

Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência

Determination of cholesterol in meat:
comparison of colorimetric and hplc methods

Neura BRAGAGNOLO¹
Délia B. RODRIGUEZ-AMAYA^{1*}

RIALA6/891

Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D. B. Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1): 53-57, 2001.

RESUMO. Foram comparados os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e colorimétrico para determinação de colesterol em carnes. As etapas anteriores à quantificação são semelhantes nos dois métodos, consistindo da extração dos lipídios, saponificação e extração da matéria insaponificável. O método por CLAE utiliza uma coluna de C₁₈, fase móvel de acetonitrila:isopropanol (70:30) e detecção fixada em 210 nm. O método colorimétrico envolve a reação com ácido sulfúrico concentrado e ácido acético saturado com sulfato ferroso, e leitura a 490 nm 10 min após resfriamento. Foi analisado um total de 28 amostras de carnes bovina e suína. Não houve diferença significativa nos resultados obtidos pelos dois métodos para todas as amostras analisadas. Portanto, qualquer um dos métodos avaliados pode ser utilizado com segurança. O método colorimétrico é mais barato e rápido, mas precisa de controle rigoroso das condições da reação e utiliza reagentes corrosivos. O método por CLAE não exige atenção constante, mas é mais oneroso e requer experiência no uso do aparelho.

PALAVRAS-CHAVE. Carne; colesterol; colorimetria; CLAE.

INTRODUÇÃO

É bem reconhecido, atualmente, que cada país deve ter o seu próprio banco de dados sobre composição de alimentos, especialmente em relação aos componentes que afetam a saúde humana, positiva ou negativamente. A análise de alimentos, no entanto, é dispendiosa e complicada, e os métodos variam largamente em custo, exatidão, precisão e complexidade. São

imprescindíveis a validação e revalidação de métodos e são também requeridos, especialmente em países em desenvolvimento, vários métodos para cada analito, todos capazes de fornecer dados confiáveis, e passíveis de serem utilizados por laboratórios com recursos humanos e materiais diferentes.

O colesterol desempenha funções importantes no organismo humano. No entanto, uma taxa elevada de colesterol no sangue é um dos fatores de risco para doenças cardio-

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

* Endereço para correspondência: Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil, Fax: 55 19 32892832, e-mail: delia@fea.unicamp.br

vasculares, a principal causa de morte no Brasil e em muitos outros países. De acordo com a American Heart Association¹, para manter níveis adequados de colesterol sanguíneo, a dieta deve ter baixos teores de colesterol, lipídios e gordura saturada.

Valores encontrados na literatura para colesterol em carne variam largamente. Esta discrepância pode ser atribuída à variação natural das amostras devido aos fatores como tipo de corte, idade, raça e dieta do animal. Entretanto, um exame da literatura sobre colesterol em alimentos revela que diferenças podem ser geradas, em grande extensão, pelos diferentes métodos analíticos utilizados.

A determinação de colesterol tem sido realizada pelas seguintes técnicas analíticas: colorimétrica, enzimática e cromatográfica. O procedimento colorimétrico é o mais barato e tem sido o mais utilizado na determinação de colesterol em carnes^{3-5,9-12,15,16}. O método enzimático também é menos oneroso, no entanto, é pouco utilizado em amostras de carnes⁸. Os métodos cromatográficos, embora mais caros, são os mais específicos, pois além de separar os esteróis, separam outros possíveis interferentes. Para carne, muitos trabalhos empregaram cromatografia gasosa^{7,13,14}, com apenas um utilizando CLAE².

Assim, o presente trabalho teve por objetivo comparar um método por cromatografia líquida de alta eficiência e o

método colorimétrico de Bohac et al.³, para determinação de colesterol em carnes.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Foram analisadas pelos dois métodos 28 amostras: 6 de lombo; 6 de pernil; 3 de leitão (pernil+lombo), 3 de couro, 4 de toucinho e 6 de carne bovina (contrafilé). As amostras de lombo, pernil e contrafilé foram adquiridas, ao acaso, em diferentes açougues de Campinas, São Paulo. Já as amostras de leitão, couro e toucinho foram provenientes da Fazenda Barra Dourada, Rio Brillhante, Mato Grosso do Sul, resultantes do cruzamento de suínos Agpic 405 (Hampshire com Landrace x Large White) e Camborough 15 (Duroc Pic com Landrace Pic x Large White Pic).

Todas as amostras foram homogeneizadas em um multiprocessador até obtenção de uma massa homogênea. Subamostras de 10g, em duplicatas, foram tomadas para análise.

2. Etapas iniciais

A Figura 1 apresenta o fluxograma analítico. Para ambos os métodos, os lipídios totais foram extraídos com clorofórmio:

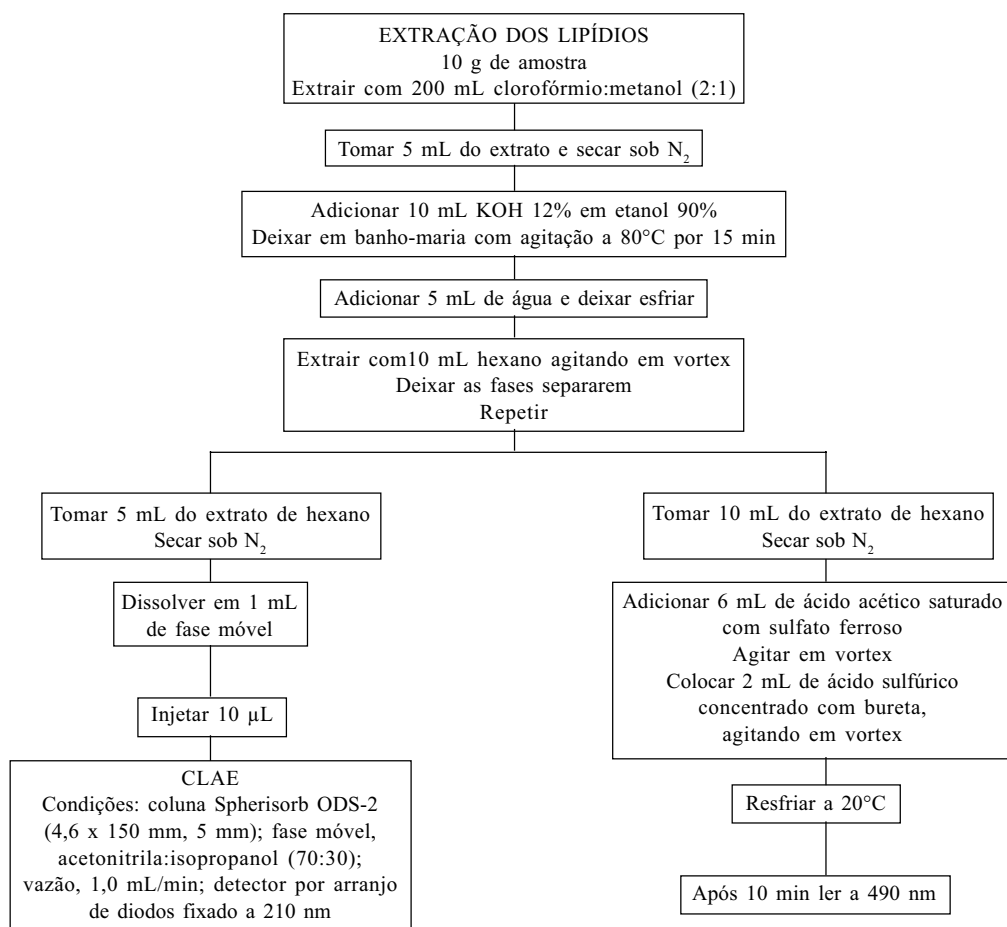


Figura 1. Fluxograma para determinação de colesterol por CLAE e por colorimetria

metanol (2:1) de acordo com Folch et al.⁶. A saponificação da gordura e a extração dos insaponificáveis foram realizadas de acordo com Bohac et al.³, otimizado por Bragagnolo e Rodriguez-Amaya⁴.

3. Determinação de colesterol por colorimetria

Uma alíquota de 10 mL do extrato de hexano, contendo os insaponificáveis, foi seca sob N₂. Adicionou-se, em seguida, ácido acético saturado com sulfato ferroso (2,5 g de sulfato ferroso/L) e ácido sulfúrico concentrado. Após resfriamento em água gelada a 20°C e 10 minutos de repouso, a leitura foi feita a 490 nm. A curva de calibração foi construída com soluções de 50 a 200 µg de colesterol padrão submetidas à saponificação e ao desenvolvimento de cor.

4. Determinação do colesterol por CLAE

Uma alíquota de 5 mL da matéria insaponificável foi seca sob N₂, dissolvida em 1 mL de fase móvel, filtrada em membrana com poros de 0,45 µm e 10 µL foi injetada no cromatógrafo líquido.

Foi utilizado um cromatógrafo líquido equipado com sistema ternário de solventes (VARIAN, 9010), válvula rotatória com alça de 10 µL, detector por conjunto de diodos (WATERS, 994) e um registrador (Hewlett-Packard, 2225 D). A coluna analítica usada foi Spherisorb ODS-2 (4,6 x 150 mm, 5 µm) precedida de coluna de guarda, Spherisorb ODS-2 (10 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel consistiu de acetonitrila:isopropanol (70:30) numa vazão de 1,0 mL/min. Todos os solventes usados foram grau cromatográfico, filtrados e desgaseificados em ultra-som antes do uso. O colesterol foi detectado a 210 nm e os espectros de absorvâncias obtidos entre 190 e 300 nm.

A identificação do colesterol foi baseada no tempo de retenção, co-cromatografia com padrão de colesterol e espectros de absorvância obtidos pelo detector conjunto de diodos no início, ápice e término do pico, os quais demonstraram a pureza do pico (Figura 2).

A quantificação foi feita por padronização externa, a curva de calibração sendo construída de 1,0 a 4,0 µg/10µL. A curva foi linear, passou pela origem e cobriu a faixa de concentração das amostras.

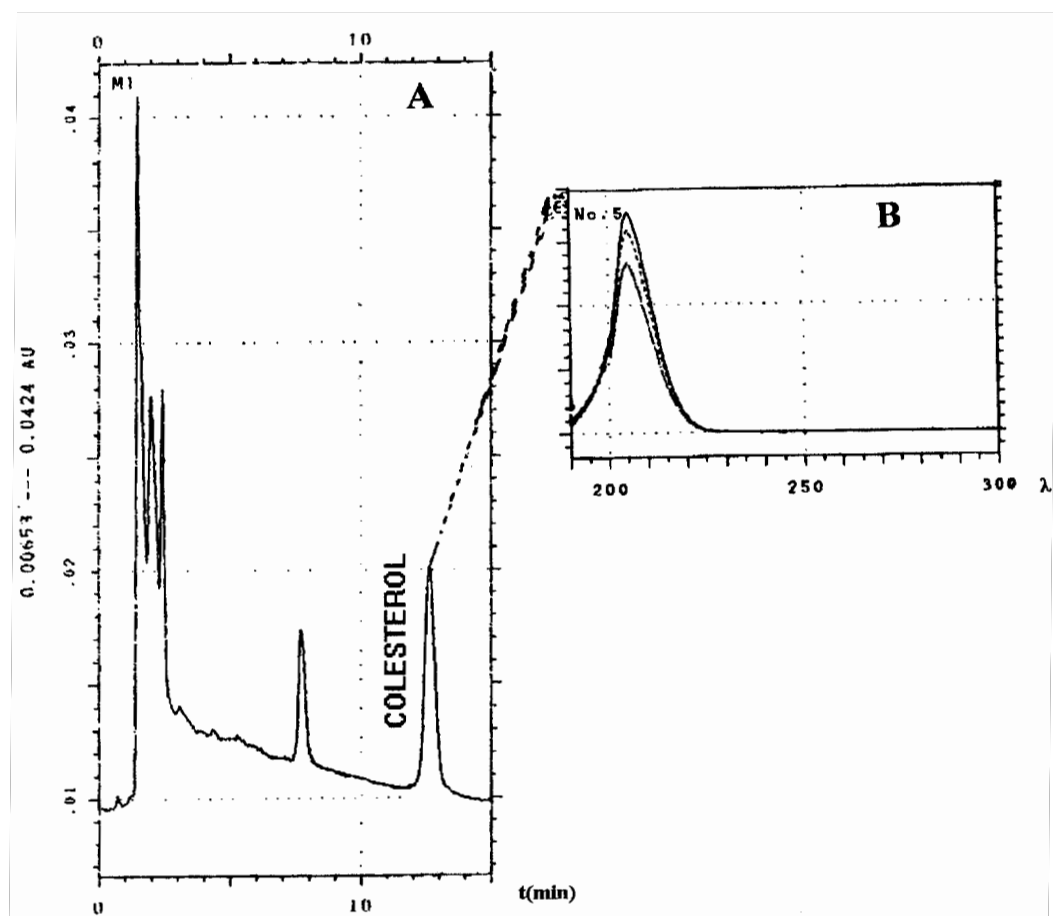


Figura 2. Cromatograma e Espectro de Absorvância Característico de Carne Suína
Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-2, 150 x 4,6 mm, 5µm; fase móvel, acetonitrila:isopropanol (70:30); vazão: 1,0 mL/min; detector de conjunto de diodos.

5. Teste de recuperação

Para verificar a exatidão dos métodos foi realizado um teste de recuperação adicionando-se dois níveis (25 e 50 mg) de colesterol à amostra.

6. Análise estatística

Com o objetivo de verificar as diferenças entre os dois métodos foi realizada análise de variância de um fator (“one way”) com o programa Statgraphics versão 4.0, 1989. A comparação entre as médias foi feita mediante Teste de Tukey, a um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e as estimativas de desvios-padrões obtidos pelos métodos colorimétrico e por CLAE podem ser observados na Tabela 1.

A análise estatística mostrou que os resultados dos dois métodos foram equivalentes para as 28 amostras analisadas. Os desvios, que são praticamente iguais para os dois métodos, refletem as variações naturais das amostras e não variações analíticas. Os coeficientes de variação entre as duplicatas variaram de 0,1 a 7,9% (média de 2,4) para o método colorimétrico e de 0,0 a 3,5% (média de 1,3) para o método de CLAE. O método por CLAE mostrou melhor repetibilidade, mas a repetibilidade do método colorimétrico, que dependeu do controle rigoroso das condições de reação, foi satisfatória.

Bohac et al.³ obtiveram teores semelhantes de colesterol em carne com o método colorimétrico empregado no presente trabalho e um método utilizando cromatografia gasosa. Encontraram também alguns coeficientes de variação maiores e iguais a 8% pelo método colorimétrico.

Os resultados do teste de recuperação podem ser vistos na Tabela 2, mostrando boa recuperação para os dois métodos. Embora um dos coeficientes de variação do método colorimétrico tenha sido maior (8%), a repetibilidade dos dois métodos foi boa.

CONCLUSÃO

Tanto o método colorimétrico, como o método por CLAE, pode ser utilizado com segurança para amostras de carne.

Tabela 1. Resultados de colesterol (mg/ 100g) em amostras de carne obtidos pela comparação de colorimetria e CLAE

Corte	n	Método CLAE	Método Colorimétrico
		média ± dp	média ± dp
Lombo	6	36 ± 2 a	39 ± 5 a
Pernil	6	48 ± 5 a	43 ± 8 a
Couro	3	87 ± 12 a	86 ± 10 a
Toucinho	4	59 ± 14 a	58 ± 12 a
Leitão (lombo e pernil)	3	68 ± 15 a	71 ± 18 a
Carne bovina (contrafilé)	6	33 ± 6 a	32 ± 6 a

n = número de amostras analisadas

dp = estimativa de desvio-padrão entre as amostras

Os valores observados não apresentam diferença significativa a nível de 5%.

Tabela 2. Recuperação (%) dos métodos

Colesterol adicionado mg/100g de amostra	Colorimétrico		CLAE	
	média ± dp	%CV	média ± dp	%CV
25	100 ± 8	8,0	99 ± 3	3,0
50	94 ± 1	1,4	99 ± 2	2,0

dp = estimativa de desvio-padrão de duplicatas

Entretanto, o método colorimétrico, apesar de ser mais barato e rápido, precisa de controle rigoroso das condições de reação e utiliza reagentes corrosivos. Já o método por CLAE não exige atenção constante, mas é mais oneroso e requer experiência no uso do aparelho.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

RIALA6/891

Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D. B. Determination of cholesterol in meat: comparison of colorimetric and hplc methods. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):53-57,2001.

ABSTRACT. A colorimetric method and an HPLC method were compared for the determination of cholesterol in meat. The steps preceding measurement were similar, consisting of extraction of the lipids, saponification and extraction of unsaponifiable matter. The HPLC method utilized a C₁₈ column with acetonitrile:isopropanol (70:30) as mobile phase; detection was set at 210 nm. The colorimetric method involved reaction with concentrated sulfuric acid and acetic acid saturated with ferrous sulfate, the absorbance being measured at 490 nm 10 minutes after cooling. No significant difference was seen in the

results of the two methods for the 28 samples of different cuts of pork and beef analyzed; thus, either method can be reliably used. The colorimetric method is rapid and low-cost, but requires rigorous control of reaction conditions and uses corrosive reagents. The HPLC method does not need constant attention, but is expensive and requires experience in the operation of the instrument.

KEY WORDS. Meat; cholesterol; HPLC; colorimetric.

REFERÊNCIAS

1. American Heart Association. **Dietary Guidelines for Healthy American Adults** (http://www.americanheart.org/Heart_and_Stroke_A_Z_Guide/dietg.html), 29/01/2001.
2. Arneth, W.; Al-Ahmad, H. Cholesterol und seine ester in fleisch – Analytik und Gehalte. **Mitteilungsblatt**, 112: 201-208, 1991.
3. Bohac, C.E. et al. Assessment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. **J. Food. Sci.**, 53(6): 1642-1644, 1988.
4. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B. Teores de colesterol em carne de frango. **Rev. Farm. Bioquím. USP**, 28(2): 122-131, 1992.
5. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B. Teores de colesterol em carne suína e bovina e efeito do cozimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 15: 11-17, 1995.
6. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol Chem.**, 226: 497-509, 1957.
7. Heymann, H. et al. Sensory and chemical characteristics of fresh pork roasts cooked to different endpoint temperatures. **J. Food. Sci.**, 55(3): 613-617, 1990.
8. Hutchison, G.I.; Greenfield, H.; Wills, R.B.H. Composition of Australian foods. 35. pork. **Food Tech. Australia**, 39(5): 216-222, 1987.
9. Kritchevsky, D.; Tepper, S A. The free and ester sterol content of various foodstuffs. **J. Nutr.**, 74: 441-444, 1961.
10. Morgan, J.B.; Calkins, C.R.; Mandigo, R.W. Effect of trim level, cooking method, and chop type on lipid retention, caloric content, and cholesterol level in cooked pork. **J. Food Sci.**, 53(6): 1602-1604, 1988.
11. Prusa, K.J.; Hughes, K.V. Cholesterol and selected attributes of pork tenderloin steaks heated by conventional, convection and microwave ovens to two internal endpoint temperatures. **J. Food Sci.**, 51(5): 1139-1140, 1986.
12. Reitmeier, C.A.; Prusa, K.J. Cholesterol content and sensory analysis of ground pork as influenced by fat level and heating. **J. Food Sci.**, 52(4): 916-918, 1987.
13. Sahasrabudhe, M.R.; Stewart, L. Total lipid and cholesterol in selected retail cuts of Canadian beef. **Can. Inst. Food Sci. Technol.**, 22: 83-85, 1989.
14. Slover, H.T. et al. The lipid composition of raw and cooked fresh pork. **J. Food Comp. Anal.**, 1: 38-52, 1987.
15. Swize, S.S. et al. Cholesterol content of lean and fat from beef, pork, and lamb cuts. **J. Food Comp. Anal.**, 5: 160-167, 1992.
16. Tu, C.; Powrie, W. D.; Fenema, O. Free and esterified cholesterol content of animal muscles and meat products. **J. Food Sci.**, 32: 30-34, 1967.

Recebido em 07/02/2001; Aprovado em 13/06/2001