

# AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DOIS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL EM CARNES E LEITE<sup>1</sup>

Tatiana SALDANHA<sup>2</sup>, Mônica Roberta MAZALLI<sup>2</sup>, Neura BRAGAGNOLO<sup>2,\*</sup>

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo comparar duas metodologias, enzimática e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na determinação dos teores de colesterol em amostras de carne bovina e leite. No método por CLAE utilizou-se coluna C<sub>18</sub>, 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), fase móvel acetoneitrila:isopropanol (85:15 para as amostras de carne e 95:05 para amostras de leite) e detector UV-Visível fixado a 210nm. No método enzimático, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 499nm, 90 minutos após a reação. Foram realizadas 10 análises de cada produto para as duas metodologias avaliadas, sendo que os resultados obtidos mostraram-se semelhantes (p>0,01). Obteve-se recuperação de 95% para as amostras de carne e 97% para as amostras de leite em ambos os métodos. Os resultados obtidos com o material de referência certificado de carne (SRM 1546, NIST) apresentaram-se semelhantes ao declarado no certificado. O coeficiente de variação nas amostras de leite foi de 0,81 e 0,82%, e nas amostras de carne 2,3 e 2,9% para as metodologias cromatográfica e enzimática, respectivamente. O método enzimático mostrou-se sensível e preciso, entretanto, ao contrário da metodologia cromatográfica, necessita de controle rigoroso das condições de análise.

**Palavras-chave:** carne; leite; colesterol; método enzimático; CLAE.

## SUMMARY

COMPARATIVE EVALUATION OF TWO METHODS FOR THE DETERMINATION OF CHOLESTEROL IN MEAT AND MILK. The objective of this work was to compare two methods, one enzymatic and the other chromatographic using HPLC, for the determination of cholesterol in meat and milk. For the chromatographic method, a C<sub>18</sub> column, 100 x 4.6mm, 4µm (Chromolith, Merck), was used, acetonitrile:isopropanol as the mobile phase (85:15 for samples of meat and 95:05 for samples of milk), a flow rate of 2mL/min and detection by UV-Visible at 210nm. In the enzymatic method, absorbance was read against the blank at 499nm, 90 minutes after the reaction. Each product was analyzed ten times with each methodology, the results being similar (p>0.01). The mean recovery was 95% for the meat samples and 97% for the milk samples with both methodologies. The results obtained for the meat standard reference material (SRM 1546, NIST) were similar to those declared on the certificate. The coefficients of variation for the milk samples were 0.81 and 0.82%, and for the meat samples, 2.3 and 2.9% for the chromatographic and enzymatic methods respectively. The enzymatic method was shown to be sensitive and precise, whilst, to the contrary, the chromatographic method required a rigorous control of the analytical conditions.

**Keywords:** meat; milk; cholesterol; enzymatic method; HPLC.

## 1 – INTRODUÇÃO

A desinformação referente às concentrações de colesterol nos alimentos e as verdadeiras implicações relativas à sua ingestão, inclusive entre profissionais ligados à área de saúde, têm levado à redução no consumo de produtos de origem animal, com conseqüentes desvantagens nutricionais. Assim, justifica-se o desenvolvimento e a divulgação de metodologias para determinação deste constituinte em matrizes alimentícias, que apresentem simultaneamente especificidade, sensibilidade, precisão e exatidão, além de rapidez e baixos custos operacionais.

A metodologia enzimática baseia-se na degradação do colesterol pela enzima colesterol-oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio, que através de reação secundária produz cor. A intensidade de cor produzida é diretamente proporcional a quantidade de colesterol contida na amostra [12].

O método enzimático é rotineiramente utilizado na determinação do colesterol em amostras de sangue [1], sendo adaptado para quantificação do colesterol em amostras de ovos [6, 7, 9, 12], massas com ovos [3, 11], maionese, sopas e salsichas [14], queijo e frango [8]. Entretanto, ULBERTH & REICH [14] relataram que a metodologia enzimática superestima os teores de colesterol em alimentos que contém óleos vegetais. Esta discrepância provavelmente é causada pelas interações entre a enzima colesterol-oxidase contida no kit e os esteróis presentes nos óleos vegetais [4]. DUMAIN et al. [3] ao analisarem massas com ovos, obtiveram valores mais elevados de colesterol por cromatografia gasosa (CG) do que pelo método enzimático. No entanto, quando o método enzimático é utilizado em alimentos que não contém fitosteróis como ovos, frango e queijo, apresenta resultados semelhantes aos obtidos por CG e CLAE [7, 8, 9].

Os métodos cromatográficos, apesar de eficazes, são bastante onerosos. A CLAE tem sido empregada em detrimento à CG na determinação do colesterol em alimentos, devido ao fato de utilizar temperaturas relativamente baixas (30°C), impedindo a oxidação do colesterol.

O objetivo do presente trabalho foi otimizar, validar e comparar duas metodologias distintas, enzimática e por CLAE na determinação dos teores de colesterol em amostras de leite e carne.

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 12/11/2003. Aceito para publicação em 10/12/2002 (001025).

<sup>2</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, caixa postal 6121. CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil, neura@fea.unicamp.br, fax: 55 19 7887890.

\*A quem a correspondência deve ser enviada.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Material

Para a investigação dos dois métodos de análise foram utilizados 1kg de contrafilé bovino e 1L de leite integral adquiridos em supermercado da região de Campinas, SP.

Após a retirada da gordura externa, a amostra de contrafilé foi homogeneizada em multiprocessador (WALITA RI 3270) até a obtenção de uma pasta. O leite integral foi apenas agitado manualmente. Aliquotas convenientes foram tomadas para análise.

Foram realizadas 10 repetições de cada amostra, para os dois métodos testados.

### 2.2 – Métodos

A Figura 1 representa o fluxograma analítico. Para ambos os métodos, a obtenção da matéria insaponificável foi realizada através de saponificação direta das amostras, de acordo com NOGUEIRA & BRAGAGNOLO [10], com modificações realizadas durante o presente trabalho.

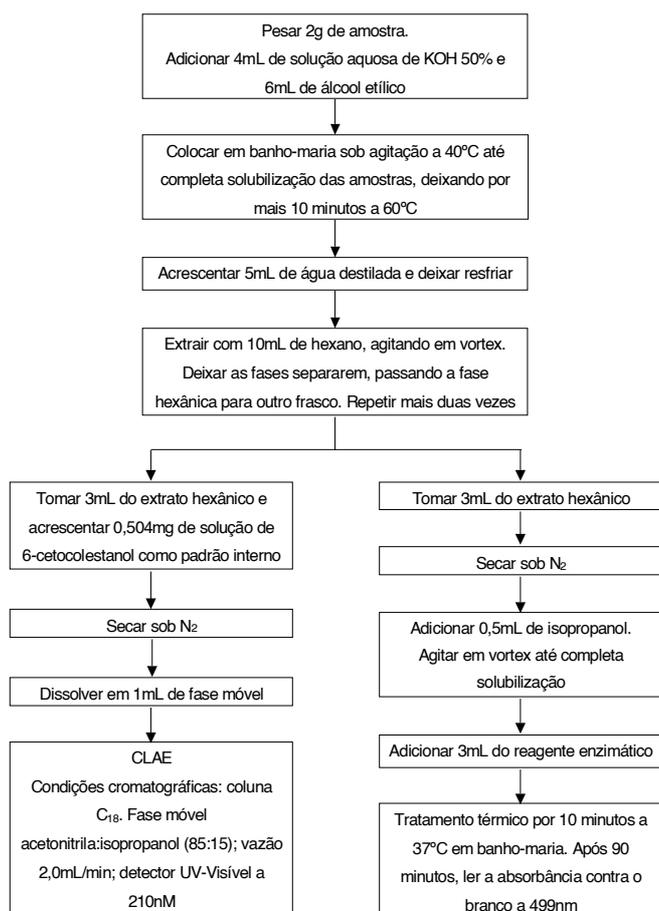


FIGURA 1. Fluxograma para determinação do colesterol em carne.

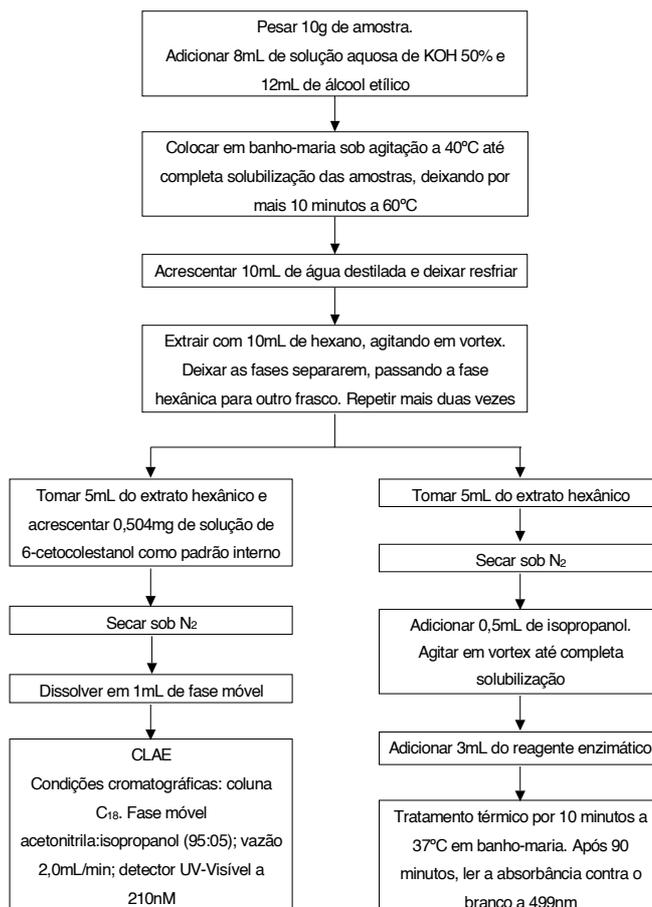


FIGURA 2. Fluxograma para determinação do colesterol em leite.

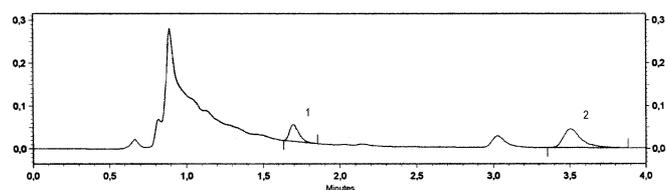
### 2.3 – Determinação do colesterol pelo método enzimático

Para quantificação do colesterol através da metodologia enzimática, utilizou-se kits laboratoriais da Laborlab S/A, compostos por dois reativos de cor (o nº 1, contendo 0,025mol/L de 4 aminofenazona e o nº 2 contendo 0,055mol/L de fenol), além do reativo enzimático (Colesterol-oxidase 3U/mol, POD 20U/mol, Lipase 300U/mol). Preparou-se o reagente de trabalho através da adição de 0,5mL do reativo de cor nº 1, 0,5mL do reativo de cor nº 2, 19mL de água destilada e 0,4mL do reativo enzimático. Adicionou-se 3mL do reagente de trabalho às amostras e procedeu-se tratamento térmico por 10 minutos a 37°C em banho-maria. Após repouso de 90 minutos, leu-se a absorbância contra o branco, igualmente preparado a 499nm. A curva de calibração foi construída a partir de uma solução padrão de colesterol (1,006mg/100mL), com concentrações variando de 0,01 a 0,05mg/mL.

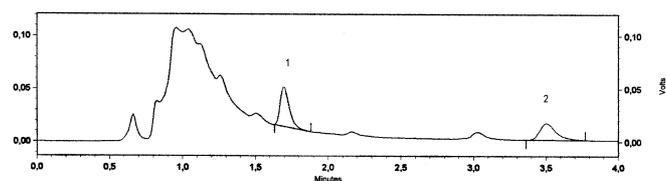
### 2.4 – Determinação do colesterol por CLAE

Utilizou-se um cromatógrafo líquido (SHIMADZU) equipado com sistema ternário de solventes (LC-10 AD<sub>vp</sub>) e detector UV-Visível (SPD -10 AV<sub>vp</sub>). A coluna analítica

usada foi  $C_{18}$ , 100 x 4,6mm x 4 $\mu$ m (Chromolith, Merck). A fase móvel constituiu-se de acetonitrila:isopropanol (85:15 para amostras de carne e 95:05 para amostras de leite), na vazão de 2mL/min, sendo o tempo de análise 4 minutos. Os solventes utilizados foram grau cromatográfico, filtrados e desgaseificados em ultra-som antes do uso. Os cromatogramas foram processados a 210nm. A identificação do colesterol foi realizada através de comparação do tempo de retenção das amostras com o padrão e a quantificação através das áreas correspondentes dos picos, por padronização interna, utilizando-se 6-cetocolesterol como padrão interno. Cromatogramas típicos das amostras de carne e leite podem ser observados nas Figuras 3 e 4.



**FIGURA 3.** Cromatograma característico de amostra de leite obtido por CLAE. Condições cromatográficas: Fase móvel acetonitrila:isopropanol (95:05), coluna  $C_{18}$ , 100 x 4,6mm x 4 $\mu$ m (Chromolith, Merck), vazão 2mL/min. Picos: (1) 6-cetocolesterol e (2) colesterol.



**FIGURA 4.** Cromatograma característico de amostra de carne obtido por CLAE. Condições cromatográficas: Fase móvel acetonitrila:isopropanol (85:15), coluna  $C_{18}$ , 100 x 4,6mm x 4 $\mu$ m (Chromolith, Merck), vazão 2mL/min. Picos: (1) 6-cetocolesterol e (2) colesterol.

## 2.5 - Validação das metodologias

Foi utilizado material de referência certificado de carne (SRM 1546, NIST) para verificar a exatidão e precisão das metodologias testadas. Também foi efetuada recuperação, adicionando-se dois níveis de colesterol às amostras de carne (0,503 e 0,760mg) e leite (0,106 e 0,125mg), sendo realizadas 5 repetições para cada nível de adição. A precisão foi observada através dos coeficientes de variação.

## 2.6 - Análise estatística

Para verificar as diferenças entre os teores de colesterol obtidos em carne e leite pelos 2 métodos foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tuckey, ao nível de 1% de significância.

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e o desvio padrão das amostras determinados pelos métodos enzimático e por CLAE encontram-

se nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Os resultados obtidos para as metodologias avaliadas mostraram-se equivalentes, não havendo diferença significativa ao nível de 0,01%.

A média dos teores de colesterol obtidos pelos métodos enzimático e cromatográfico foi de  $52 \pm 1$ mg/100g para amostras de carne e  $9,7 \pm 0,08$  para amostras de leite, resultados inferiores aos determinados pela USDA [15] que obtiveram 62 e 14mg/100g para amostras de contrafilé e leite, respectivamente. BRAGAGNOLO & RODRIGUEZ-AMAYA [2] determinaram teores de  $51 \pm 6$ mg/100g de colesterol para cortes de contrafilé bovino, quantificados por colorimetria. PELEARI et al. [13] utilizando cromatografia gasosa, obtiveram teores de 50,1mg/100g para o referido corte, resultados semelhantes aos determinados no presente trabalho. Em relação às amostras de leite, os teores determinados mostraram-se inferiores aos obtidos por HUBER et al. [5], que encontraram teores de 15mg/100g utilizando CG. XU et al. [16] obtiveram teores de 13,4 e 13,5mg/100g em amostras de leite quantificadas por colorimetria e eletroforese capilar, respectivamente. As diferenças observadas entre os resultados podem ser atribuídas a fatores como raça, clima, alimentação, sistemas de criação, além do método analítico utilizado.

O coeficiente de variação (%CV) entre 10 repetições nas amostras de leite foi de 0,81 e 0,82%, e de carne 2,3 e 2,9%, para os métodos cromatográfico e enzimático, demonstrando boa precisão das metodologias (Tabelas 1 e 2). NOGUEIRA & BRAGAGNOLO [9] determinaram coeficiente de variação de 4,5% para as metodologias enzimática e cromatográfica em amostras de ovo em pó. ULBERT & REICH [14] obtiveram CV de 2,49% através de metodologia enzimática em amostras de salsicha.

Os teores de colesterol determinados para o material de referência certificado de carne (SRM 1546, NIST) estão apresentados na Tabela 3. Obteve-se  $75,0 \pm 0,5$  e  $75,0 \pm 0,4$ mg/100g, através dos métodos cromatográfico e enzimático, respectivamente. Os teores mostraram-se semelhantes ao declarado no certificado ( $75 \pm 7$ mg/100g), demonstrando que as metodologias utilizadas são exatas e precisas.

**TABELA 1.** Teores de colesterol (mg/100g) em amostras de carne obtidos pela comparação entre os métodos enzimático e por CLAE.

Amostra	CLAE	Enzimático
1	51,60	51,60
2	52,88	52,74
3	50,55	50,00
4	53,00	52,91
5	53,55	54,83
6	53,10	52,37
7	51,60	51,81
8	50,33	51,36
9	53,70	54,97
10	51,21	51,43
M $\pm$ DP <sup>*</sup>	52 $\pm$ 1	52 $\pm$ 1
%CV <sup>**</sup>	2,3	2,9

\*M  $\pm$  DP = Média  $\pm$  estimativa de desvio padrão de 10 análises  
 \*\*CV = Coeficiente de variação

**TABELA 2.** Teores de colesterol (mg/100g) em amostras de leite obtidos pela comparação entre os métodos enzimático e por CLAE.

Amostra	CLAE	Enzimático
1	9,88	9,86
2	9,81	9,73
3	9,65	9,62
4	9,69	9,68
5	9,71	9,70
6	9,76	9,76
7	9,80	9,83
8	9,84	9,84
9	9,67	9,66
10	9,69	9,71
M ± DP*	9,75 ± 0,08	9,74 ± 0,08
%CV**	0,81	0,82

\*M ± DP = Média ± estimativa de desvio padrão de 10 análises  
 \*\*CV = Coeficiente de variação

**TABELA 3.** Teores de colesterol (mg/100g) em material de referência certificado de carne (SRN 1546, NIST)

Amostra	CLAE	Enzimático
1	74,80	74,80
2	75,77	75,40
3	75,30	75,25
4	74,62	74,65
5	74,83	74,91
6	75,00	74,94
7	74,10	74,33
8	75,00	75,22
9	75,70	75,44
10	75,00	75,23
M ± DP*	75,0 ± 0,5	75,0 ± 0,4
%CV**	0,7	0,5

\*M ± DP = Média ± estimativa de desvio padrão de 10 análises  
 \*\*CV = Coeficiente de variação

Os resultados dos testes de recuperação estão apresentados nas Tabelas 4 e 5. As taxas de recuperação obtidas foram de 95% nas amostras de carne e 97% nas amostras de leite para ambas metodologias, comprovando a eficiência dos métodos avaliados. Resultados semelhantes foram encontrados por NOGUEIRA & BRAGAGNOLO [11], que determinaram taxas de recuperação de  $97,8 \pm 0,6$  e  $99,0 \pm 0,6\%$  para os métodos por CLAE e enzimático, respectivamente, em amostras de massas com ovos. KARKALAS, DONALD & CLEGG [8] obtiveram recuperação de 97,7% e 99,2% para as metodologias por CG e enzimática, em amostras de queijo e frango. Recuperação de 99% em amostras de carne de pato foi encontrada por NOGUEIRA & BRAGAGNOLO [10] utilizando CLAE.

**TABELA 4.** Recuperação do colesterol (%) em amostras de carne, obtidas pelos métodos cromatográfico e enzimático.

Colesterol adicionado (mg/100g)	CLAE		Enzimático	
	M* ± DP	%CV**	M ± DP	%CV
0,503	95 ± 1	1,4	95 ± 1	1,7
0,760	95 ± 1	1,3	95 ± 1	1,5

\*M ± DP = Média ± estimativa de desvio padrão de 5 repetições  
 \*\*CV = Coeficiente de variação

**TABELA 5.** Recuperação do colesterol (%) em amostras de leite, obtidas pelos métodos cromatográfico e enzimático.

Colesterol adicionado (mg/100g)	CLAE		Enzimático	
	M* ± DP	%CV**	M ± DP	%CV
0,106	97 ± 1	1,5	97 ± 1	1,3
0,125	97 ± 0,3	0,4	97 ± 0,4	0,4

\*M ± DP = Média ± estimativa de desvio padrão de 5 repetições  
 \*\*CV = Coeficiente de variação

## 4 – CONCLUSÕES

A metodologia enzimática apresentou-se exata e precisa, podendo ser empregada com segurança por indústrias de alimentos e laboratórios de pesquisa na determinação dos teores de colesterol em carne e leite, sendo uma opção barata e rápida, especialmente quando um grande número de amostras é analisado. Entretanto, ao contrário da metodologia cromatográfica, necessita de controle rigoroso das condições de análise.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAN, C.S.G., RICHMOND, W., FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, v. 20, n.4, p. 470-475, 1974.
- [2] BRAGAGNOLO, N., RODRIGUEZ-AMAYA, D. Teores de colesterol em carne suína e bovina e efeito do cozimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 15, n.1, p. 11-17, 1995.
- [3] DUMAIN, J., BANNER, C., QUENTRIC, Y., PAILER, F.M. Évaluation de la quantité d'oeufs incorporée dans les pâtes alimentaires aux oeufs. **Ann. Fals. Exp. Chim. Tox.**, v. 81, p. 427-440, 1988.
- [4] HOMBERG, E., BIELEFELD, B. Vergleichende sterinegehaltsbestimmung in fetten und olen. Teil II: enzymatische und colorimetrische methoden. **Fat Sci. Technol.**, v. 89, p. 353-355, 1987.
- [5] HUBER, W., MOLERO, A., PEREYRA, C., LA OSSA, E.M. Determination of cholesterol in milk by supercritical fluid chromatography. **J. Chrom.**, v.715, p. 333-336, 1995.
- [6] JIANG, Z., CHERIAN, G., ROBINSON, F.E., SIM, J.S. Effect of feeding cholesterol to laying hens and chicks on cholesterol metabolism in pre and post-hatch chicks. **Poult. Sci.**, v. 69, p. 1694-1701, 1990.
- [7] JIANG, Z., FENTON, M., SIM, J.S. Comparison of four different methods for egg cholesterol determination. **Poult. Sci.**, v. 70, p. 1015-1019, 1991.
- [8] KARKALAS, J., DONALD, E., CLEGG, K.M. Cholesterol content of poultry meat and cheese determined by enzymic and gas-liquid chromatography methods. **J. Food Technol.**, v. 17, p. 281-283, 1982.
- [9] NOGUEIRA, G.C., BRAGAGNOLO, N. Utilização de um método enzimático para determinação de colesterol em ovo em pó. **Anais XVI Cong. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 1, p. 431-434, 1998.
- [10] NOGUEIRA, G.C., BRAGAGNOLO, N. **Anais XVIII Cong. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 1, p. 328-332, 2002. CD-Rom
- [11] NOGUEIRA, G.C., BRAGAGNOLO, N. Assessment of methodology for the enzymatic assay of cholesterol in egg noodles. **Food Chem.**, v. 79, p. 267-270, 2002.
- [12] PASIN, G., SMITH, G.M., OMAHONY, M. Rapid determination of total cholesterol in egg yolk using commercial diagnostic cholesterol reagent. **Food Chem.**, v. 61, n. 1, p. 255-259, 1998.
- [13] PELEARI, A.P., CAMISACA, S., BERETTA, P.R., RENON, P., CORSICO, P., BERTOLO, G., CRIVELLI, G. Ostrich meat: Physico-chemical characteristics and comparison with turkey and bovine meat. **Meat Sci.**, v. 48, n. 3, p.205-210, 1998.
- [14] ULBERTH, F., REICH, H. Gas chromatographic determination of cholesterol in processed foods. **Food Chem.**, v. 43, p. 387-391, 1992.

- [15] USDA. **Nutrient database for standard reference**, Release 14, 2002.
- [16] XU, X.H., LI, R.K., CHEN, J., CHEN, P., LING, X.Y., RAO, P.F. Quantification of cholesterol in foods using non-aqueous capillary electrophoresis. **J. Chrom. B.**, v. 768, p. 369-373, 2002.

## **6 – AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à FAEP (Fundação de Apoio ao Ensino à Pesquisa), UNICAMP e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.