo de controlo, os grupos do chá preto a 1% e 2%, e os grupos do chá verde a 1% e 2% apresentavam médias de teor de colesterol total na gema de ovo de 9,75 mg/g, 9,64 mg/g, 8,97 mg/g, 9,25 mg/g e 9,11 mg/g, respectivamente, mantendo-se assim o efeito de redução do teor de colesterol total na gema do ovo (redução de 7 a 8% para 2% de chá).

4.6 TEOR DE COLESTEROL TOTAL NO PLASMA

O efeito dos tratamentos com chá preto a 1% e 2%, e chá verde a 1% e 2% no teor de colesterol total no plasma das galinhas no final do trabalho, encontra-se representado no Quadro 14. No final dos tratamentos, as galinhas tratadas com chá verde a 2% apresentavam uma média de teor de colesterol total no plasma de 2,40 mg/ml, valor significativamente diferente ($P < 0,05$) do teor em colesterol no plasma do grupo controlo (3,34 mg/ml). Apesar de terem sido registadas alterações significativas no teor de colesterol total na gema de ovo para todos os tratamentos, apenas o tratamento com chá verde a 2% resultou em reduções significativas ($P < 0,05$) no teor de colesterol total no plasma (redução de 28% quando comparado com o grupo de controlo).

Quadro 14 – Efeito dos tratamentos com chá preto a 1% e 2% e com chá verde a 1% e 2% no teor de colesterol total no plasma das galinhas no final do tratamento (os resultados encontram-se sob a forma de média \pm SD).

	Tratamentos				
	Controlo	Chá preto 1%	Chá preto 2%	Chá verde 1%	Chá verde 2%
Teor de colesterol total no plasma (mg/ml)	3,34 \pm 0,42	3,54 \pm 0,32	3,24 \pm 0,17	3,22 \pm 0,40	2,40 \pm 0,53* (-28,1%)**

* Diferenças significativas, para um nível de significância de 5%, quando comparado com o grupo de controlo.

** Os resultados entre parêntesis representam a % de alteração relativamente ao grupo de controlo.

Dos estudos realizados com chá, apenas um estudo faz referência ao teor de colesterol total no soro de sangue, quando administrado chá verde em pó nas concentrações de 0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,5%. Biswas e Wakita (2001b) observaram que o chá verde em pó, nas concentrações atrás indicadas, reduzia

significativamente a concentração de colesterol total no soro de sangue (mg/100ml) em 22%, 20%, 17% e 16%, respectivamente. Os dados de Biswas e Wakita são diferentes dos apresentados no presente trabalho (Quadro 14), pois referem diminuições significativas ($P < 0,05$) para todos os tratamentos com chá verde (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,5%) em ordem inversa ao aumento da concentração de chá, enquanto no presente trabalho apenas o tratamento com chá verde a 2% apresenta reduções significativas ($P < 0,05$) no teor de colesterol total no plasma.

Trabalhos que utilizam outros alimentos na diminuição do teor de colesterol total na gema de ovo, também apresentam resultados relativos ao teor de colesterol total no plasma sanguíneo semelhantes ao efeito de 2% de chá verde observado no presente trabalho (Quadro 14). Por exemplo, no que diz respeito à adição de alho em pó à dieta alimentar das galinhas, Yalçin *et al.* (2006) relataram reduções significativas no teor de colesterol total no soro de 6,5% e 18%, quando utilizadas concentrações de alho em pó de 0,5% e 1%, respectivamente, durante um período de 22 semanas. Para o mesmo alimento, Canogullari *et al.* (2009) mostraram que concentrações de 0,5%, 1% e 2%, reduzem significativamente o valor das lipoproteínas LDL no plasma de sangue, sem afetarem as HDL, apresentando taxas de redução de 14%; 22% e 33%, respectivamente, quando comparadas com o grupo de controlo. No entanto, no presente estudo apenas o chá verde a 2% reduziu significativamente a concentração plasmática de colesterol total. Desta forma, o efeito da redução do conteúdo de colesterol da gema, observado nos dois tipos de chá (preto e verde), não estará directamente relacionado com a diminuição do colesterol sanguíneo.

5 – CONCLUSÃO

Com a realização da presente tese pretendeu-se determinar o efeito da inclusão na alimentação das galinhas de chá dos Açores, chá preto e chá verde, na diminuição do teor de colesterol total na gema de ovo. Este estudo é pioneiro uma vez que os estudos publicados que utilizam chá para diminuição do teor de colesterol total na gema de ovo são pouco credíveis, utilizando apenas chá preto que é dado às galinhas na sua forma de pó solúvel misturado com a ração, e não chá bebível como no presente estudo.

Concluiu-se que os tratamentos com chá preto a 1%, chá preto a 2%, chá verde a 1% e chá verde a 2% reduzem significativamente ($P < 0,05$) o teor de colesterol total na gema de ovo (mg/g) não afectando o peso das galinhas nem o rendimento da produção de ovos. Estas reduções não se fizeram notar no teor de colesterol total do ovo (mg/ovo) uma vez que houve um aumento significativo ($P < 0,05$) do peso da gema, o que nos leva a concluir que a diminuição no teor de colesterol total na gema de ovo está relacionada com um efeito de diluição, não sendo por isso reflectida na quantidade total de colesterol no ovo. É de realçar que o volume diário ingerido pelas galinhas não é inibido com a administração do chá, pois as galinhas em tratamento ingeriram em média maior quantidade de chá do que as galinhas que ingeriam água (controlo).

Apesar das reduções do teor de colesterol total na gema de ovo, apenas o tratamento com chá verde a 2% apresentou uma redução significativa ($P < 0,05$) do teor de colesterol total no plasma, no final dos tratamentos. Uma vez que o colesterol existente na gema do ovo provém do colesterol do plasma sanguíneo, este poderia ser o mecanismo pelo qual se manifesta a redução de colesterol na gema de ovo. No entanto, ambos os tipos de chá (preto e verde) tiveram um efeito idêntico na diminuição do teor em colesterol na gema, pelo que o mecanismo implicado nessa diminuição é independente do teor de colesterol no plasma. Concluimos assim que a oxidação dos flavonóides do chá, realizada pela polifenoloxidase (tratamento dado ao chá preto), não altera uma possível acção fisiológica dos componentes do chá no aumento da gema e conseqüente diminuição na concentração de colesterol. As propriedades anti-colesterolémicas do chá associadas aos flavonóides podem ser responsáveis pela redução do teor de colesterol total na gema de ovo contudo, o mecanismo fisiológico implicado necessita ser mais aprofundado, podendo este trabalho constituir um ponto de partida para investigações futuras.

Aparentemente, após terminar o estudo, os efeitos de redução do teor de colesterol total na gema do ovo continuam a ser notados, pelo menos até 4 dias após o *terminus* da ingestão do chá. Em estudos futuros seria interessante perceber durante quanto tempo os efeitos de redução são mantidos, após a retirada dos tratamentos, e se estes efeitos são reversíveis.

O peso total do ovo não foi alterado significativamente pelos tratamentos. O peso da casca diminuiu significativamente com os tratamentos, sendo de interesse em trabalhos futuros o estudo da

estrutura casca e da influência dos tratamentos com chá na qualidade e conservação do ovo. O peso da clara apresentou um aumento significativo no 3º período do tratamento apenas para o grupo tratado com chá verde a 2%. Ao longo do estudo notamos que as claras dos ovos sujeitos a tratamento apresentavam uma consistência diferente das claras dos ovos do grupo de controlo, podendo esta observação consistir num ponto de partida para investigações futuras. O peso da gema apresentou um aumento significativo ($P < 0,05$) com a ingestão de chá, como já referido anteriormente. Em trabalhos futuros seria interessante estudar a composição da gema, que não nos foi possível realizar no presente trabalho dado encontrar-se fora do âmbito da presente tese.

Este estudo constituiu uma primeira abordagem ao tema, uma vez que o conhecimento sobre este assunto ainda é muito limitado. Em trabalhos futuros seria importante estudar a administração das folhas de chá juntamente com a ração das galinhas em vez do chá bebível, de modo a avaliar se os efeitos seriam semelhantes aos encontrados neste estudo. Caso as folhas de chá tenha o mesmo efeito que o chá bebível, tornar-se-ia mais prático a utilização destas para uma aplicação na indústria.

O presente trabalho apresenta pela primeira vez resultados promissores na utilização de chá produzido nos Açores na redução de colesterol na gema e, no caso do chá verde, no plasma sanguíneo das galinhas. Consideramos desta forma que a utilização de chá dos Açores, chá preto e chá verde, poderá proporcionar uma vantagem para a indústria avícola ao passar a produzir ovos com um teor reduzido em colesterol.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abell, L.L., Levy, B.B., Brodie, B.B. & Kendall, F.E. (1951). A Simplified Method for the Estimation of Total Cholesterol in Serum and Demonstration of its Specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 195, 357-366.
- American Heart Association (2011). *Why cholesterol matters: atherosclerosis*. Data de consulta: Setembro 23, 2011 de http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Cholesterol/WhyCholesterolMatters/Atherosclerosis_UCM_305564_Article.jsp
- Aurand, L.W., Woods, A.E. & Wells, M.R. (1987). *Food composition and analysis*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Aydin, R., Karaman, M., Cicek, T. & Yardibi, H. (2008). Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Supplementation in Layers. *Poultry Science*, 87, 2590-2595.
- Azeke, M. A. & Ekpo, K. E. (2009). Egg Yolk Cholesterol Lowering Effects of Garlic and Tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(12), 1113-1117.
- Baptista, J.A.B., Tavares, J.F.P. & Carvalho, R.C.B. (1998). Comparison of Catechins and Aromas Among Different Green Teas Using HPLC/SPME-GC. *Food Research International*, 31 (10), 729-736.
- Baptista, J.A.B., Tavares, J.F.P. & Carvalho, R.C.B. (1999). Comparative Study and Partial Characterization of Azorean Green Tea Polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 273-287.
- Basmacioglu, H. & Ergul, M. (2005). Research on the Factors Affecting Cholesterol Content and Some Other Characteristics of Eggs in Laying Hens - The Effects of Genotype and Rearing System. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 157-164.
- Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*, Fourth Edition. Germany: Springer.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2006). *Biochemistry*, Sixth Edition. New York: W.H. Freeman & Company.
- Beyer, R.S. & Jensen, L.S. (1989). Overestimation of the Cholesterol Content of Eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(4), 917-920.
- Bingham, S.A. *et al.* (1997). Effect of Black Tea Drinking on Blood Lipids, Blood Pressure and Aspects of Bowel Habit. *British Journal of Nutrition*, 78, 41-55.
- Biswas, A.H. & Wakita, M. (2001a). Comparison of Two Dietary Factors, Green Tea Powder Feeding and Feed Restriction, Influencing Laying Performance and Egg Quality in Hens. *Bulletin Faculty of Bioresources Mie University*, 25-26, 56-61.
- Biswas, A.H. & Wakita, M. (2001b). Effect of Dietary Japanese Green Tea Powder Supplementation on Feed Utilization and Carcass Profiles in Broilers. *Journal of Poultry Science*, 38, 50-57.
- Bou, R., Codony, R., Alba, T., Decker, E.A. & Guardiola, F. (2009). Dietary Strategies to Improve Nutritional Value, Oxidative Stability, and Sensory Properties of Poultry Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49 (9), 800-822.
- Broody, T. (1999). *Nutritional biochemistry*, Second Edition. California: Academic Press.
- Cabrera, C., Artacho, R. & Giménez, R. (2006). Beneficial Effects of Green Tea – A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25 (2), 79–99.
- Cadenas, E. & Packer, L. (2005). *Handbook of antioxidants*, Second Edition. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Canogullari, S. *et al.* (2009). Effect of Garlic Powder on Egg Yolk and Serum Cholesterol and Performance of Laying Hens. *The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 53, 515-519.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. & Ferrier, D.R. (2008). *Lippincott's illustrated reviews: biochemistry*, Fourth Edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Clifton, M. *et al.* (2004). Cholesterol-Lowering Effects of Plant Sterol Esters Differ in Milk, Yoghurt, Bread and Cereal. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, 503–509.

- Devlin, T.M. (2007). *Manual de bioquímica com correlações clínicas*, 6ª Edição. São Paulo: Editora Blucher.
- Dikmen, B. Y. & Sahan, U. (2007). Correlations Between Breeder Age, Egg Cholesterol Content, Blood Cholesterol Level and Hatchability of Broiler Breeders. *British Poultry Science*, 48 (1), 98-103.
- European Society of Cardiology (2007). European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice: Executive Summary. *European Heart Journal*, 28, 2375–2414.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G.H.S. (1957). Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Frejngel, S. (2007). Comparison of Polyphenolic Composition of Extracts from Honeysuckle, Chokeberries and Green Tea – A Short Report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57 (1), 83–86.
- Gargari, B.P., Attary, V.E., Rafraf, M. & Gorbani, A. (2009). Effect of Dietary Supplementation with *Nigella Sativa* L. on Serum Lipid Profile, Lipid Peroxidation and Antioxidant Defense System in Hyperlipidemic Rabbits. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(10), 815-821.
- Geissler, C.A. & Powers, H.J. (2005). *Human nutrition*, Eleventh Edition. Elsevier Churchill Livingstone.
- Gibson, G.R. & Williams, C.M. (2000). *Functional foods: concept to product*. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Gonçalves, S., Maria, A.V., Silva-Herdade, A.S., Silva, J.M. & Saldanha, C. (2007). Milk Enriched with Phytosterols Reduces Plasma Cholesterol Levels in Healthy and Hypercholesterolemic Subjects. *Nutrition Research*, 27, 200–205.
- Goreja, G. (2003). *Black seed: nature's miracle remedy*. New York: Amazing Herbs Press.
- Grotewold, E. (2006). *The science of flavonoids*. Germany: Springer.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L. & Frayn, K.N. (2002). *Lipid Biochemistry an introduction*, Fifth Edition. United Kingdom: Blackwell Science.

Holme, D.J. & Peck, H. (1998). *Analytical biochemistry*, Third Edition. England: Pearson Education Limited.

Instituto Nacional de Estatística (2011a). *As pessoas 2009: Estatísticas oficiais*, Edição 2011. Lisboa.

Instituto Nacional de Estatística (2011b). *Consumo humano de ovos per capita*. Data de consulta: Junho 20, 2011 de http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000217&contexto=bd&selTab=tab2.

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2007). *Tabela da composição de alimentos*. Lisboa: Centro de Segurança Alimentar e Nutrição.

Kirk, R.S. & Sawyer, R. (1991). *Pearson's composition and analysis of foods*, Ninth Edition. England: Addison Wesley Longman.

Kuroda, Y. & Hara, Y. (2004). *Health effects of tea and its catechins*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Lichtenstein, A.H. *et al.* (2006). Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation- Journal of American Heart Association*, 114, 82-96.

Macedo, G. (2008). *Exportação de chá*. Data de consulta: Setembro 19, 2011 de <http://www.expressodasnovas.pt/interiores.php?id=1853>.

Maron, D.J. *et al.* (2003). Cholesterol-Lowering Effect of a Theaflavin - Enriched Green Tea Extract: A Randomized Controlled Trial. *Archives of Internal Medicine*, 163 (12), 1448-1453.

McKay, D.L. & Blumberg, J.B. (2002). The Role of Tea in Human Health: An Update. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(1), 1-13.

McWilliams, M. (2007). *Nutrition and dietetics*, Eight Edition. Singapore: Pearson Education Inc.

Mine, Y. (2008). *Egg bioscience and biotechnology*. New Jersey: John Wiley and Sons.

- Mueller, M., Hobiger, S. & Jungbauer, A. (2010). Anti-Inflammatory Activity of Extracts from Fruits, Herbs and Spices. *Food Chemistry*, 122, 987-996.
- Nelson D.L. & Cox, M.M. (2004). *Lehninger principles of biochemistry*, Fourth Edition. W. H. Freeman Publishing.
- North, M.O. (1984). *Commercial chicken production manual*, Third Edition. Connecticut: AVI Publishing Company.
- Osman, H. & Chin, Y. K. (2006). Comparative Sensitivities of Cholesterol Analysis Using GC, HPLC and Spectrophotometric Methods. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 10 (2), 205-210.
- Panja, P. (2007). Effects of China Tea (*Camellia Sinensis*) Supplementation in the Diets on Growth Performance Carcass Quality and Cholesterol Content of Broilers. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 29(6), 1511-1517.
- Pasin, G., Smith, G.M. & O'Mahony, M. (1998). Rapid Determination of Total Cholesterol in Egg Yolk Using Commercial Diagnostic Cholesterol Reagent. *Food Chemistry*, 61 (1/2), 255-259.
- Paula, A.A. (2008). *Caracterização físico-química e avaliação do potencial antioxidante dos frutos da Terminalia Catappa Linn.* Tese de Mestrado em Engenharia dos Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brasil.
- Petisca, C.I.B. (2008). *Quantificação dos compostos bioativos em infusões de chá verde dos açores: comparação com os teores presentes em bebidas comerciais com chá verde.* Trabalho de Investigação, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto.
- Pomeranz, Y. & Meloan, C.E. (2000). *Food analysis: theory and practice*, Third Edition. New York: Aspen Publishers.
- Qureshi, A.I., Suri, M.F.K., Ahmed. S., Nasar, A., Divani, A.A., & Kirmani, J.F. (2007). Regular Egg Consumption does not Increase the Risk of Stroke and Cardiovascular Diseases. *Medical Science Monitor*, 13(1), CR1-8.

6 - Referências Bibliográficas

- Rehman, S.U., Almas, K., Shahzadi, N., Bhatti, N. & Saleem, A. (2002). Effect of Time and Temperature on Infusion of Tannins from Commercial Brands of Tea. *International Journal of Agriculture & Biology*, 4(2), 285-287.
- Saldanha, T., Mazalli, M.R. & Bragagnolo, N. (2004). Avaliação Comparativa Entre Dois Métodos para Determinação do Colesterol em Carnes e Leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, 24 (1), 109-113.
- Sarker, S.K., Ko, S.Y., Kim, G.W. & Yang, C.J. (2010). Effects of *Camellia Sinensis* and Mixed Probiotics on the Growth Performance and Body Composition in Broiler. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(7), 546-550.
- Shang, H.M., Hu, T.M., Lu, Y.J. & Wu, H.X. (2010). Effects of Inulin on Performance, Egg Quality, Gut Microflora and Serum and Yolk Cholesterol in Laying Hens. *British Poultry Science*, 51(6), 791-796.
- Silva, C.C.G. (1993). *Determinação enzimática e não enzimática do colesterol e ésteres de colesterol no sangue*. Relatório da aula prática apresentada para as provas APCC no âmbito da disciplina de Bioquímica, Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias.
- Stadelman, W.J. & Cotterill, O.J. (1995). *Egg science and technology*, Fourth Edition. New York: Food Products Press.
- Tel, R.M. & Berends, G. T. (1980). Incomplete Hydrolysis of Cholesteryl Esters during the Enzymatic Cholesterol Determination as Evidenced by Aqueous Cholesteryl Ester Solutions: Comparison of Six Enzymatic Procedures with the Liebermann-Burchard Method. *Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry*, 18, 595-601.
- Tokunaga, S. *et al.* (2002). Green tea consumption and serum lipids and lipoproteins in a population of healthy workers in Japan. *Annals of Epidemiology*, 12 (3), 157-165.
- United States Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service (2007). *What is the cholesterol content of eggs?* Data de consulta: Setembro 23, 2011 de http://www.fsis.usda.gov/Help/FAQS_Hotline_Nutrition/index.asp#3.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. (2008). *Phenolic compound biochemistry*. Germany: Springer.

- Wang, QD. *et al.* (2010). Association between Green Tea Intake and Coronary Artery Disease in a Chinese Population. *Circulation Journal*, 74, 294-300.
- Williams, C.M. (1999). Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose: Effects of Inulin on Lipid Parameters in Humans. *The Journal of Nutrition*, 129, 1471S–1473S.
- Wilson, T. & Temple, N.J. (2004). *Beverages in nutrition and health*. New Jersey: Humana Press.
- World Health Statistics (2011). *The top of 10 causes of death*. World Health Organization. Data de consulta: Junho 29, 2011, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>.
- Yalçın, S., Onbasilar, E.E., Reisli, Z. & Yalçın, S. (2006). Effect of Garlic Powder on the Performance, Egg Traits and Blood Parameters of Laying Hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1336-1339.
- Yalçın, S., Yalçın, S., Erol, H., Bugdayci, K.E., Ozsoy, B. & Çakir, S. (2009). Effects of Dietary Black Cumin Seed (*Nigella Sativa* L.) on Performance, Egg Traits, Egg Cholesterol Content and Egg Yolk Fatty Acid Composition in Laying Hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1737-1742.
- Yang, T.T.C. & Koo, W.L.W. (1997). Hypocholesterolemic Effects of Chinese Tea. *Pharmacological Research*, 35 (6), 505-512.
- Zazpe, I. *et al.* (2011). Egg Consumption and Risk of Cardiovascular Disease in the Sun Project. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65, 676–682.

A. DADOS ESTATÍSTICOS DO PESO DAS GALINHAS

ANOVA Table for Peso galinhas (kg)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	,006	,002	,189	,9420	,758	,085
Dias	1	,012	,012	1,547	,2232	1,547	,214
Tratamentos * Dias	4	,014	,004	,442	,7772	1,768	,137
Residual	30	,238	,008				

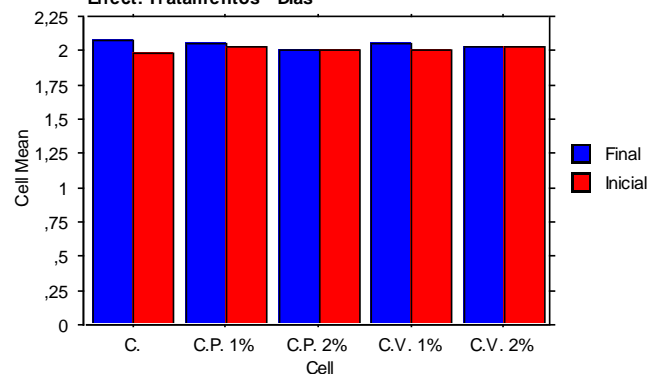
Means Table for Peso galinhas (kg)

Effect: Tratamentos * Dias

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C., Final	4	2,075	,096	,048
C., Inicial	4	1,975	,050	,025
C.P. 1%, Final	4	2,050	,100	,050
C.P. 1%, Inicial	4	2,025	,096	,048
C.P. 2%, Final	4	2,000	0,000	0,000
C.P. 2%, Inicial	4	2,000	,082	,041
C.V. 1%, Final	4	2,050	,129	,065
C.V. 1%, Inicial	4	2,000	,082	,041
C.V. 2%, Final	4	2,025	,096	,048
C.V. 2%, Inicial	4	2,025	,096	,048

Interaction Bar Plot for Peso galinhas (kg)

Effect: Tratamentos * Dias



B. DADOS ESTATÍSTICOS DO RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE OVOS

ANOVA Table for Rendimento produção ovos

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	236,203	59,051	,419	,7925	1,676	,120
Residual	15	2114,211	140,947				

Means Table for Rendimento produção ovos

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C	4	89,845	10,636	5,318
CP 1%	4	94,530	,901	,450
CP 2%	4	87,500	15,253	7,627
CV 1%	4	85,157	18,336	9,168
CV 2%	4	92,968	4,685	2,343

Interaction Bar Plot for Rendimento produção ovos

Effect: Tratamentos



C. DADOS ESTATÍSTICOS DO VOLUME INGERIDO

a. Volume ingerido dia 1 a 29

ANOVA Table for Volume ingerido

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Chá	4	397502,683	99375,671	26,217	<,0001	104,866	1,000
Residual	575	2179574,095	3790,564				

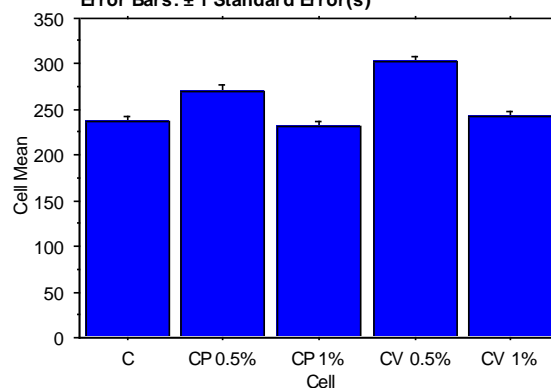
Means Table for Volume ingerido

Effect: Chá

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C	116	237,776	54,214	5,034
CP 0.5%	116	269,914	69,128	6,418
CP 1%	116	231,164	63,954	5,938
CV 0.5%	116	301,897	67,507	6,268
CV 1%	116	242,586	50,868	4,723

Interaction Bar Plot for Volume ingerido

Effect: Chá

Error Bars: ± 1 Standard Error(s)

Fisher's PLSD for Volume ingerido

Effect: Chá

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C, CP 0.5%	-32,138	15,878	<,0001	S
C, CP 1%	6,612	15,878	,4138	
C, CV 0.5%	-64,121	15,878	<,0001	S
C, CV 1%	-4,810	15,878	,5521	
CP 0.5%, CP 1%	38,750	15,878	<,0001	S
CP 0.5%, CV 0.5%	-31,983	15,878	<,0001	S
CP 0.5%, CV 1%	27,328	15,878	,0008	S
CP 1%, CV 0.5%	-70,733	15,878	<,0001	S
CP 1%, CV 1%	-11,422	15,878	,1582	
CV 0.5%, CV 1%	59,310	15,878	<,0001	S

b. Volume ingerido dia 30 a 40

ANOVA Table for Volume ingerido

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Chá	4	24056,136	6014,034	2,958	,0208	11,834	,789
Residual	215	437068,750	2032,878				

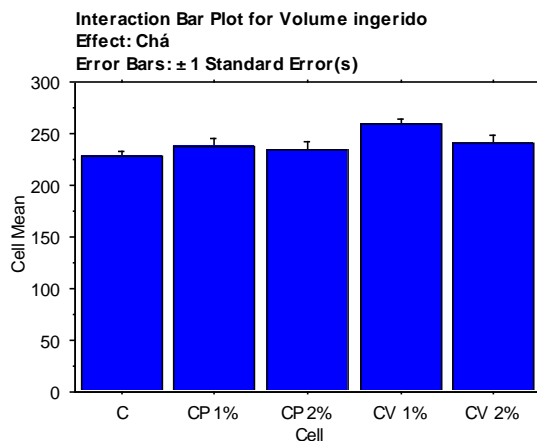
Means Table for Volume ingerido

Effect: Chá

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C	44	227,955	32,356	4,878
CP 1%	44	237,955	52,820	7,963
CP 2%	44	233,977	57,945	8,736
CV 1%	44	258,977	31,096	4,688
CV 2%	44	241,023	44,755	6,747

Fisher's PLSD for Volume ingerido
Effect: Chá
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C, CP 1%	-10,000	18,947	,2994	
C, CP 2%	-6,023	18,947	,5316	
C, CV 1%	-31,023	18,947	,0014	S
C, CV 2%	-13,068	18,947	,1754	
CP 1%, CP 2%	3,977	18,947	,6795	
CP 1%, CV 1%	-21,023	18,947	,0298	S
CP 1%, CV 2%	-3,068	18,947	,7499	
CP 2%, CV 1%	-25,000	18,947	,0099	S
CP 2%, CV 2%	-7,045	18,947	,4644	
CV 1%, CV 2%	17,955	18,947	,0632	



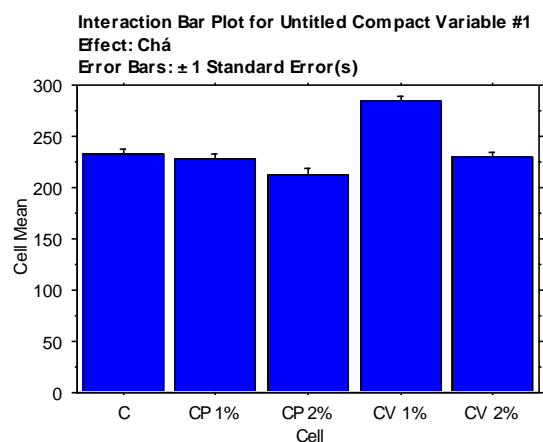
c. Volume ingerido dia 41 a 62

ANOVA Table for Untitled Compact Variable #1

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Chá	4	262012,841	65503,210	25,071	<,0001	100,286	1,000
Residual	435	1136509,659	2612,666				

Means Table for Untitled Compact Variable #1
Effect: Chá

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C	88	232,330	50,707	5,405
CP 1%	88	227,386	57,335	6,112
CP 2%	88	213,182	58,821	6,270
CV 1%	88	284,261	40,312	4,297
CV 2%	88	229,091	46,042	4,908



Fisher's PLSD for Untitled Compact Variable #1
Effect: Chá
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C, CP 1%	4,943	15,145	,5215	
C, CP 2%	19,148	15,145	,0133	S
C, CV 1%	-51,932	15,145	<,0001	S
C, CV 2%	3,239	15,145	,6745	
CP 1%, CP 2%	14,205	15,145	,0660	
CP 1%, CV 1%	-56,875	15,145	<,0001	S
CP 1%, CV 2%	-1,705	15,145	,8250	
CP 2%, CV 1%	-71,080	15,145	<,0001	S
CP 2%, CV 2%	-15,909	15,145	,0396	S
CV 1%, CV 2%	55,170	15,145	<,0001	S

D. DADOS ESTATÍSTICOS DO PESO TOTAL DO OVO

a. Dia 0 a 29

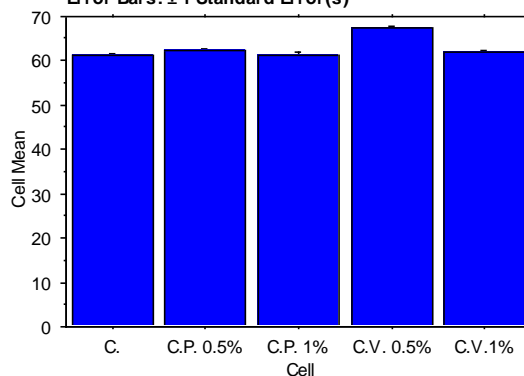
ANOVA Table for Peso total

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	767,500	191,875	32,272	<,0001	129,088	1,000
Residual	143	850,214	5,946				

Means Table for Peso total
Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	29	61,119	2,285	,424
C.P. 0.5%	30	62,260	2,267	,414
C.P. 1%	30	61,372	2,390	,436
C.V. 0.5%	29	67,336	2,793	,519
C.V.1%	30	62,005	2,428	,443

Interaction Bar Plot for Peso total
Effect: Tratamentos
Error Bars: ± 1 Standard Error(s)



Fisher's PLSD for Peso total
Effect: Tratamentos
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 0.5%	-1,141	1,255	,0744	
C., C.P. 1%	-,253	1,255	,6905	
C., C.V. 0.5%	-6,217	1,266	<,0001	S
C., C.V.1%	-,887	1,255	,1647	
C.P. 0.5%, C.P. 1%	,888	1,244	,1606	
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-5,076	1,255	<,0001	S
C.P. 0.5%, C.V.1%	,255	1,244	,6864	
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-5,964	1,255	<,0001	S
C.P. 1%, C.V.1%	-,633	1,244	,3161	
C.V. 0.5%, C.V.1%	5,331	1,255	<,0001	S

b. Dia 0 a 29 – Semanas

ANOVA Table for 1ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	236,661	59,165	11,024	<,0001	44,096	1,000
Residual	28	150,274	5,367				

Fisher's PLSD for 1ªsemana
Effect: Tratamentos
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 0.5%	-2,077	2,640	,1183	
C., C.P. 1%	-,805	2,640	,5372	
C., C.V. 0.5%	-7,898	2,740	<,0001	S
C., C.V.1%	-1,837	2,640	,1652	
C.P. 0.5%, C.P. 1%	1,271	2,537	,3133	
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-5,822	2,640	,0001	S
C.P. 0.5%, C.V.1%	,240	2,537	,8477	
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-7,093	2,640	<,0001	S
C.P. 1%, C.V.1%	-1,031	2,537	,4119	
C.V. 0.5%, C.V.1%	6,062	2,640	<,0001	S

Means Table for 1ªsemana
Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	59,803	1,065	,435
C.P. 0.5%	7	61,880	2,118	,801
C.P. 1%	7	60,609	3,060	1,157
C.V. 0.5%	6	67,702	2,032	,830
C.V.1%	7	61,640	2,609	,986

ANOVA Table for 2ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	188,002	47,001	11,227	<,0001	44,907	1,000
Residual	28	117,220	4,186				

Fisher's PLSD for 2ªsemana

Effect: Tratamentos
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
C., C.P. 0.5%	-,176	2,332	,8783
C., C.P. 1%	2,110	2,332	,0744
C., C.V. 0.5%	-5,258	2,420	,0001
C., C.V.1%	,070	2,332	,9516
C.P. 0.5%, C.P. 1%	2,286	2,240	,0458
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-5,082	2,332	,0001
C.P. 0.5%, C.V.1%	,246	2,240	,8239
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-7,368	2,332	<,0001
C.P. 1%, C.V.1%	-2,040	2,240	,0727
C.V. 0.5%, C.V.1%	5,328	2,332	<,0001

Means Table for 2ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	62,368	2,370	,967
C.P. 0.5%	7	62,544	1,052	,397
C.P. 1%	7	60,259	2,039	,771
C.V. 0.5%	6	67,627	1,801	,735
C.V.1%	7	62,299	2,625	,992

ANOVA Table for 3ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	173,449	43,362	6,690	,0007	26,759	,985
Residual	28	181,494	6,482				

Fisher's PLSD for 3ªsemana

Effect: Tratamentos
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
C., C.P. 0.5%	-2,396	2,901	,1018
C., C.P. 1%	-2,105	2,901	,1485
C., C.V. 0.5%	-7,133	3,011	<,0001
C., C.V.1%	-1,559	2,901	,2804
C.P. 0.5%, C.P. 1%	,291	2,788	,8320
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-4,737	2,901	,0024
C.P. 0.5%, C.V.1%	,837	2,788	,5434
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-5,029	2,901	,0014
C.P. 1%, C.V.1%	,546	2,788	,6915
C.V. 0.5%, C.V.1%	5,574	2,901	,0005

Means Table for 3ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	60,727	2,452	1,001
C.P. 0.5%	7	63,123	2,809	1,062
C.P. 1%	7	62,831	1,845	,697
C.V. 0.5%	6	67,860	3,319	1,355
C.V.1%	7	62,286	2,182	,825

ANOVA Table for 4ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	92,791	23,198	2,877	,0409	11,509	,702
Residual	28	225,759	8,063				

Fisher's PLSD for 4ªsemana

Effect: Tratamentos
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
C., C.P. 0.5%	-,789	3,236	,6215
C., C.P. 1%	-,955	3,236	,5506
C., C.V. 0.5%	-4,988	3,358	,0051
C., C.V.1%	-1,187	3,236	,4586
C.P. 0.5%, C.P. 1%	-,166	3,109	,9138
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-4,200	3,236	,0128
C.P. 0.5%, C.V.1%	-,399	3,109	,7948
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-4,034	3,236	,0164
C.P. 1%, C.V.1%	-,233	3,109	,8792
C.V. 0.5%, C.V.1%	3,801	3,236	,0230

Means Table for 4ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	60,648	2,511	1,025
C.P. 0.5%	7	61,437	3,055	1,155
C.P. 1%	7	61,603	2,104	,795
C.V. 0.5%	6	65,637	3,314	1,353
C.V.1%	7	61,836	3,077	1,163

c. Dia 30 a 40

ANOVA Table for Peso

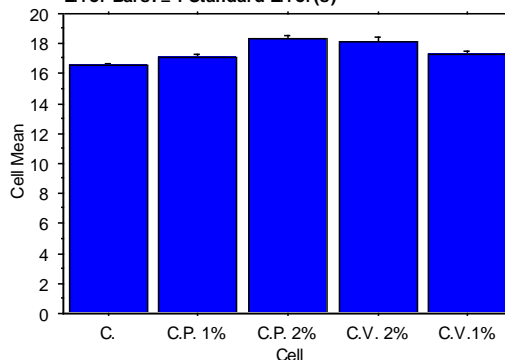
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	235,198	58,800	5,585	,0009	22,341	,973
Residual	50	526,390	10,528				

Means Table for Peso

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	11	62,315	2,545	,767
C.P. 1%	11	62,583	2,873	,866
C.P. 2%	11	61,837	3,287	,991
C.V. 2%	11	67,226	3,129	,944
C.V.1%	11	61,727	4,161	1,255

Interaction Bar Plot for Untitled Compact Variable #1
Effect: Tratamentos
Error Bars: ± 1 Standard Error(s)



Fisher's PLSD for Peso

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 1%	-,267	2,779	,8476	
C., C.P. 2%	,478	2,779	,7311	
C., C.V. 2%	-4,911	2,779	,0009	S
C., C.V.1%	,588	2,779	,6726	
C.P. 1%, C.P. 2%	,745	2,779	,5924	
C.P. 1%, C.V. 2%	-4,644	2,779	,0015	S
C.P. 1%, C.V.1%	,855	2,779	,5392	
C.P. 2%, C.V. 2%	-5,389	2,779	,0003	S
C.P. 2%, C.V.1%	,110	2,779	,9369	
C.V. 2%, C.V.1%	5,499	2,779	,0002	S

d. Dia 41 a 63

ANOVA Table for Untitled Compact Variable #1

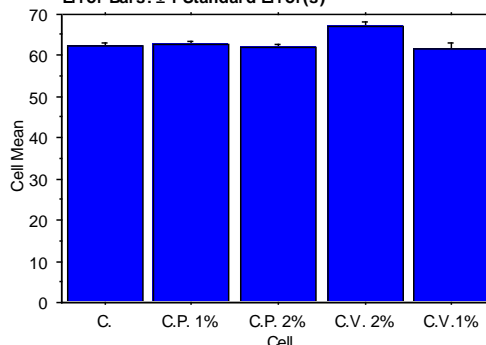
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	52,622	13,155	13,795	<,0001	55,178	1,000
Residual	110	104,904	,954				

Means Table for Untitled Compact Variable #1

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	23	16,550	,792	,165
C.P. 1%	23	17,088	,885	,185
C.P. 2%	23	18,357	,900	,188
C.V. 2%	23	18,169	1,254	,262
C.V.1%	23	17,320	,987	,206

Interaction Bar Plot for Untitled Compact Variable #1
Effect: Tratamentos
Error Bars: ± 1 Standard Error(s)



Fisher's PLSD for Untitled Compact Variable #1

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 1%	-,539	,571	,0641	
C., C.P. 2%	-1,808	,571	<,0001	S
C., C.V. 2%	-1,620	,571	<,0001	S
C., C.V.1%	-,771	,571	,0086	S
C.P. 1%, C.P. 2%	-1,269	,571	<,0001	S
C.P. 1%, C.V. 2%	-1,081	,571	,0003	S
C.P. 1%, C.V.1%	-,232	,571	,4218	
C.P. 2%, C.V. 2%	,188	,571	,5146	
C.P. 2%, C.V.1%	1,037	,571	,0005	S
C.V. 2%, C.V.1%	,849	,571	,0039	S

E. DADOS ESTATÍSTICOS DO PESO DA CASCA

a. Dia 0 a 29

ANOVA Table for Peso

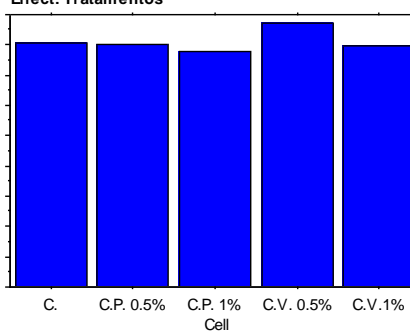
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	14,731	3,683	14,393	<,0001	57,572	1,000
Residual	143	36,588	,256				

Means Table for Peso

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	29	8,067	,614	,114
C.P. 0.5%	30	8,037	,353	,064
C.P. 1%	30	7,798	,447	,082
C.V. 0.5%	29	8,727	,441	,082
C.V.1%	30	7,974	,621	,113

Interaction Bar Plot for Peso



Fisher's PLSD for Peso

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 0.5%	,030	,260	,8208	
C., C.P. 1%	,269	,260	,0431	S
C., C.V. 0.5%	-,660	,263	<,0001	S
C., C.V.1%	,093	,260	,4818	
C.P. 0.5%, C.P. 1%	,239	,258	,0693	
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-,690	,260	<,0001	S
C.P. 0.5%, C.V.1%	,063	,258	,6303	
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-,929	,260	<,0001	S
C.P. 1%, C.V.1%	-,176	,258	,1799	
C.V. 0.5%, C.V.1%	,753	,260	<,0001	S

b. Dia 0 a 29 – Semanas

ANOVA Table for 1ªsemana

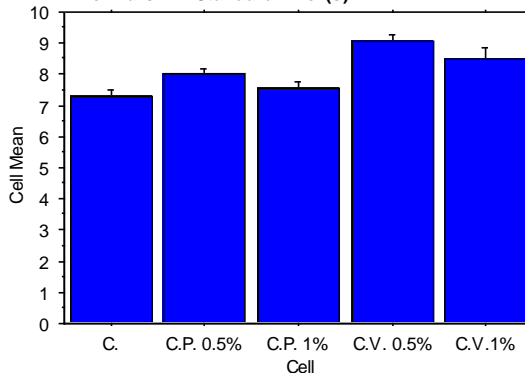
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	12,177	3,044	7,307	,0004	29,228	,992
Residual	28	11,665	,417				

Means Table for 1ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	7,303	,491	,200
C.P. 0.5%	7	8,034	,375	,142
C.P. 1%	7	7,554	,589	,223
C.V. 0.5%	6	9,043	,548	,224
C.V.1%	7	8,466	1,003	,379

Interaction Bar Plot for 1ªsemana



Fisher's PLSD for 1ªsemana

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 0.5%	-,731	,736	,0514	
C., C.P. 1%	-,251	,736	,4904	
C., C.V. 0.5%	-1,740	,763	<,0001	S
C., C.V. 1%	-1,162	,736	,0031	S
C.P. 0.5%, C.P. 1%	,480	,707	,1751	
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-1,009	,736	,0089	S
C.P. 0.5%, C.V. 1%	-,431	,707	,2215	
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-1,489	,736	,0003	S
C.P. 1%, C.V. 1%	-,911	,707	,0133	S
C.V. 0.5%, C.V. 1%	,578	,736	,1189	

ANOVA Table for 2ªsemana

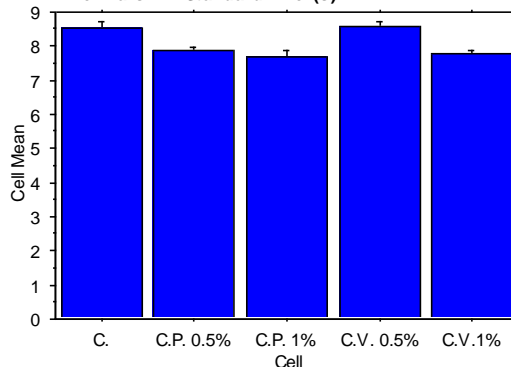
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	4,803	1,201	7,841	,0002	31,364	,995
Residual	28	4,288	,153				

Means Table for 2ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	8,515	,514	,210
C.P. 0.5%	7	7,861	,335	,126
C.P. 1%	7	7,696	,470	,178
C.V. 0.5%	6	8,600	,309	,126
C.V. 1%	7	7,766	,286	,108

Interaction Bar Plot for 2ªsemana
Effect: Tratamentos
Error Bars: ± 1 Standard Error(s)



Fisher's PLSD for 2ªsemana

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 0.5%	,654	,446	,0056	S
C., C.P. 1%	,819	,446	,0008	S
C., C.V. 0.5%	-,085	,463	,7096	
C., C.V. 1%	,749	,446	,0018	S
C.P. 0.5%, C.P. 1%	,166	,428	,4349	
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-,739	,446	,0021	S
C.P. 0.5%, C.V. 1%	,096	,428	,6508	
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-,904	,446	,0003	S
C.P. 1%, C.V. 1%	-,070	,428	,7404	
C.V. 0.5%, C.V. 1%	,834	,446	,0007	S

ANOVA Table for 3ªsemana

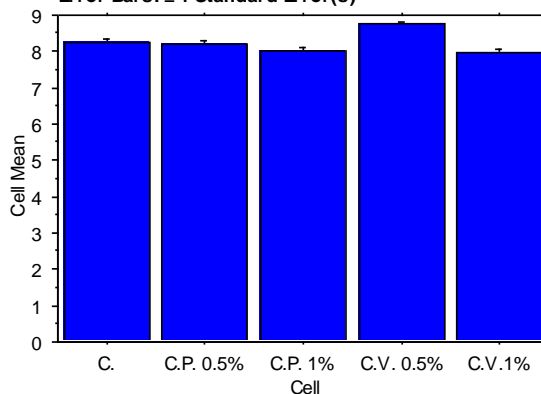
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	2,450	,613	10,193	<,0001	40,772	1,000
Residual	28	1,683	,060				

Means Table for 3ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	8,250	,262	,107
C.P. 0.5%	7	8,211	,275	,104
C.P. 1%	7	8,037	,159	,060
C.V. 0.5%	6	8,757	,134	,055
C.V. 1%	7	7,957	,327	,124

Interaction Bar Plot for 3ªsemana
Effect: Tratamentos
Error Bars: ± 1 Standard Error(s)



Fisher's PLSD for 3ªsemana

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 0.5%	,039	,279	,7794	
C., C.P. 1%	,213	,279	,1298	
C., C.V. 0.5%	-,507	,290	,0013	S
C., C.V. 1%	,293	,279	,0406	S
C.P. 0.5%, C.P. 1%	,174	,268	,1942	
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-,545	,279	,0004	S
C.P. 0.5%, C.V. 1%	,254	,268	,0624	
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-,720	,279	<,0001	S
C.P. 1%, C.V. 1%	,080	,268	,5464	
C.V. 0.5%, C.V. 1%	,800	,279	<,0001	S

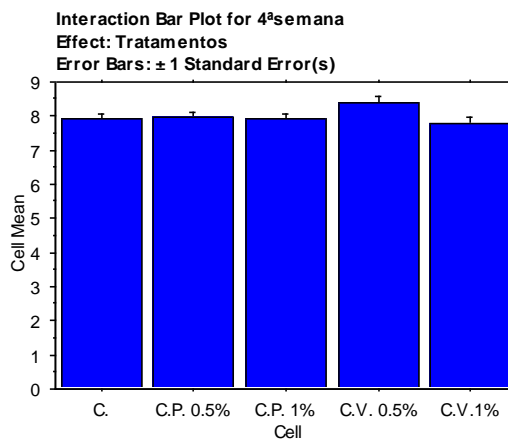
ANOVA Table for 4ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	1,321	,330	1,894	,1394	7,575	,494
Residual	28	4,882	,174				

Means Table for 4ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	7,935	,345	,141
C.P. 0.5%	7	7,964	,359	,136
C.P. 1%	7	7,919	,406	,153
C.V. 0.5%	6	8,382	,424	,173
C.V. 1%	7	7,769	,521	,197



c. Dia 30 a 40

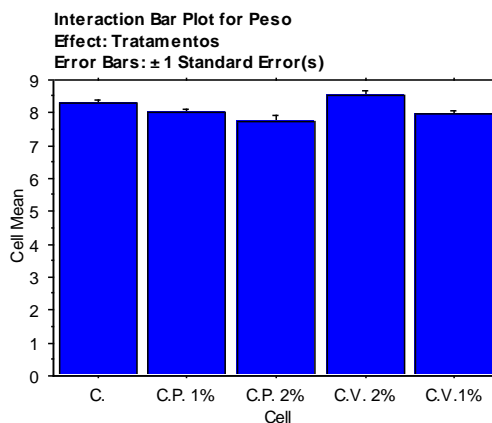
ANOVA Table for Peso

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	4,252	1,063	6,073	,0005	24,293	,984
Residual	50	8,752	,175				

Means Table for Peso

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	11	8,315	,299	,090
C.P. 1%	11	8,034	,324	,098
C.P. 2%	11	7,755	,573	,173
C.V. 2%	11	8,545	,415	,125
C.V. 1%	11	7,955	,425	,128



Fisher's PLSD for Peso**Effect: Tratamentos****Significance Level: 5 %**

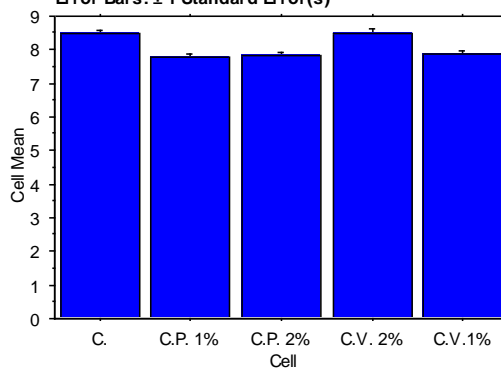
	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 1%	,281	,358	,1217	
C., C.P. 2%	,559	,358	,0029	S
C., C.V. 2%	-,231	,358	,2015	
C., C.V. 1%	,360	,358	,0490	S
C.P. 1%, C.P. 2%	,278	,358	,1252	
C.P. 1%, C.V. 2%	-,512	,358	,0060	S
C.P. 1%, C.V. 1%	,079	,358	,6594	
C.P. 2%, C.V. 2%	-,790	,358	<,0001	S
C.P. 2%, C.V. 1%	-,199	,358	,2698	
C.V. 2%, C.V. 1%	,591	,358	,0017	S

d. Dia 41 a 63**ANOVA Table for Peso casca**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	12,036	3,009	15,962	<,0001	63,848	1,000
Residual	110	20,736	,189				

Means Table for Peso casca**Effect: Tratamentos**

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	23	8,491	,312	,065
C.P. 1%	23	7,799	,368	,077
C.P. 2%	23	7,834	,485	,101
C.V. 2%	23	8,493	,527	,110
C.V. 1%	23	7,867	,444	,093

Interaction Bar Plot for Peso casca**Effect: Tratamentos****Error Bars: ± 1 Standard Error(s)****Fisher's PLSD for Peso casca****Effect: Tratamentos****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 1%	,692	,254	<,0001	S
C., C.P. 2%	,657	,254	<,0001	S
C., C.V. 2%	-,002	,254	,9865	
C., C.V. 1%	,624	,254	<,0001	S
C.P. 1%, C.P. 2%	-,035	,254	,7838	
C.P. 1%, C.V. 2%	-,694	,254	<,0001	S
C.P. 1%, C.V. 1%	-,068	,254	,5973	
C.P. 2%, C.V. 2%	-,659	,254	<,0001	S
C.P. 2%, C.V. 1%	-,033	,254	,7994	
C.V. 2%, C.V. 1%	,627	,254	<,0001	S

F. DADOS ESTATÍSTICOS DO PESO DA CLARA**a. Dia 0 a 29****ANOVA Table for Peso**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	436,625	109,156	15,080	<,0001	60,320	1,000
Residual	143	1035,096	7,238				

Means Table for Peso
Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	29	36,849	2,667	,495
C.P. 0.5%	30	36,543	2,720	,497
C.P. 1%	30	36,692	2,499	,456
C.V. 0.5%	29	41,124	2,950	,548
C.V.1%	30	37,289	2,604	,475

Fisher's PLSD for Peso
Effect: Tratamentos
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
C., C.P. 0.5%	,306	1,385	,6630
C., C.P. 1%	,157	1,385	,8227
C., C.V. 0.5%	-4,275	1,397	<,0001
C., C.V.1%	-,440	1,385	,5307
C.P. 0.5%, C.P. 1%	-,149	1,373	,8308
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-4,581	1,385	<,0001
C.P. 0.5%, C.V.1%	-,746	1,373	,2845
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-4,432	1,385	<,0001
C.P. 1%, C.V.1%	-,598	1,373	,3910
C.V. 0.5%, C.V.1%	3,834	1,385	<,0001

b. Dia 0 a 29 - Semanas

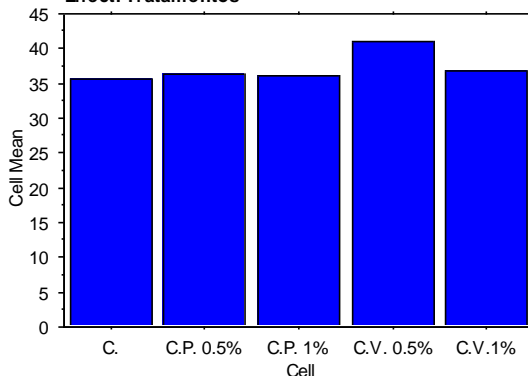
ANOVA Table for 1ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	112,272	28,068	5,681	,0018	22,723	,963
Residual	28	138,343	4,941				

Means Table for 1ªsemana
Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	35,710	1,815	,741
C.P. 0.5%	7	36,333	2,184	,826
C.P. 1%	7	36,041	2,615	,989
C.V. 0.5%	6	40,940	2,036	,831
C.V.1%	7	36,910	2,290	,866

Interaction Bar Plot for 1ªsemana
Effect: Tratamentos



Fisher's PLSD for 1ªsemana
Effect: Tratamentos
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
C., C.P. 0.5%	-,623	2,533	,6184
C., C.P. 1%	-,331	2,533	,7907
C., C.V. 0.5%	-5,230	2,629	,0003
C., C.V.1%	-1,200	2,533	,3402
C.P. 0.5%, C.P. 1%	,291	2,434	,8080
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-4,607	2,533	,0009
C.P. 0.5%, C.V.1%	-,577	2,434	,6309
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-4,899	2,533	,0005
C.P. 1%, C.V.1%	-,869	2,434	,4708
C.V. 0.5%, C.V.1%	4,030	2,533	,0029

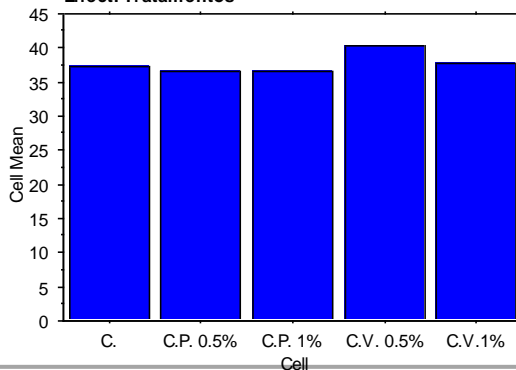
ANOVA Table for 2ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	64,614	16,154	2,552	,0611	10,206	,640
Residual	28	177,266	6,331				

Means Table for 2ªsemana
Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	37,217	2,585	1,055
C.P. 0.5%	7	36,467	1,943	,734
C.P. 1%	7	36,600	2,832	1,070
C.V. 0.5%	6	40,420	2,356	,962
C.V.1%	7	37,671	2,748	1,039

Interaction Bar Plot for 2ªsemana
Effect: Tratamentos



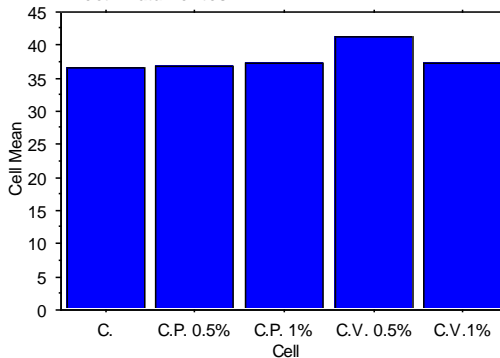
ANOVA Table for 3ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	96,081	24,020	2,296	,0840	9,184	,586
Residual	28	292,918	10,461				

**Means Table for 3ªsemana
Effect: Tratamentos**

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	36,505	2,551	1,042
C.P. 0.5%	7	36,761	3,551	1,342
C.P. 1%	7	37,371	2,794	1,056
C.V. 0.5%	6	41,353	4,261	1,740
C.V.1%	7	37,349	2,802	1,059

**Interaction Bar Plot for 3ªsemana
Effect: Tratamentos**



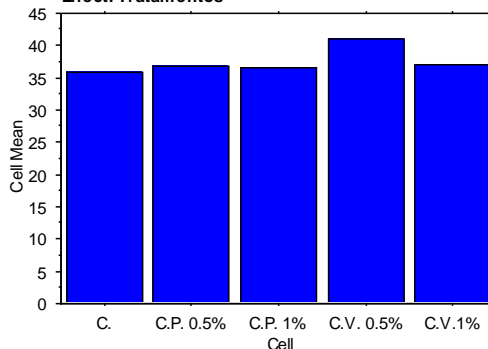
ANOVA Table for 4ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	102,609	25,652	2,531	,0627	10,126	,636
Residual	28	283,743	10,134				

**Means Table for 4ªsemana
Effect: Tratamentos**

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	35,928	2,869	1,171
C.P. 0.5%	7	36,770	3,638	1,375
C.P. 1%	7	36,499	2,250	,850
C.V. 0.5%	6	41,057	3,620	1,478
C.V.1%	7	37,037	3,349	1,266

**Interaction Bar Plot for 4ªsemana
Effect: Tratamentos**



c. Dia 30 a 40

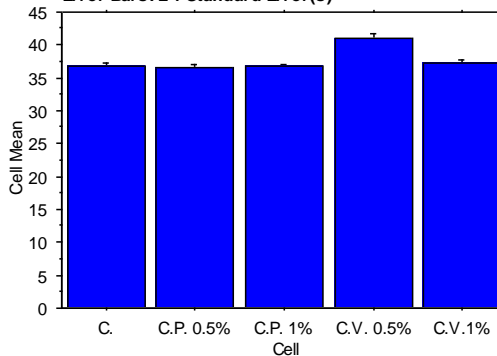
ANOVA Table for Peso

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	136,038	34,010	2,221	,0800	8,882	,605
Residual	50	765,809	15,316				

**Means Table for Peso
Effect: Tratamentos**

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	11	37,496	3,166	,955
C.P. 1%	11	37,137	3,354	1,011
C.P. 2%	11	36,189	4,012	1,210
C.V. 2%	11	40,841	3,778	1,139
C.V.1%	11	37,673	4,994	1,506

**Interaction Bar Plot for Peso
Effect: Tratamentos
Error Bars: ± 1 Standard Error(s)**



d. Dia 41 a 63

ANOVA Table for Peso clara

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	426,861	106,715	10,905	<,0001	43,621	1,000
Residual	110	1076,428	9,786				

Means Table for Peso clara

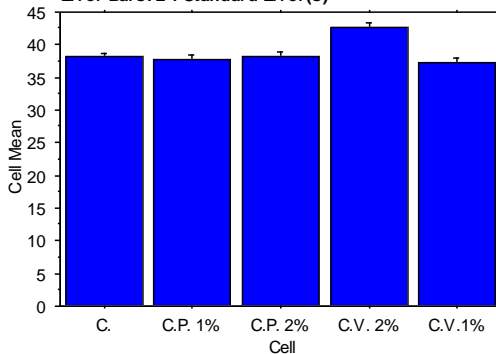
Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	23	38,212	2,562	,534
C.P. 1%	23	37,819	3,183	,664
C.P. 2%	23	38,273	3,343	,697
C.V. 2%	23	42,660	3,475	,725
C.V. 1%	23	37,354	2,996	,625

Interaction Bar Plot for Peso clara

Effect: Tratamentos

Error Bars: ± 1 Standard Error(s)



Fisher's PLSD for Peso clara

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 1%	,393	1,828	,6712	
C., C.P. 2%	-,062	1,828	,9468	
C., C.V. 2%	-4,449	1,828	<,0001	S
C., C.V. 1%	,858	1,828	,3544	
C.P. 1%, C.P. 2%	-,454	1,828	,6233	
C.P. 1%, C.V. 2%	-4,841	1,828	<,0001	S
C.P. 1%, C.V. 1%	,465	1,828	,6150	
C.P. 2%, C.V. 2%	-4,387	1,828	<,0001	S
C.P. 2%, C.V. 1%	,920	1,828	,3210	
C.V. 2%, C.V. 1%	5,307	1,828	<,0001	S

G. DADOS ESTATÍSTICOS DO PESO DA GEMA

a. Dia 0 a 29

ANOVA Table for Untitled Compact Variable #1

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	34,163	8,541	5,242	,0006	20,967	,974
Residual	143	232,995	1,629				

Means Table for Untitled Compact Variable #1

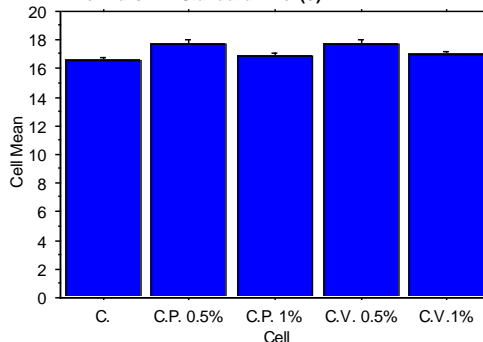
Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	29	16,564	1,024	,190
C.P. 0.5%	30	17,758	1,532	,280
C.P. 1%	30	16,843	1,374	,251
C.V. 0.5%	29	17,727	1,368	,254
C.V. 1%	30	16,994	,990	,181

Interaction Bar Plot for Untitled Compact Variable #1

Effect: Tratamentos

Error Bars: ± 1 Standard Error(s)



Fisher's PLSD for Untitled Compact Variable #1

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 0.5%	-1,195	,657	,0004	S
C., C.P. 1%	-,279	,657	,4029	
C., C.V. 0.5%	-1,163	,663	,0007	S
C., C.V. 1%	-,430	,657	,1980	
C.P. 0.5%, C.P. 1%	,916	,651	,0062	S
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	,032	,657	,9240	
C.P. 0.5%, C.V. 1%	,765	,651	,0217	S
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-,884	,657	,0087	S
C.P. 1%, C.V. 1%	-,151	,651	,6475	
C.V. 0.5%, C.V. 1%	,733	,657	,0291	S

b. Dia 0 a 29 - Semanas

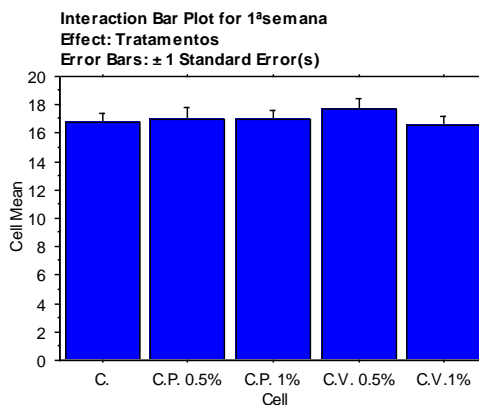
ANOVA Table for 1ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	4,512	1,128	,355	,8384	1,419	,117
Residual	28	89,003	3,179				

Means Table for 1ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	16,793	1,565	,639
C.P. 0.5%	7	16,940	2,328	,880
C.P. 1%	7	17,020	1,412	,534
C.V. 0.5%	6	17,723	1,851	,756
C.V.1%	7	16,606	1,588	,600



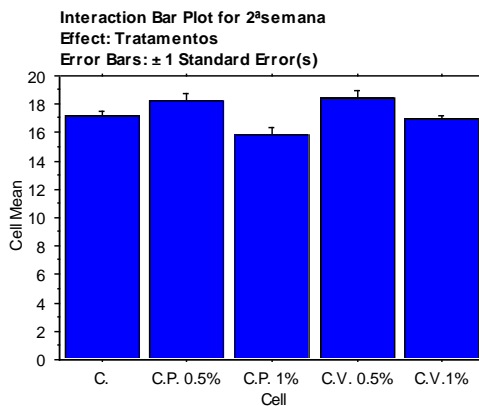
ANOVA Table for 2ªsemana

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	30,159	7,540	5,206	,0029	20,826	,944
Residual	28	40,548	1,448				

Means Table for 2ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	17,153	,925	,378
C.P. 0.5%	7	18,217	1,388	,525
C.P. 1%	7	15,784	1,422	,538
C.V. 0.5%	6	18,400	1,439	,587
C.V.1%	7	16,957	,608	,230



Fisher's PLSD for 2ªsemana

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 0.5%	-1,064	1,371	,1233	
C., C.P. 1%	1,369	1,371	,0504	
C., C.V. 0.5%	-1,247	1,423	,0836	
C., C.V.1%	,196	1,371	,7717	
C.P. 0.5%, C.P. 1%	2,433	1,318	,0008	S
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	-,183	1,371	,7868	
C.P. 0.5%, C.V.1%	1,260	1,318	,0602	
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-2,616	1,371	,0005	S
C.P. 1%, C.V.1%	-1,173	1,318	,0789	
C.V. 0.5%, C.V.1%	1,443	1,371	,0399	S

ANOVA Table for 3ªsemana

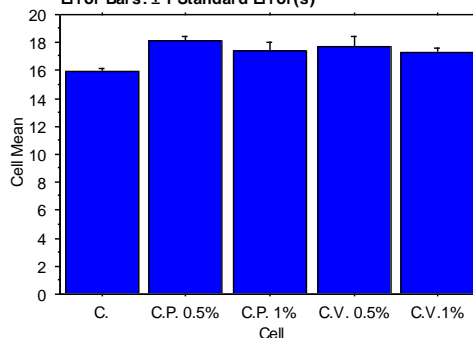
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	16,994	4,249	2,967	,0367	11,867	,718
Residual	28	40,097	1,432				

Means Table for 3ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	15,970	,435	,178
C.P. 0.5%	7	18,154	,858	,324
C.P. 1%	7	17,424	1,690	,639
C.V. 0.5%	6	17,752	1,653	,675
C.V.1%	7	17,280	,810	,306

Interaction Bar Plot for 3ªsemana
Effect: Tratamentos
Error Bars: ± 1 Standard Error(s)



Fisher's PLSD for 3ªsemana

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 0.5%	-2,184	1,364	,0028	S
C., C.P. 1%	-1,454	1,364	,0375	S
C., C.V. 0.5%	-1,782	1,415	,0155	S
C., C.V.1%	-1,310	1,364	,0591	
C.P. 0.5%, C.P. 1%	,730	1,310	,2634	
C.P. 0.5%, C.V. 0.5%	,403	1,364	,5502	
C.P. 0.5%, C.V.1%	,874	1,310	,1826	
C.P. 1%, C.V. 0.5%	-,327	1,364	,6267	
C.P. 1%, C.V.1%	,144	1,310	,8232	
C.V. 0.5%, C.V.1%	,472	1,364	,4845	

ANOVA Table for 4ªsemana

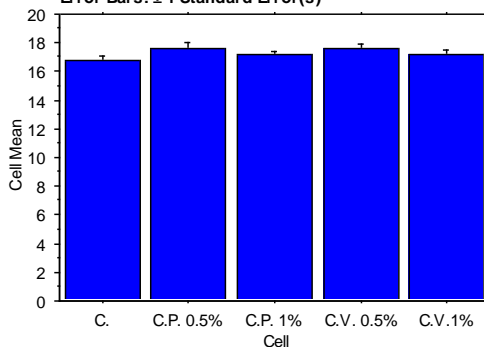
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	2,778	,695	1,120	,3671	4,478	,299
Residual	28	17,369	,620				

Means Table for 4ªsemana

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	6	16,785	,698	,285
C.P. 0.5%	7	17,604	1,043	,394
C.P. 1%	7	17,184	,603	,228
C.V. 0.5%	6	17,567	,742	,303
C.V.1%	7	17,234	,761	,288

Interaction Bar Plot for 4ªsemana
Effect: Tratamentos
Error Bars: ± 1 Standard Error(s)



c. Dia 30 a 40

ANOVA Table for Peso

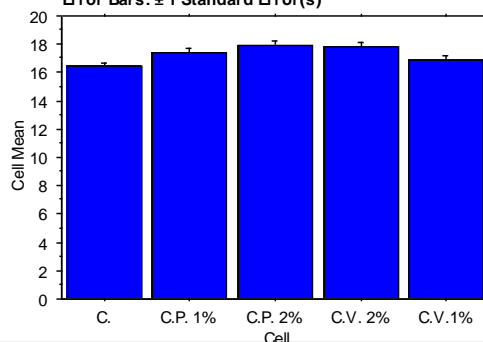
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	15,899	3,975	4,575	,0032	18,301	,931
Residual	50	43,439	,869				

Means Table for Peso

Effect: Tratamentos

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	11	16,506	,702	,212
C.P. 1%	11	17,416	,989	,298
C.P. 2%	11	17,896	,956	,288
C.V. 2%	11	17,843	1,064	,321
C.V.1%	11	16,909	,909	,274

Interaction Bar Plot for Peso
Effect: Tratamentos
Error Bars: ± 1 Standard Error(s)



Fisher's PLSD for Peso**Effect: Tratamentos****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 1%	-,910	,798	,0263	S
C., C.P. 2%	-1,390	,798	,0010	S
C., C.V. 2%	-1,336	,798	,0015	S
C., C.V. 1%	-,403	,798	,3158	
C.P. 1%, C.P. 2%	-,480	,798	,2328	
C.P. 1%, C.V. 2%	-,426	,798	,2885	
C.P. 1%, C.V. 1%	,507	,798	,2077	
C.P. 2%, C.V. 2%	,054	,798	,8932	
C.P. 2%, C.V. 1%	,987	,798	,0164	S
C.V. 2%, C.V. 1%	,934	,798	,0228	S

d. Dia 41 a 63

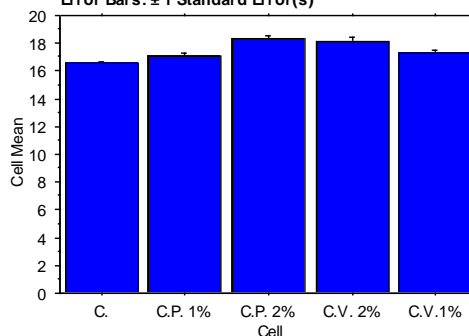
ANOVA Table for Untitled Compact Variable #1

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	52,622	13,155	13,795	<,0001	55,178	1,000
Residual	110	104,904	,954				

Means Table for Untitled Compact Variable #1**Effect: Tratamentos**

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	23	16,550	,792	,165
C.P. 1%	23	17,088	,885	,185
C.P. 2%	23	18,357	,900	,188
C.V. 2%	23	18,169	1,254	,262
C.V. 1%	23	17,320	,987	,206

Interaction Bar Plot for Untitled Compact Variable #1
Effect: Tratamentos
Error Bars: ± 1 Standard Error(s)

**Fisher's PLSD for Untitled Compact Variable #1****Effect: Tratamentos****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., C.P. 1%	-,539	,571	,0641	
C., C.P. 2%	-1,808	,571	<,0001	S
C., C.V. 2%	-1,620	,571	<,0001	S
C., C.V. 1%	-,771	,571	,0086	S
C.P. 1%, C.P. 2%	-1,269	,571	<,0001	S
C.P. 1%, C.V. 2%	-1,081	,571	,0003	S
C.P. 1%, C.V. 1%	-,232	,571	,4218	
C.P. 2%, C.V. 2%	,188	,571	,5146	
C.P. 2%, C.V. 1%	1,037	,571	,0005	S
C.V. 2%, C.V. 1%	,849	,571	,0039	S

H. DADOS ESTATÍSTICOS DO TEOR DE COLESTEROL TOTAL NA GEMA DE OVO

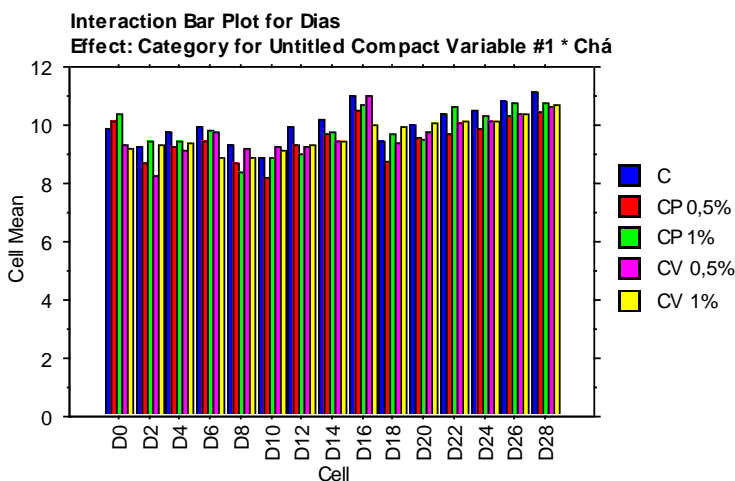
a. Dia 0 a 28

ANOVA Table for Dias

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Chá	4	9,405	2,351	,679	,6173	2,714	,171
Subject(Group)	15	51,973	3,465				
Category for Untitled Compact Variable #1	14	104,358	7,454	17,538	<,0001	245,526	1,000
Category for Untitled Compact Variable #...	56	22,623	,404	,950	,5777	53,226	,953
Category for Untitled Compact Variable #...	210	89,258	,425				

Means Table for Dias
Effect: Chá

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C	60	10,019	1,011	,131
CP 0,5%	60	9,498	1,001	,129
CP 1%	60	9,824	,966	,125
CV 0,5%	60	9,654	1,038	,134
CV 1%	60	9,660	,715	,092



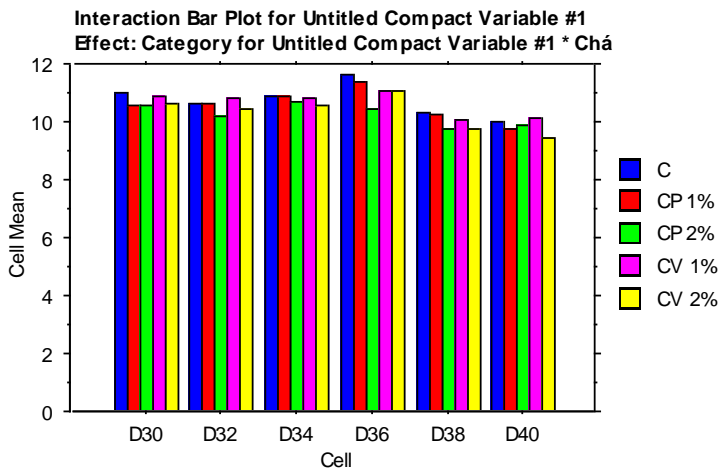
b. Dia 30 a 40

ANOVA Table for Untitled Compact Variable #1

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Chá	4	4,254	1,063	1,832	,1752	7,328	,422
Subject(Group)	15	8,707	,580				
Category for Untitled Compact Variable #1	5	23,185	4,637	12,313	<,0001	61,566	1,000
Category for Untitled Compact Variable #...	20	3,011	,151	,400	,9882	7,994	,256
Category for Untitled Compact Variable #...	75	28,244	,377				

Means Table for Untitled Compact Variable #1
Effect: Chá

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C	24	10,737	,712	,145
CP 1%	24	10,580	,755	,154
CP 2%	24	10,250	,709	,145
CV 1%	24	10,626	,743	,152
CV 2%	24	10,310	,784	,160



c. Dia 42 a 63

ANOVA Table for Dias

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Chá	4	47,158	11,790	5,395	,0068	21,578	,911
Subject(Group)	15	32,782	2,185				
Category for Untitled Compact Variable #1	11	40,689	3,699	9,695	<,0001	106,642	1,000
Category for Untitled Compact Variable #...	44	16,456	,374	,980	,5145	43,130	,915
Category for Untitled Compact Variable #...	165	62,956	,382				

Means Table for Dias

Effect: Chá

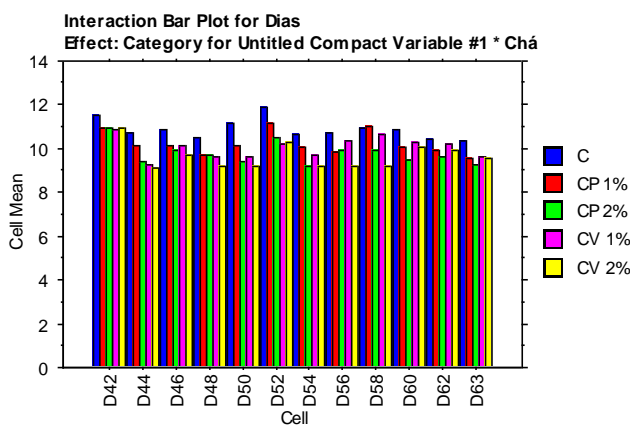
	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C	48	10,888	,835	,120
CP 1%	48	10,231	,757	,109
CP 2%	48	9,766	,796	,115
CV 1%	48	10,052	,853	,123
CV 2%	48	9,620	,788	,114

Fisher's PLSD for Dias

Effect: Chá

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C, CP 1%	,657	,643	,0458	S
C, CP 2%	1,122	,643	,0021	S
C, CV 1%	,836	,643	,0143	S
C, CV 2%	1,269	,643	,0008	S
CP 1%, CP 2%	,465	,643	,1440	
CP 1%, CV 1%	,179	,643	,5615	
CP 1%, CV 2%	,611	,643	,0609	
CP 2%, CV 1%	-,286	,643	,3582	
CP 2%, CV 2%	,146	,643	,6349	
CV 1%, CV 2%	,432	,643	,1725	



I. DADOS ESTATÍSTICOS DO TEOR DE COLESTEROL TOTAL NO OVO

a. Dia 0 a 28

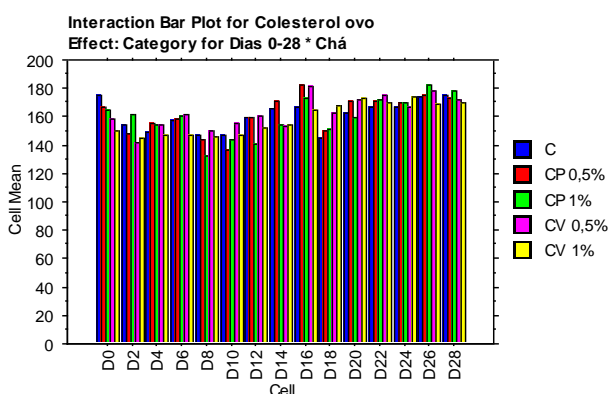
ANOVA Table for Colesterol ovo

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Chá	4	745,599	186,400	,070	,9901	,280	,061
Subject(Group)	15	39904,092	2660,273				
Category for Dias 0-28	14	30960,731	2211,481	9,746	<,0001	136,448	1,000
Category for Dias 0-28 * Chá	56	9956,611	177,797	,784	,8590	43,880	,885
Category for Dias 0-28 * Subject(Group)	210	47649,978	226,905				

Means Table for Colesterol ovo

Effect: Chá

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C	60	160,760	24,675	3,186
CP 0,5%	60	161,854	20,465	2,642
CP 1%	60	159,863	21,600	2,789
CV 0,5%	60	162,840	21,857	2,822
CV 1%	60	158,289	14,336	1,851



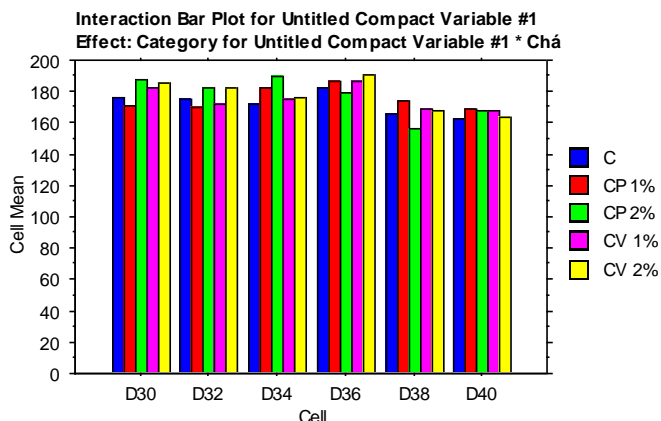
b. Dia 30 a 40

ANOVA Table for Untitled Compact Variable #1

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Chá	4	460,518	115,130	,154	,9581	,617	,074
Subject(Group)	15	11196,214	746,414				
Category for Untitled Compact Variable #1	5	6074,540	1214,908	8,104	<,0001	40,519	1,000
Category for Untitled Compact Variable #...	20	2651,199	132,560	,884	,6066	17,684	,594
Category for Untitled Compact Variable #...	75	11243,889	149,919				

Means Table for Untitled Compact Variable #1
Effect: Chá

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C	24	172,023	16,199	3,307
CP 1%	24	175,540	17,575	3,588
CP 2%	24	177,104	21,125	4,312
CV 1%	24	175,455	13,954	2,848
CV 2%	24	177,630	11,949	2,439



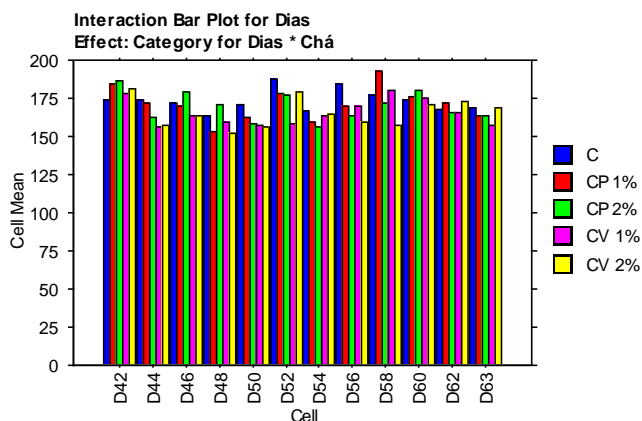
c. Dia 42 a 63

ANOVA Table for Dias

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Chá	4	2521,034	630,259	,376	,8222	1,504	,112
Subject(Group)	15	25146,317	1676,421				
Category for Dias	11	10379,488	943,590	4,037	<,0001	44,411	,999
Category for Dias * Chá	44	8219,188	186,800	,799	,8063	35,168	,821
Category for Dias * Subject(Group)	165	38562,942	233,715				

Means Table for Dias
Effect: Chá

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C	48	173,428	19,326	2,789
CP 1%	48	171,183	20,069	2,897
CP 2%	48	169,766	20,493	2,958
CV 1%	48	165,394	18,548	2,677
CV 2%	48	165,184	14,526	2,097



J. DADOS ESTATÍSTICOS DO TEOR DE COLESTEROL TOTAL NO PLASMA

ANOVA Table for Colesterol (mg/mL)
Row exclusion: 6-Colesterol plasma.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Tratamentos	4	3,026	,756	4,792	,0135	19,168	,851
Residual	13	2,052	,158				

Means Table for Colesterol (mg/mL)

Effect: Tratamentos

Row exclusion: 6-Colesterol plasma.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
C.	4	3,343	,421	,211
CP 1%	4	3,535	,321	,160
CP 2%	3	3,237	,171	,099
CV 1%	3	3,220	,397	,229
CV 2%	4	2,400	,528	,264

Fisher's PLSD for Colesterol (mg/mL)

Effect: Tratamentos

Significance Level: 5 %

Row exclusion: 6-Colesterol plasma.svd

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
C., CP 1%	-,192	,607	,5052	
C., CP 2%	,106	,656	,7328	
C., CV 1%	,123	,656	,6930	
C., CV 2%	,942	,607	,0052	S
CP 1%, CP 2%	,298	,656	,3435	
CP 1%, CV 1%	,315	,656	,3182	
CP 1%, CV 2%	1,135	,607	,0014	S
CP 2%, CV 1%	,017	,701	,9598	
CP 2%, CV 2%	,837	,656	,0163	S
CV 1%, CV 2%	,820	,656	,0181	S

Interaction Bar Plot for Colesterol (mg/mL)

Effect: Tratamentos

Row exclusion: 6-Colesterol plasma.svd

