

Paraná

Este exemplar corresponde a certidão fornecida
de acordo com a Lei nº 11.105/92, aprovada
pela Comissão Julgadora em 10/02/92.

Campos, 10 de fevereiro de 1992

Helia P. Gray

Presidente da Banca

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE COLESTEROL

EM CARNES, OVOS E MASSAS COM OVOS

05192

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE COLESTEROL

EM CARNES, OVOS E MASSAS COM OVOS

Neura Bragagnolo
Química

Dra. Délia Rodriguez-Amaya
Orientadora

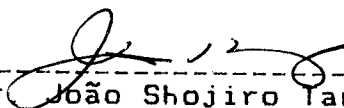
1992

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

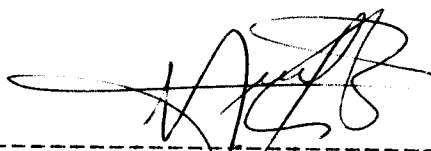
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Délia B. Rodriguez-Amaya
(Presidente)



Dr. João Shojiro Tango
(Membro)



Prof. Dr. Nivaldo Baccan
(Membro)

Dra. Myrna Sabino
(Membro)

Campinas, de de 1992

Ao meus pais.

Ao Gerson, por todo seu
amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Délia B. Rodriguez-Amaya, pela orientação, convívio e amizade durante a execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dr. João Shojiro Tango, Prof. Dr. Nivaldo Bacchan e a Dra. Myrna Sabino, pelas valiosas sugestões apresentadas na redação final da tese.

Ao CNPq, CAPES e FAEP da UNICAMP, pelo suporte financeiro concedido.

Ao Instituto de Pesquisas Biológicas, Secretaria da Saúde e Meio Ambiente do Rio Grande do Sul, pela oportunidade.

À minha família, que mesmo longe fizeram-se sempre presentes dando força, apoio e incentivo.

Ao pessoal do Laboratório de Análise de Alimentos, pelo convívio, amizade e apoio.

Aos mestres e amigos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado, o meu melhor agradecimento.

À ABIA, Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pelas cópias da tese.

ÍNDICE GERAL

	página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	3
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 - Colesterol: Um Esterol.....	4
3.2 - Importância do Colesterol.....	6
3.3 - Metabolismo do Colesterol.....	6
3.3.1 - Biossíntese do colesterol.....	7
3.3.2 - Transporte.....	9
3.3.2.1 - Lipoproteínas.....	9
3.3.3 - Excreção do colesterol.....	11

3.4 - Colesterol, Cardiopatia Côronária e Aterosclerose...	11
3.4.1 - Controlando o colesterol com dieta.....	13
3.4.1.1 - Ácidos graxos saturados e polinsaturados ômega 6	14
3.4.1.2 - Ácidos graxos polinsaturados ômega 3	16
3.4.2 - Controlando o colesterol com drogas.....	17
3.5 - Métodos Empregados para Determinação do Colesterol..	18
3.5.1 - Métodos colorimétricos.....	18
3.5.2 - Método enzimático.....	21
3.5.3 - Métodos cromatográficos.....	22
3.5.3.1 - Cromatografia gás-líquida.....	23
3.5.3.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	26
3.5.4 - Extração dos Lipídios.....	29
3.6 - Teores de Colesterol.....	30
3.6.1 - Em carne de frango.....	30
3.6.2 - Em carne suína.....	32
3.6.3 - Em carne bovina.....	33
3.6.4 - Em ovos.....	35
3.6.5 - Em massas com ovos.....	38
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 - Materiais.....	40
4.1.1 - Amostras de carne de frango.....	40
4.1.2 - Amostras de carne suína.....	40
4.1.3 - Amostras de carne bovina.....	41
4.1.4 - Amostras de ovos.....	42
4.1.5 - Amostras de massas com ovos.....	42

4.2 - Métodos.....	42
4.2.1 - Para amostras de carnes.....	42
4.2.2 - Para amostras de ovos.....	44
4.2.2.1 - Método colorimétrico segundo Bohac <u>et al.</u>	44
4.2.2.2 - Método colorimétrico segundo Instituto Adolfo Lutz (IAL)	45
4.2.2.3 - Método CLAE.....	46
4.2.3 - Para amostras de massas com ovos.....	48
4.2.3.1 - Método colorimétrico do IAL.....	48
4.2.3.2 - Método colorimétrico segundo Bohac <u>et al.</u>	49
4.2.3.3 - Método por CLAE.....	50
4.3 - Análise estatística.....	51
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1- Avaliação do método colorimétrico para carne.....	52
5.2 - Teores de colesterol em carne de frango.....	57
5.3 - Teores de colesterol em carne suína.....	64
5.4 - Teores de colesterol em carne bovina.....	70
5.5 - Comparação dos teores de colesterol entre carne de frango, suína e bovina.....	75
5.6 - Avaliação do método CLAE para ovos.....	76
5.7 - Comparação de métodos colorimétricos e por CLAE para ovos.....	80
5.8 - Teores de colesterol em ovos.....	82

5.9 - Avaliação do método por CLAE para massas com ovos.....	82
5.10 - Teores de colesterol em massas com ovos.....	87
6- CONCLUSÃO.....	89
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1	- Características e funções das lipoproteínas plasmáticas.....	10
Tabela 2	- Dieta recomendada pelo "National Cholesterol Education Program".....	14
Tabela 3	- Mecanismos propostos nos quais AG w-6 e AGS afetam os lipídios plasmáticos.....	16
Tabela 4	- Trabalhos realizados com CLAE.....	28
Tabela 5	- Recuperação do colesterol adicionado em carne branca de frango.....	55
Tabela 6	- Efeito dos antioxidantes adicionados na etapa da saponificação.....	57
Tabela 7	- Concentração de colesterol em carne de frango crua de diferentes marcas.....	58
Tabela 8	- Concentração de colesterol em carne de frango assada.....	60
Tabela 9	- Efeito do cozimento na concentração do colesterol em carne de frango.....	62
Tabela 10	- Concentração de colesterol em cortes de carne suína crua.....	65
Tabela 11	- Concentração de colesterol em cortes de carne suína cozida.....	67
Tabela 12	- Efeito do cozimento na concentração de colesterol em carne suína.....	68
Tabela 13	- Umidade e concentração de colesterol em cortes de carne bovina crua.....	70
Tabela 14	- Concentração de colesterol em cortes de carne bovina crua e cozida, base seca.....	73
Tabela 15	- Comparação de três procedimentos de saponificação.....	76
Tabela 16	- Recuperação do colesterol em gema de ovo pelo método CLAE.....	77
Tabela 17	- Reprodutibilidade do tempo de retenção do colesterol em três dias consecutivos.....	77
Tabela 18	- Comparação dos valores de colesterol em gema de ovo (mg/100g) obtidos por dois métodos colorimétricos e por CLAE.....	80

Tabela 19 - Concentração de colesterol em ovos determinado por CLAE.....	82
Tabela 20 - Recuperação do colesterol em massas com ovos pelo método por CLAE.....	84
Tabela 21 - Reprodutibilidade do tempo de retenção do colesterol em três dias consecutivos.....	84
Tabela 22 - Comparação dos valores de colesterol em massas com ovos (g/kg) obtidos por dois métodos colorimétricos e CLAE.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Estrutura básica dos esteróis.....	4
Figura 2 - Estrutura do colesterol.....	5
Figura 3 - Biossíntese do colesterol.....	8
Figura 4 - Fluxograma para determinação de colesterol em carnes.....	43
Figura 5 - Fluxograma para determinação de colesterol em ovos, segundo Bohac <u>et al</u>	45
Figura 6 - Fluxograma para determinação de colesterol em ovos, de acordo com IAL.....	46
Figura 7 - Fluxograma para determinação de colesterol em ovos por CLAE.....	47
Figura 8 - Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos, segundo IAL.....	49
Figura 9 - Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos, segundo Bohac <u>et al</u>	50
Figura 10 - Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos por CLAE.....	51
Figura 11 - Espectros de absorbância do colesterol após 5, 10, 15 e 20 min de reação com ác. acético/ FeSO ₄ + H ₂ SO ₄ (350-550 nm).....	53
Figura 12 - Espectros de absorbância do colesterol após 10, 15 e 20 min de reação com ác. acético/ FeSO ₄ + H ₂ SO ₄ (200-900 nm).....	54
Figura 13 - Curva padrão do colesterol reagido com ác. acético/FeSO ₄ + H ₂ SO ₄ , em 490 nm.....	56
Figura 14 - Concentração de colesterol em carne de frango crua de diferentes marcas.....	59
Figura 15 - Concentração de colesterol em carne de frango assada.....	61
Figura 16 - Concentração de colesterol em carne de frango crua e assada, base seca.....	63
Figura 17 - Concentração de colesterol em carne suína crua.....	66
Figura 18 - Concentração de colesterol em carne suína crua e cozida, base seca.....	69

Figura 19 - Concentração de colesterol em carne bovina crua	71
Figura 20 - Concentração de colesterol em carne bovina crua e cozida, base seca.....	74
Figura 21 - Cromatogramas característicos de uma amostra de gema de ovo (a) e do padrão colesterol (b) Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-1, 5 μ m (150 x 4,6 mm); fase móvel, acetonitrila:isopropanol (50:50); fluxo, 1,2 ml/min.; detector conjunto de diodos 205 nm.....	78
Figura 22 - Espectros característicos de absorbância do padrão colesterol (a) e da amostra gema de ovo (b) obtidos pelo detector conjunto de diodos.....	79
Figura 23 - Cromatogramas de uma amostra de massa com ovos saponificada (a) e não saponificada (b). Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-1, 10 μ m (300 x 4 mm); fase móvel, acetonitrila:metanol (50:50); fluxo, 1,2 ml/minuto; detector conjunto de diodos 205 nm.....	83
Figura 24 - Cromatogramas característicos do padrão colesterol (a) e de uma amostra de massa com ovos (b). Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-1, 5 μ m (150 x 4,6 mm); fase móvel, acetonitrila:isopropanol (75:25); fluxo, 1,2 ml/minutos; detector, conjunto de diodos 205 nm.....	85
Figura 25 - Espectros característicos de absorbância de uma amostra de massa com ovos (a) e do padrão colesterol (b) obtidos pelo detector conjunto de diodos.....	86

RESUMO

Foram determinados pelo método colorimétrico de Bohac *et al.* (1988) os teores de colesterol em carnes de frango, suína e bovina. Os valores obtidos para frango cru foram, em média, 58 ± 10 , 80 ± 9 e 104 ± 5 mg/100g para carne branca, escura e pele, respectivamente. Em frango assado os teores foram 75 ± 17 , 124 ± 20 e 139 ± 37 mg/100g para carne branca, escura e pele, respectivamente. As concentrações de colesterol em diferentes cortes de carne suína crua foram em média respectivamente de 49 ± 5 , 49 ± 7 , 50 ± 6 e 54 ± 6 mg/100g para bisteca, lombinho, pernil e toucinho. Os valores correspondentes para a carne suína cozida foram 97 ± 6 , 69 ± 12 , 82 ± 8 e 56 ± 6 mg/100g, respectivamente. Para a carne bovina crua, os teores foram em média 51 ± 6 , 56 ± 6 , 50 ± 4 , 52 ± 4 e 51 ± 6 mg/100g para contrafilé, coxão duro, coxão mole, músculo e peito, respectivamente. Para contrafilé e músculo cozido foram encontrados os valores de 66 ± 6 e 67 ± 4 mg/100g, respectivamente. As perdas por cozimento, calculadas em base seca, foram muito pequenas e em alguns casos desprezíveis.

O teor médio de colesterol obtido para ovo foi 190 ± 19 mg/ovo ou 10 ± 1 mg/g de gema pelo método por CLAE.

O método colorimétrico recomendado pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) superestimou os valores (311 ± 16 mg/ovo ou 17 ± 1 mg/g de gema), enquanto que o de Bohac *et al.*, deu resultados (204 ± 18 mg/ovo ou 11 ± 1 mg/g de gema) sem diferença significativa com o de CLAE.

Avaliando o uso do teor de colesterol como índice da quantidade de ovo em massas, os métodos colorimétricos (IAL e Bohac et al.) superestimaram os teores de colesterol e, conseqüentemente, a quantidade de ovo adicionada em todas as massas analisadas. Já o método por CLAE revelou que as massas analisadas continham quantidade de ovo abaixo do mínimo exigido pela legislação vigente.

SUMMARY

Using the colorimetric method of Bohac et al. (1988), the cholesterol concentrations of meat (chicken, pork and beef) were determined. The mean values obtained for raw chicken meat were 58 ± 10 , 80 ± 9 and 104 ± 5 mg/100g for white meat, dark meat and skin, respectively. In baked chicken the levels were 75 ± 17 , 124 ± 20 and 139 ± 37 mg/100g for white meat, dark meat and skin, respectively. The cholesterol concentrations in different cuts of raw pork were on the average 49 ± 5 , 49 ± 7 , 50 ± 6 and 54 ± 6 mg/100g for rib chop, tenderloin, ham and belly, respectively. The corresponding values for cooked pork were 97 ± 6 , 69 ± 12 , 82 ± 8 and 56 ± 6 mg/100g, respectively. For raw beef, the mean cholesterol levels were 51 ± 6 , 56 ± 6 , 50 ± 4 , 52 ± 4 , 51 ± 6 mg/100g for "longissimus dorsi", "biceps femoris", "semimembranosus", shank and breast, respectively. For cooked "longissimus dorsi" and shank, 66 ± 6 and 67 ± 4 mg/100g cholesterol, respectively, were encountered. Losses on cooking, calculated on the dry basis, were very small and in some cases negligible.

The mean cholesterol concentration for eggs obtained by an HPLC method was 190 ± 19 mg/egg or 10 ± 1 mg/g egg yolk. The colorimetric method recommended by the Instituto Adolfo Lutz (IAL) overestimated the concentrations (311 ± 16 mg/egg or 17 ± 1.0 mg/g egg yolk) while that of Bohac et al. (204 ± 18 mg/egg or 11 ± 1 mg/g egg yolk) gave results with no significant difference with those of the HPLC method.

Evaluating the use of the cholesterol level as index of the amount of eggs in egg noodles, the colorimetric methods of IAL and Bohac et al. overestimated the cholesterol concentration and, consequently, the amount of eggs added in all the samples analyzed. The HPLC method revealed that the amount of eggs in the egg noodles analyzed was below the minimum required by existing regulation.

1 - INTRODUÇÃO

O colesterol é uma substância complexa do tipo lipídio-derivado ou lipídio-esteróide presente, predominantemente, nas gorduras animais. É a matéria prima para a síntese de hormônios e vitaminas e constituinte essencial de todas as membranas celulares.

Entretanto, o aumento da taxa de colesterol no sangue é um dos principais fatores de risco para doenças coronarianas, assim como a hipertensão, o fumo, o estresse e a vida sedentária. O colesterol se deposita na camada interna das artérias, principalmente nas de grande e médio calibre, formando o ateroma.

De acordo com dados do Centro Brasileiro de Classificação de Doenças, da Universidade de São Paulo (USP), das 788 mil mortes registradas em 1985, 27,1% foram causadas por doenças cardiovasculares e 9% por tumores, como o câncer. Cardiologistas, clínicos gerais e nutricionistas recomendam uma dieta equilibrada (pobre em gordura e colesterol, e com preferência para gordura vegetal) para controlar a taxa de colesterol no sangue. Ao mesmo tempo, há reclamação sobre a dificuldade de estabelecer esta dieta, pela falta de dados nacionais.

Existem muitos trabalhos estrangeiros sobre teores de colesterol em alimentos, porém apenas uma referência nacional foi encontrada, onde Ferreira & Campos (1980) pesquisaram o conteúdo de colesterol na gema de quatro poedeiras comerciais sob o efeito de três níveis de energia em dietas isoprotéicas.

Por outro lado, o colesterol do ovo tem servido de parâmetro de qualidade para controle das massas que contém ovos. A resolução 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - Ministério da Saúde (CNNPA-MS) estabelece três ovos por kg de massa. Os laboratórios de fiscalização utilizam o método colorimétrico para este fim, o que gera muita controvérsia, pois o método não é específico para colesterol e assume que os ovos contêm uma concentração definida e constante de colesterol.

2 - OBJETIVOS

2.1-Determinar os teores de colesterol em carnes (bovina, suína e de aves) e ovos.

2.2-Avaliar a retenção de colesterol durante o cozimento das carnes.

2.3-Avaliar o parâmetro determinação de colesterol em massas com ovos como controle de qualidade.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Colesterol: Um Esterol

Os esteróis são álcoois de alto peso molecular, pertencentes à família dos esteróides. Constituem o componente principal da fração insaponificável dos óleos e gorduras. São compostos cuja estrutura básica é o núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno onde o hidrogênio da posição três é substituído por um grupo hidroxila, os hidrogênios das posições dez e treze por grupos metílicos, e o da posição dezessete por um radical R (Figura 1). Podem ser encontrados no estado livre ou esterificados com ácidos graxos de alto peso molecular.

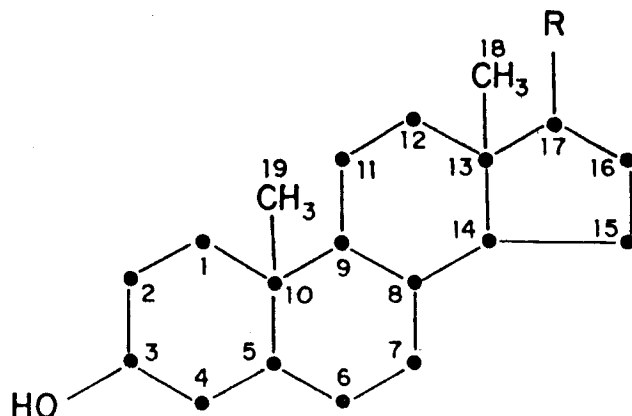


Figura 1 - Estrutura básica dos esteróis.

Os esteróis são classificados segundo a sua origem: zoosteróis (animal), fitosteróis (vegetal) e micosteróis (microorganismos). Entre os zoosteróis, o colesterol é o mais abundante e sua estrutura está representada na Figura 2.

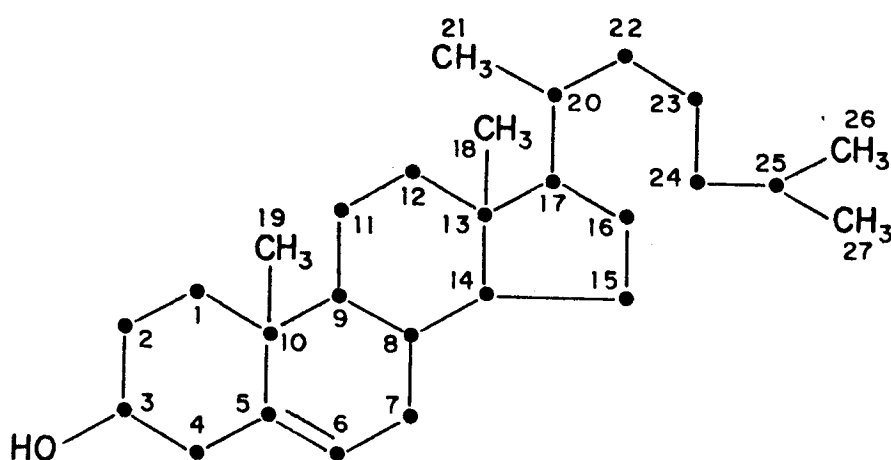


Figura 2 - Estrutura do colesterol.

Em vegetais, o esterois encontrado com maior frequência é o sitosterol, seguido do estigmasterol e do campesterol. O esterois mais importante produzido por fungos é o ergosterol, precursor da vitamina D₂.

3.2 - Importância do Colesterol

Embora os esteróis ocorram em todos os organismos animais e vegetais, os mais importantes são os de origem animal pois alguns têm importante papel biológico.

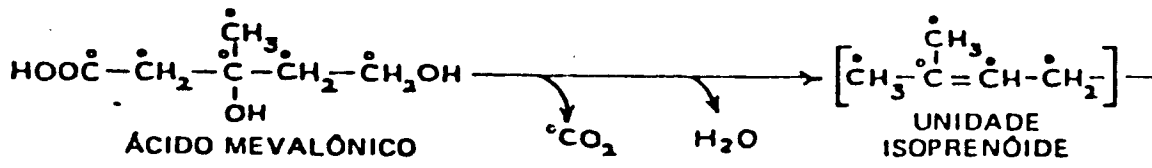
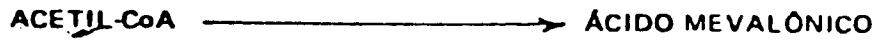
O colesterol é a chave intermediária de muitos esteróis em tecidos animais, incluindo os ácidos biliares, os androgênios (hormônios sexuais masculinos), os esterogênios (hormônios sexuais femininos), progesterona (hormônio progestacional) e os hormônios adrenocorticais. Além disso, é um constituinte de todas as membranas celulares. Uma de suas funções mais importantes é participar da síntese da vitamina D₃, através da transformação do 7-8-desidrocolesterol (Metzler, 1977).

3.3 - Metabolismo do Colesterol

A maior parte do colesterol do organismo, aproximadamente 75%, origina-se da biossíntese (colesterol endógeno), enquanto que apenas 25% é fornecido pela dieta (colesterol exógeno). Quando a alimentação é rica em colesterol, ocorre um bloqueio de sua síntese endógena. Por outro lado, a redução muito acentuada de colesterol alimentar pode aumentar sua fabricação biológica (Brown et al., 1981; Harper et al., 1982)..

3.3.1 - Biossíntese do colesterol

O colesterol é sintetizado a partir do acetato na fração microssômica da célula, principalmente no fígado, córtex adrenal, pele, intestino, testículo e aorta. A primeira etapa é a formação do acetil-CoA a partir do qual forma-se mevalonato, um composto de seis carbonos (Figura 3). Segue-se a formação de unidades isoprenóides, pela perda de CO_2 . Seis unidades isoprenóides se condensam para formar o intermediário esqualeno, que dá origem ao lanosterol. A conversão final de lanosterol para colesterol envolve a perda de três grupos metílicos, a migração de uma ligação dupla e a redução de outra. O processo é complexo e envolve mais de vinte e cinco enzimas; entre elas destaca-se a hidroximetilglutaril-coenzima-redutase (HMG-CoA) (Harper *et al.*, 1982).



[as posições numeradas são as do núcleo teróide.]

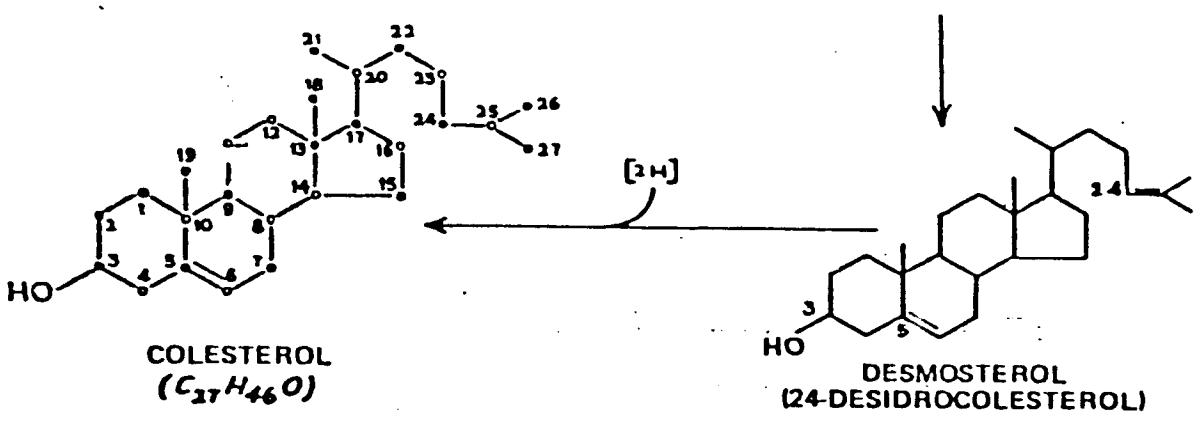
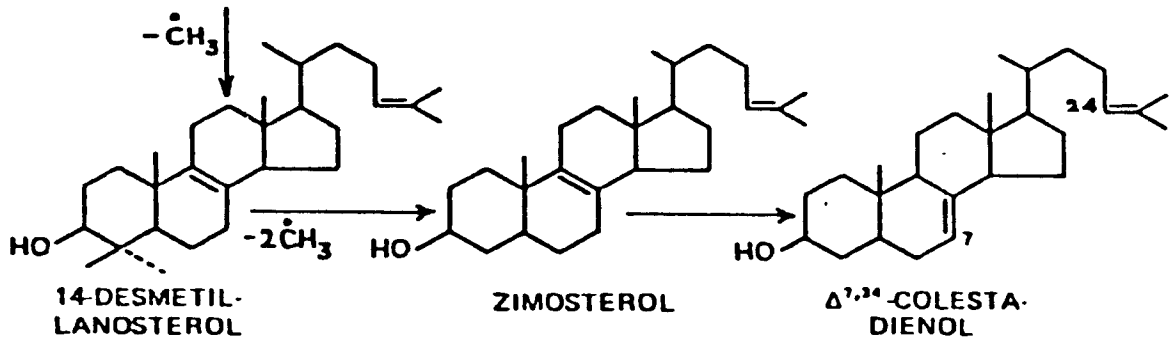
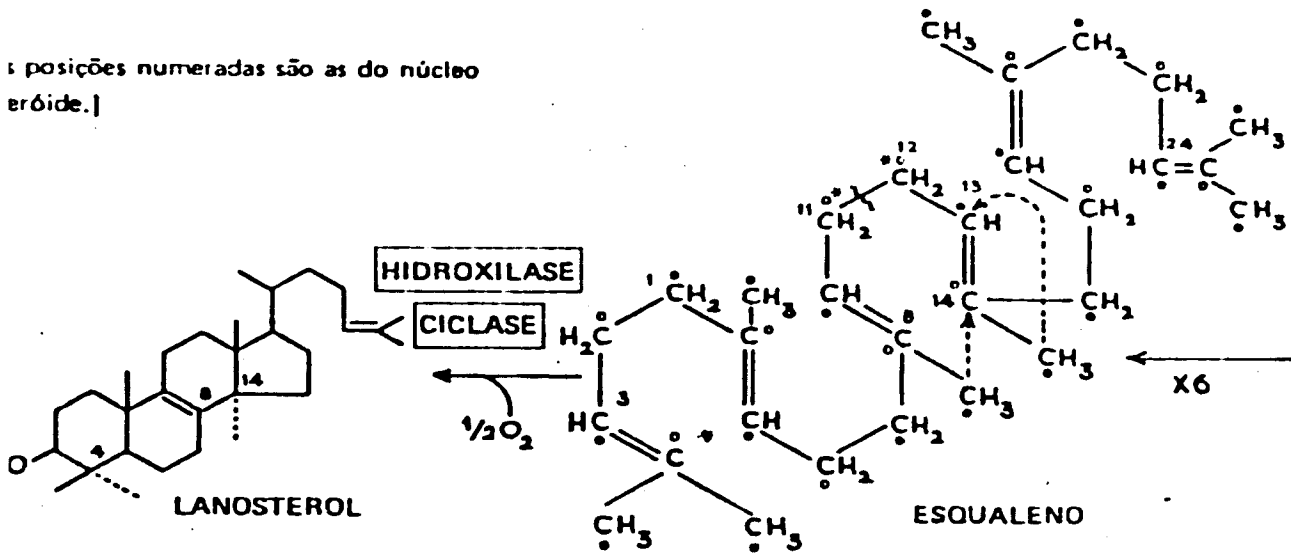


Figura 3 - Biossíntese do colesterol.

Fonte: Harper et al., 1982

3.3.2 - Transporte

O colesterol é transportado no plasma somente pelas lipoproteínas que são sintetizadas no fígado e no intestino.

3.3.2.1 - Lipoproteínas

Lipoproteínas são agregados macromoleculares formados por um centro hidrofóbico de triacilgliceróis (TG) e éster de colesterol, circundado por uma camada superficial de fosfolipídeos, colesterol livre e proteínas.

As lipoproteínas do plasma sanguíneo são classificadas de acordo com suas densidades em cinco grandes grupos: Quilomicrons (QM), Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa (Very Low-Density Lipoproteins, VLDL), Lipoproteínas de Densidade Intermediária (Intermediate-Density Lipoproteins, IDL), Lipoproteínas de Densidade Baixa (Low-Density Lipoproteins, LDL) e Lipoproteínas de Densidade Alta (High-Density Lipoproteins, HDL) (Kris-Etherton *et al.*, 1988).

Estudos recentes (Hostmark *et al.*, 1984) sugeriram três subgrupos para as lipoproteínas de alta densidade, HDL_{2b}, HDL_{2a} e HDL₃.

A fração protéica é denominada de apolipoproteína ou apoproteína. Até o momento, quatro grandes classes de apoproteínas foram identificadas e denominadas de apo A, B, C e E. Cada uma tem um comportamento metabólico e função distinta no metabolismo das lipoproteínas. Assim por exemplo, a apo A-I estimula a esterificação do colesterol na superfície das lipoproteínas. A apo B é importante na produção de VLDL e QM. A apo C participa como cofator específico para lipase lipoproteica, enzima responsável pela hidrólise dos TG. A apo E desempenha um papel importante no metabo-

lismo dos QMs e das VLDLs (Harper et al., 1982; Kris-Etherton et al., 1988).

A Tabela 1 contém informações sobre as principais características e funções das lipoproteínas plasmáticas.

Tabela 1 - Características e funções das lipoproteínas plasmáticas.

Características	Classes das lipoproteínas				
	Quilomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
densidade(g/ml)	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
origem	intestino	fígado e intestino	fígado em circulação secundária para metabolismo de outras lipoproteína	fígado	fígado e intestino
função fisiológica	transporte de TG da dieta	transporte de TG endógenos	precursor de LDL	transporte do colesterol	transporte reverso do colesterol
relação/ aterogenicidade	nenhuma	+	+++	++++	correlação negativa
composição, %					
triacilglicerol	90	60	40	10	5
colesterol	5	12	30	50	20
fosfolipídeos	3	18	20	15	25
proteínas	2	10	10	25	50
principais apolipoproteínas	A-I A-IV B-48 CI CII CIII	B-100 CI CII CIII E	B-100 E	B-100	A-I A-II

Fonte: Kris-Etherton et al. (1988).

3.3.3 - Excreção do colesterol

A principal via de degradação do colesterol é a conversão a ácidos biliares no fígado. Estes são liberados no intestino delgado onde auxiliam na absorção dos lipídios para formarem os quilomicrons. Os ácidos biliares são reabsorvidos durante a absorção lipídica.

A principal via de excreção do colesterol é a intestinal, onde o coprostanol (principal esteroide das fezes) é formado pela ação microbiana.

Uma fração menor do colesterol é convertido em hormônios esteróides, sofrendo eliminação urinária.

3.4 - Colesterol, Cardiopatia Coronária e Aterosclerose

Muitos pesquisadores demonstraram uma correlação entre os níveis elevados de lipídios séricos, principalmente o colesterol, e a incidência de cardiopatia coronária e aterosclerose (Keys, 1970; Reiser, 1978; Anderson et al., 1973). Todavia, outros parâmetros, como a relação colesterol/fosfolipídeos, concentração de triacilglicerol no soro, polinsaturados/saturados mostraram correlações semelhantes.

Os resultados dos estudos em diversos países indicaram que o colesterol da dieta é uma variável significativa na determinação de seus níveis na circulação. Brown et al. (1981) verificaram uma relação linear entre o colesterol da dieta e seus níveis na circulação e, teoricamente, o risco de enfermidade coronária decresceu de 3% para cada 1% da redução do colesterol plasmático. Mattson et al. (1972) assinalaram que cada 100 mg de coleste-

rol/1000 kcal consumida resulta em um aumento de colesterol no plasma de aproximadamente 12 mg/100 ml

Para Anderson et al. (1976) os níveis de colesterol no soro não dependiam somente do conteúdo de colesterol dos alimentos, mas também do balanço entre ácidos graxos saturados (AGS) e ácidos graxos polinsaturados (AGP)

Na maioria das pessoas altos teores de AGS e colesterol aumentaram os níveis de colesterol no sangue pela redução da atividade LDL-receptor. Obesidade e excesso de caloria elevaram os níveis de colesterol no sangue por estimulação e uma superprodução de LDL (Stoy, 1989).

O "National Cholesterol Education Program (NCEP)" publicou em 1988 um guia oficial para identificação e monitoramento de altos níveis de colesterol no sangue. O NCEP recomenda que adultos com mais de 20 anos determinem o teor de colesterol no sangue. Se o colesterol total for menor que 200 mg/dl a pessoa não necessita fazer o teste durante cinco anos. Níveis entre 200 a 239 mg/dl são tidos como faixa de alto risco e acima de 240 mg/dl como limite de alto risco. Pessoas com colesterol total de 200 a 239 mg/dl mesmo sem doença cardíaca coronariana (DCC) definida, mas com dois outros fatores de risco (sexo masculino, histórico familiar com DCC, fumo, hipertensão, diabete mellitus e obesidade) necessitam informações sobre dieta alimentar e dosagem anual do colesterol total. Pessoas com teores próximos a alto colesterol ou alto colesterol com DCC, ou que apresentem dois fatores de risco à DCC necessitam de análise das lipoproteínas. A análise das lipoproteínas inclui as seguintes determinações: colesterol total (TC), TG, lipoproteína de alta densidade-colesterol (HDL-C) e lipoproteína de baixa densidade-colesterol (LDL-C).

A importância do conhecimento do teor de LDL-C reside no fato de ser a subfração lipoprotéica mais aterogênica, sendo o parâmetro que define o tratamento. LDL-C abaixo de 130 mg/dl é desejável, entre 130-159 mg/dl está próximo a alto risco e acima de 160 mg/dl é alto risco (DCC). Um nível de HDL-C menor que 35 mg/dl é fator de risco para DCC.

3.4.1 - Controlando o colesterol com dieta

Indivíduos com colesterol entre 200-239 mg/dl e que apresentem dois ou mais fatores de risco a DCC devem iniciar um controle com dieta Fase I (Tabela 2). A dieta restringe a ingestão de colesterol e o total de gorduras, particularmente gorduras saturadas. Se a pessoa não reduzir seu nível de colesterol com a dieta Fase I, deve fazer uma mais restrita: dieta Fase II. Se o colesterol situa-se acima de 240 mg/dl, é necessário determinar o nível LDL-C. Para pessoas com níveis de LDL-C acima de 160 mg/dl, a meta é diminuí-la para valores abaixo de 160 mg/dl. Tendo dois fatores de risco a DCC, a meta é diminuir LDL-C para abaixo de 130 mg/dl.

Com dieta adequada, muitos pacientes com altos níveis de colesterol podem reduzir LDL-C de 10 a 15% ou mais, se for adicionado fibras solúveis à dieta. Pacientes com alimentação rica em gorduras e que aderiram a uma dieta com baixo colesterol podem obter mais de 30% de redução do colesterol sanguíneo, porém a mais realista expectativa é de 10 a 15% (NCEP, 1988).

Tabela 2 - Dieta recomendada pelo "National Cholesterol Education Program".

Constituintes	Dieta Fase I	Dieta Fase II
	% de Caloria Total	
Gordura total	< 30%	< 30%
saturada	< 10%	< 7%
monoinsaturada	10-15%	10-15%
polinsaturada	> 10%	> 10%
Carboidrato	50-60%	50-60%
Proteína	10-20%	10-20%
Colesterol	<300mg/d	<200mg/d

Fonte: NCEP (1988).

3.4.1.1 - Ácidos graxos saturados e polinsaturados ômega 6

Numerosos estudos epidemiológicos e clínicos têm, firmemente, estabelecido o papel hipercolesterolêmico dos AGS e o papel hipocolesterolêmico dos ácidos graxos ômega 6 (AG w-6) (Kris-Etherton et al., 1988).

Relação significativa entre dieta habitual, nível de colesterol no soro e DCC foi apresentada por 12.000 homens em 18 populações de sete países (Finlândia, Grécia, Itália, Iugoslávia, Japão, Países Baixos e Estados Unidos) (Keys, 1970). A ingestão de AGS (em % de caloria) foi fortemente relacionada com 5 anos de incidência de DCC e com a concentração de colesterol no soro.

Duas equações foram desenvolvidas por Keys et al. (1965) e Hegsted et al. (1965) para determinar a magnitude da troca do colesterol total (C-total) no plasma em resposta à troca da composição de ácidos graxos na dieta. Ambas equações predizem que o efeito dos AGS em aumentar o colesterol do plasma é aproximadamente duas vezes o efeito dos AG w-6 em diminuir o colesterol.

Alterações na dieta para diminuir o colesterol no plasma, em ordem de sua relativa influência, inclui: 1) decréscimo de AGS, especificamente, láurico (C_{12:0}), mirístico (C_{14:0}) e palmítico (C_{16:0}); 2) aumento de AG w-6 especificamente, ácido linoléico (C_{18:2}); 3) redução de colesterol na dieta (Anderson et al., 1973).

Kris-Etherton et al. (1988), resumiram em uma tabela dez trabalhos de diversos pesquisadores sobre o efeito dos níveis de lipídios no plasma, variando as quantidades de AGS, ácidos graxos monoinsaturados (AGM) e AG w-6 e colesterol nas dietas. A dieta controle foi a média da dieta americana que contém aproximadamente: 40% de calorias provenientes da gordura, 13% de AGS e 400-500 mg de colesterol. O conteúdo de AGS diminuiu em todos estudos e em alguns, o conteúdo de AG w-6 aumentou. A mudança no nível de colesterol resultante variou de +4% a -17%, sendo que a média foi -11%. O colesterol do plasma e LDL-colesterol decresceu em pessoas alimentadas com dietas contendo baixo teor de lipídios. O decréscimo de HDL-colesterol, relatado em algumas investigações, foi menor, igual ou maior que o relatado para LDL-colesterol.

Os mecanismos propostos nos quais AG w-6 diminuíam e AGS aumentam o C-total do plasma estão apresentados na Tabela 3 (Kris-Etherton et al., 1988).

Tabela 3 - Mecanismos propostos nos quais AG w-6 e AGS afetam os lipídios plasmáticos.

AG w-6

- . aumenta os esteróis fecais e a excreção de sais biliares
- . induz troca na composição de LDL e outras lipoproteínas que alteram seu metabolismo
- . diminui VLDL hepático e síntese de HDL
- . aumenta o catabolismo fracional das apolipoproteínas A-I e A-II
- . decresce a síntese e aumenta o catabolismo de apolipoproteína

AGS

- . diminui a síntese hepática e a atividade de LDL receptor

AGS e Colesterol

- . diminuem a síntese hepática e a atividade da LDL-receptor
- . induzem trocas na composição de VLDL e HDL
- . aumentam todas as lipoproteínas
- . diminuem o tamanho dos quilomicrons

Fonte: Kris-Etherton et al. (1988).

3.4.1.2 - Ácidos graxos polinsaturados ômega 3

Ácidos graxos polinsaturados ômega 3 (AG w-3) principalmente provenientes de peixes e óleos de peixes, têm sido responsáveis pela diminuição dos níveis de TG e, em menor extensão, dos níveis de C-total no plasma.

As propriedades hipolipidêmicas de óleos de peixe foram identificadas no início de 1950, mas somente na década de 70 houve interesse nos AG w-3, quando o estudo epidemiológico com Esquimós sugeriram o papel protetor dos lipídios marinhos contra as DCC.

Dyerberg (1986) e Bang et al. (1976) compararam os níveis de lipídios do plasma, dieta e a prevalência de aterosclerose em Esquimós e Dinamarqueses caucasianos. A mortalidade por infarto do

miocárdio entre os Esquimós foi de aproximadamente um décimo das apresentadas pelos Dinamarqueses, pois, para os Esquimós, os níveis de C-total no plasma, TG, LDL e VLDL foram menores e os níveis de HDL mais altos. A dieta das duas populações diferiram apenas na composição das gorduras. O total de gordura ingerida foi similar, mas os Dinamarqueses consumiram aproximadamente duas vezes mais AGS e AG w-6 que os Esquimós, enquanto a dieta dos Esquimós foi alta em AG w-3. As maiores fontes de AG w-3 na dieta dos esquimós foram peixes, foca, cavalo-marinho e baleia. Os principais AG w-3 no óleo de peixe são eicosapentaenóico (C_{20:5}) e docosahexaenóico (C_{22:6}).

Burr (1989) resumiu em uma tabela onze trabalhos sobre o efeito do óleo de peixe nos lipídios do sangue. Em todos os estudos a diminuição dos TG foi notavelmente consistente. Em dois ensaios a concentração do colesterol no sangue também diminuiu, enquanto que em uma experiência aumentou. O total da concentração da VLDL decresceu em dois estudos.

3.4.2 - Controlando o colesterol com drogas

Recomenda-se drogas terapêuticas quando LDL-C estiver acima de 190 mg/dl, após 6 meses de dieta ou acima de 160 mg/dl, com DCC. Sempre considerando que as drogas são aditivos da dieta, e não substitutivas destas. As principais drogas descritas no NCEP para diminuir o colesterol são: 1) sequestradores de ácidos biliares, 2) ácido nicotínico, 3) inibidores de HMG-CoA redutase, 4) genfibrozil, e 5) probucol (NCEP, 1988).

3.5 - Métodos Empregados para Determinação do Colesterol

Os métodos mais empregados para a determinação do colesterol podem ser divididos em três grupos: colorimétricos, enzimáticos e cromatográficos. Além destes, são encontrados na literatura os métodos gravimétricos, titulométricos e fluorimétricos.

3.5.1 - Métodos Colorimétricos

Dos três grupos, o mais barato é, sem dúvida, o colorimétrico.

Este método foi introduzido por Grigaut em, 1910, para a quantificação do colesterol em soro, utilizando a reação de Liebermann-Burchard (L-B), desenvolvida entre 1885 e 1890 (Zlatkis *et al*, 1953). A clássica reação de L-B consiste na reação do núcleo esterol com ácidos fortes. Desde então, numerosas modificações do método têm aparecido na literatura, principalmente no procedimento da extração e formação do cromóforo.

Discussões e investigações dos vários métodos têm sido publicadas (Beyer & Jensen, 1989a; Zak, 1980; Sperry & Webb, 1950). Sweeney & Weihrauch (1976) escreveram uma revisão sobre as metodologias empregadas, dando maior enfoque aos métodos colorimétricos. Descreveram aproximadamente 15 métodos colorimétricos, quase todos baseados na reação L-B, onde a maior variação ficou por conta do reagente para desenvolvimento de cor. Alguns reagentes citados foram: p-dimetilaminobenzoaldeído em clorofórmio e salicilaldeído em clorofórmio mais ácido sulfúrico; bromo, ácido sulfúrico e trimetilmetano; p-metilbenzenosulfônico, ácido acéti-

co e ácido sulfúrico; cloreto férrico, ácido acético glacial e ácido sulfúrico; cloreto de zinco em ácido acético glacial; antrona, cloreto férrico e de amônia, ácido acético, ácido sulfúrico; ácido sulfossilicólico em ácido acético glacial. Como os reagentes de cor variavam, conseqüentemente as cores formadas também variavam, assim, as leituras de absorbância foram feitas em comprimentos de onda diferentes.

Foram citados alguns problemas com a reação de L-B, tais como: reação com estigmasterol, sitosterol e outros lipídios (Garder & Williams, 1921); reação mais rápida com ésteres de colesterol que o colesterol livre (Garder & Williams, 1921); dependência da temperatura (Sperry & Webb, 1950); baixa sensibilidade e dependência do tempo, da luz e umidade (Crawford, 1958); interferências na cor quando digitonina não for retirada por lavagem (Sperry & Brand, 1943); não aplicabilidade para amostras de leite e produtos de leite (Ansbacher & Supplee, 1934); interferências de proteínas, esteróides, turvação (Brown, 1961) e vitamina A (Kinley & Krause, 1958).

Uma das mais usadas determinações colorimétricas para o colesterol foi introduzida por Zlatkis et al. (1953) que desenvolveram a reação com $FeCl_3$. Os autores estabeleceram que o colesterol livre e seus ésteres apresentavam igual reação de cor e que a saponificação não era necessária. Weiss et al. (1964) mostraram que este método superestimava consideravelmente o conteúdo de colesterol em ovos de galinhas alimentadas com dietas ricas em ácidos graxos insaturados. Eles verificaram que a presença de 30% de óleo de açafrão ou de linhaça na dieta aumentava, em 36 e 43%, respectivamente, o teor de colesterol, quando o procedimento direto de Zlatkis et al. (1953) era usado. Após saponificação, o

colesterol contido em ovos somente aumentava 19 e 27%. Enfoque semelhante foi dado por Brown (1961).

Searcy & Bergquist (1960) propuseram um método similar, substituindo o FeCl_3 por FeSO_4 para determinar a absorbância num comprimento de onda menos suscetível à interferências. O reagente FeSO_4 -ácido acético glacial e H_2SO_4 concentrado produz na presença do colesterol uma cor estável em 10 min. A formação de cor ocorre em temperatura relativamente baixa que não necessita ser rigidamente controlada. O uso de baixa concentração de H_2SO_4 e a produção de mínimas quantidades de calor tornam a reação menos suscetível à carbonização.

Colesterol pode ser precipitado com digitonina, seguido por determinação pelo método colorimétrico (Schoenheimer & Sperry, 1934; Sperry & Webb, 1950). Schoenheimer & Sperry (1934) relataram que a precipitação do colesterol com digitonina evita erros introduzidos como em outros métodos colorimétricos pela presença de substâncias cromogênicas presentes no extrato lipídico. No entanto, a digitonina precipitava somente o colesterol livre e não seus ésteres. Sperry & Webb (1950) estudaram a precipitação do colesterol por digitonina sob várias condições, utilizando o método de Schoenheimer-Sperry (1934) e observaram que a solução aquosa de digitonina perdia sua habilidade para precipitar quantitativamente o colesterol quando se tornava velha.

Muito se discute sobre a falta de especificidade do método colorimétrico, no entanto, Bohac *et al.* (1988) realizaram um estudo comparativo em carnes entre o método colorimétrico e cromatografia gasosa. A reação de cor utilizada foi a de Searcy & Bergquist, (1960). Os valores de colesterol obtidos pelos dois métodos não demonstraram diferença significativa. Para que os re-

sultados de colesterol não fossem superestimados foi sugerido a saponificação dos lipídios extraídos, eliminando assim, ácidos graxos livres e triacilgliceróis que pudessem estar presentes e interferir na reação de cor. O uso de um antioxidante (BHT, butil-hidroxitolueno; PG, galato de propila ou pirogalol) na mistura da saponificação foi também recomendado para evitar a oxidação de certos compostos no extrato lipídico da carne, os quais resultariam em produtos de oxidação que seriam extraídos pelo hexano. Para maior exatidão do método, os seguintes passos deveriam ser seguidos: 1- extração dos lipídeos totais com clorofórmio:metanol (2:1); 2- remoção do solvente do extrato lipídico; 3-saponificação alcalina do resíduo seco; 4- extração da parte insaponificável; 5- remoção do solvente da fração insaponificável; 6- reação de cor.

Em outro estudo comparativo entre os métodos colorimétricos e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) realizado em soro de sangue, os resultados mostraram maior precisão para o colorimétrico, com coeficientes de variação (CV) médios de 1,65 e 2,51 para o método colorimétrico e CLAE, respectivamente (Duncan *et al.*, 1979).

3.5.2 - Método enzimático

O procedimento enzimático foi recentemente desenvolvido usando colesterol oxidase (Karkalas *et al.*, 1982; Shen *et al.*, 1982; Dumain *et al.*, 1988). Porém, a enzima ataca o núcleo comum do esterol, acusando todo esterol como colesterol.

O método enzimático tem sido empregado largamente em laboratórios clínicos para determinação de colesterol em soro devido a sua simplicidade, segurança e relativa especificidade. Ele foi

testado para determinação de colesterol em leite, tecidos animais e gema de ovo.

Shen et al. (1982) determinaram o colesterol em gema de ovo, comparando este método com o de cromatografia gás líquida (CGL). O método por eles utilizado consistiu em duas reações enzimáticas, com colesterol oxidase e colesterol catalase, e uma reação com formação de cor amarela (leitura a 405 nm). Este demonstrou ser rápido, simples e preciso e os resultados obtidos foram semelhantes aos do método CGL.

Dumain et al. (1988) utilizaram a técnica enzimática de Shen et al. (1982) para a avaliação da quantidade de ovos adicionados em massas alimentícias, em comparação com a técnica CGL. A intensidade da coloração medida em 405 nm foi proporcional à quantidade de óxidos de esteróis. Os resultados obtidos por CGL foram sempre superiores aos encontrados pela dosagem enzimática, mas os altos valores foram atribuídos ao padrão interno usado e ao pequeno número de amostras analisadas por CGL.

3.5.3 - Métodos cromatográficos

Atualmente, têm sido empregados métodos cromatográficos para a determinação do colesterol em alimentos que permitam a separação de todos os esteróis.

Os principais métodos cromatográficos utilizados são: cromatografia gás-líquida (CGL) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A cromatografia em camada delgada é somente usada para a separação e identificação de esteróis e outros lipídios antes de sua determinação quantitativa.

3.5.3.1 - Cromatografia gás-líquida

Os métodos por CGL são considerados mais exatos e precisos que os procedimentos colorimétricos, devido a sua capacidade de separar colesterol dos interferentes.

O método da AOAC (1990) usa clorofórmio-metanol para extração dos lipídios, saponificação alcalina e extração dos insaponificáveis com benzeno-etanol. As condições cromatográficas são: coluna empacotada com 0,5% Apiezon L sobre 80-100 mesh Gás Chrom Q ou 1% SE-30 sobre 100-200 mesh Gás Chrom Q, detector de ionização de chama, injeção na coluna, 5 α -colestano como padrão interno e trimetilsilil para derivação.

Lillienberg & Svanborb (1976) empregaram três métodos: colorimétrico, enzimático e CGL para um estudo comparativo da determinação do colesterol no plasma. O método colorimétrico consistiu de extração com clorofórmio-metanol e reação de cor com cloreto férrico/ácido sulfúrico. O método para CGL utilizou detector de ionização de chama e 5 α -colestano como padrão interno. O procedimento utilizando CGL foi 12% menor que o colorimétrico, discrepância esta que poderia ser explicada pela presença de metabólitos do colesterol que interferiram na determinação colorimétrica.

Para Kaneda et al. (1980) não foi necessário pré-tratamento da matéria insaponificável na determinação do colesterol em alimentos por CGL. Os cromatogramas obtidos com esteróis livres mostraram resultados similares àqueles derivados com éter trimetilsilil e acetato. Utilizaram coluna empacotada com 5% SE-30 em Chromossorb W (80-100 mesh) lavada com ácido e silanizada e 5 α -colestano como padrão interno.

Karkalas et al. (1982), realizando estudo comparativo entre o método enzimático e CGL obtiveram resultados semelhantes. Para a CGL as etapas utilizadas foram: saponificação, extração e secagem. Usaram coluna empacotada com 3% OV-17 em Gás Chrom Q (100-200 mesh), detector de ionização de chama, 5 α -colestano como padrão interno e derivação não foi necessária. Ambos os métodos foram realizáveis e reproduzíveis para a determinação do colesterol em produtos animais, mas CGL foi recomendada para produtos que continham mistura de gordura animal e óleos vegetais.

Slover et al. (1983) descreveram um método para determinação simultânea de tocoferóis e esteróis em gorduras e óleo por CGL, com coluna capilar de Dexsil 400 e detector de ionização de chama. As principais etapas realizadas foram: saponificação, extração dos insaponificáveis com ciclohexano e derivação com éter trimetilsilil. Ocorreu separação individual dos tocoferóis e esteróis, embora picos interferentes foram vistos em algumas amostras, que para maior especificidade, necessitaram de uma purificação inicial. Entretanto, na maioria das amostras, a simples preparação foi suficiente.

Pie et al. (1990) utilizaram CGL para identificar e quantificar colesterol e óxidos de colesterol em manteiga, ovo em pó, tortas, e biscoitos amanteigados. Após extração dos lipídios, saponificação branda, separação das frações insaponificáveis em cromatografia de camada delgada, derivação com piridina-hexametildisilazano-triclorometilsilano (1:1:1), as amostras foram analisadas por CGL com coluna capilar de sílica fundida DB 5 com filme de 1,0 μ m, detector de ionização de chama e colestanol como padrão interno.

Alguns trabalhos que determinaram colesterol por CGL utilizaram saponificação da amostra seguida por extração dos insaponificáveis (saponificação direta). Utilizaram detector de ionização de chama e 5 α -coletano como padrão interno. Adans et al (1986) verificaram que eliminando a etapa inicial da extração, diminuíram o trabalho em 30% e consumiram menos solvente. Obtiveram resultados comparáveis ou ligeiramente maiores que os do método da AOAC nos produtos de carne analisados. Usaram coluna empacotada de 5% SP 2401 sobre 100-120 mesh Supelcoport e coluna capilar de sílica fundida com 5% fenil-metil-silicone, entrecruzado e derivação com trimetildileter. Resultados semelhantes foram relatados por Al-Hassani et al (1990) utilizando injeção na coluna, derivação com hexametildesilano e trimetilclorosilano e coluna de vidro empacotada com 0,5% Apiezon L sobre Gás Chrom a, 80-100 mesh. Van Elswyk et al (1991) determinando colesterol em ovos por saponificação direta, encontraram valores maiores (196 mg/ovo) do que por saponificação do extrato lipídico (132 mg/ovo). Os autores sugeriram que para a quantificação do valor absoluto do colesterol, saponificação direta parece ser o método mais exato. Coluna 3% SP 2401 sobre 100-120 mesh Supelcoport e derivação com trimetilclorosilano e hexametildisilano foram usadas. No entanto, Beyer et al (1989) não encontraram diferença significativa entre os resultados obtidos por saponificação direta e o método da AOAC em ovos e produtos com ovos, utilizando coluna capilar com 5% difenil e 95% dimetil polisilicone entrecruzado.

3.5.3.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Dos métodos cromatográficos empregados para determinação do colesterol, o mais moderno é CLAE. Na Tabela 4 encontram-se relacionados alguns trabalhos utilizando CLAE.

Avaliação comparativa dos métodos colorimétrico e de CLAE foi apresentada por Duncan *et al.* (1979), em soro de sangue. O método colorimétrico utilizado foi o de Abell-Kendal (1952) que usa como reagentes de cor anidrido acético, ácido sulfúrico e ácido acético. Os resultados obtidos indicaram que a precisão do método colorimétrico (cv médio = 1,65%) foi ligeiramente maior que a do CLAE (cv médio = 2,51%).

Hurst *et al.* (1985) utilizando saponificação direta como extração e cartucho Sep-pak para remover interferentes, encontraram um método exato e preciso, útil para o monitoramento de produtos.

Na metodologia empregada por Brown (1987), não houve diferença entre o tempo de retenção do estigmasterol e colesterol; sendo recomendada apenas para produtos que possuem um esteroide predominantemente. Após a extração dos lipídios do ovo, foi feita uma diluição com hexano e análise direta no CLAE.

Um outro estudo comparativo entre o procedimento colorimétrico e CLAE foi realizado por Beyer & Jensen (1989a) para determinar colesterol em ovos. Os resultados obtidos foram 10,97 mg/g e 13,86 mg/g para CLAE e colorimétrico, respectivamente, demonstrando que 17,5% dos cromógenos presentes na colorimetria eram devido a fração não-colesterol. CLAE poderia subestimar o conteúdo total de colesterol se ocorresse hidrólise incompleta dos ésteres durante a saponificação. Porém, foi demonstrado que a saponificação era completa sob as condições de análise. A meto-

dologia usada para CLAE foi baseada no método de Duncan et al. (1979). O procedimento de Zlatkis et al. (1953) modificado por Weiss et al. (1964) foi utilizado para determinação colorimétrica.

Csallany et al. (1989) inovaram filtração em membrana, eliminando assim etapas de limpeza e o tempo de análise. Utilizaram também, baixas temperaturas, evitando o risco da formação de artefatos por autooxidação do colesterol.

Goh et al. (1989) utilizaram colesterol oxidase na preparação da amostra para analisarem misturas de desmosterol, 7-desidrocolesterol e colesterol em material biológico. Quantidades de 10 pmoles de esterol puderam ser quantificadas nas condições de análise.

Jiang et al. (1991) compararam quatro métodos para determinação do colesterol em ovos: colorimétrico de Abell et al. (1952), enzimático de Jiang et al. (1990), CGL e CLAE. O método colorimétrico gerou valores 23% maiores que os demais métodos. Não ficou claro a causa dos altos valores, uma vez que os cromatogramas obtidos por CGL não mostraram picos referentes aos ácidos graxos livres e triacilgliceróis.

Tabela 4 - Trabalhos realizados com CLAE.

Referência	Material	Extração	Limpeza	Fase Móvel	Coluna	Detector	Recuperação
Beyer & Jensen (1989)	ovos	clorofórmio/metanol (2:1)	2% KOH/etanol abs. incubadas 37°C/1,5h	isopropanol/ acetonitrila (1:1)	C ₁₈ Fase reversa	UV-200nm	extração=95,1% saponificação= 96,3%
Jiang <u>et al.</u> (1990)	ovos	NR	2% KOH/etanol abs incubadas 50°C/60min	acetonitrila/ isopropanol (3:1)	C ₁₈ Supelcosil	UV-210nm	NR
Brown (1987)	gema de ovo seca	Goldfish	NR	0,75% isopropanol em hexano	Ultrasphere Si (Beckman)	UV-210nm	NR
Hurst <u>et al.</u> (1985)	massa com ovos	KOH metanólica 2N 30min refluxo	Sep-pak éter-etílico/ éter de petróleo	hexano/ isopropanol (99,9:0,1)	C ₁₈ Alltech	UV-205nm	massa/ovos=101% ovos secos=89%
Csallany <u>et al.</u> (1989)	músculo e tecidos de fígado	clorofórmio/metanol (2:1)	filtração em membrana	hexano/ isopropanol (97:3)	-Porasil Fase Normal	UV-206nm	colesterol=NR óxidos do colesterol = 85-93%
Duncan <u>et al.</u> (1979)	soro de sangue	NR	2% KOH/etanol abs. incubadas 45°C/60 min	isopropanol/ acetonitrila (1:1)	C ₁₈ Fase reversa	UV-200nm	reprodutibili- dade cv(X)=2,51
Goh <u>et al.</u> (1989)	materiais biológicos	NR	colesterol oxidase	metanol/ acetonitrila (1:1)	C ₁₈ Fase reversa	UV-240nm	sensibilidade= 10 pmoles

NR - não referenciado ou não realizado.

3.5.4 - Extração dos Lipídios

Pode-se dizer que a maioria dos métodos para determinação do colesterol começa com a extração dos lipídeos, com exceção daqueles que utilizam saponificação direta (Duncan et al., 1979; Hurst et al., 1985; Adams et al., 1986).

O colesterol é usualmente extraído dos materiais biológicos com solventes orgânicos. Os solventes utilizados são: acetona, éter etílico-etanol, acetona-álcool etílico absoluto, clorofórmio, etanol absoluto, acetona-metanol, acetona-etanol-éter, isopropanol, etanol-acetato-éter, benzeno ou hexano, metanol-clorofórmio (1:1), metanol-clorofórmio-água (2:1:3) e clorofórmio-metanol (2:1). As amostras podem ser agitadas com os solventes, refluxadas ou deixadas em repouso por um período de 24 horas (Sweeney & Weihrauch, 1976).

O procedimento do AOAC para a determinação da gordura, onde éter dietílico é empregado como solvente de extração, tem sido usado mais comumente para determinar o conteúdo de gordura em carnes e produtos de carne. Entretanto, os procedimentos empregando clorofórmio-metanol (2:1) como meio de extração são conhecidos por recuperar maior quantidade de lipídeos em vários alimentos (Hubbard et al., 1977). Resultados semelhantes foram obtidos por Rhee et al. (1988), que obtiveram com o procedimento de Folch et al. (1957) valores em média de 6,2% mais altos para amostras cruas e 13,4% mais altos para amostras cozidas quando comparadas com a extração por éter.

3.6 - Teores de colesterol

As discrepâncias nos valores de colesterol podem ser devidas à variedade das amostras coletadas. Entretanto, são atribuídas também, em grande extensão, à diferença dos procedimentos empregados (Bohac et al., 1988).

3.6.1- Em carne de frango

Kritchevsky & Tepper (1961) encontraram 93 mg/100g para carne de frango, usando o método colorimétrico de Mann (1961). Karkalas et al. (1982) determinaram o colesterol em várias partes de carne de frango cru e cozido, com o método por CGL. Um frango cru foi cortado ao meio longitudinalmente e metade foi cozida. Cada metade do frango cru e cozido foi dividido em asa, perna, pele, carne branca e carne escura para análise. Os resultados obtidos pelo método por CGL para carne de frango cru foram: pele (128 mg/100g), perna (90 mg/100g), carne branca (67 mg/100g), carne escura (107 mg/100g). Para carne cozida obtiveram: pele (73 mg/100g), perna (120 mg/100g), carne branca (80 mg/100g) e carne escura (92 mg/100g).

Em uma das poucas tabelas de composição química dos alimentos (Franco, 1982) existente no Brasil e utilizada pela maioria dos médicos e nutricionistas, encontram-se os seguintes valores de colesterol: carne de frango crua, 113 mg/100g; peito, 98 mg/100g; perna, 145 mg/100g; carne branca de galinha, 101 mg/100g; carne escura de galinha, 98 mg/100g e peito de galinha, 109 mg/100g. Estes valores entretanto, são obtidos de fontes estrangeiras não especificadas.

Hamm & Ang (1984) quantificaram colesterol, pelo método CGL da AOAC, em dez peitos de frangos grelhados com 7,9,10,11 e 12 semanas de idade. Os valores de colesterol para 7 e 12 semanas foram iguais (51 mg/100g) e os de 9,10 e 11 semanas foram muito mais baixos (34-37 mg/100g). Os autores admitiram que a discrepância poderia ser devido ao procedimento experimental empregado, uma vez que o CV da amostra retirada do mesmo extrato lipídico foi de 25%.

Labrador & Sangronis (1987) determinaram colesterol em alguns alimentos de amplo consumo na Venezuela, com o método colorimétrico de Abell et al. (1952). Para perna de frango encontraram 68,3 mg/100g e para peito 63,7 mg/100g.

Prusa & Lonergan (1987) relataram que os teores de colesterol em peito de frango cru foram similares na carne com pele (69,45 mg/100g) e sem pele (63,16 mg/100g). Amostras de pele continham mais colesterol (93,90 mg/100g). Em peso seco, a pele (205,22 mg/100g) e carne com pele (225,31 mg/100g) apresentaram menos colesterol quando comparadas com a carne somente (263,97 mg/100g), devido provavelmente ao baixo teor de umidade encontrado na pele. Peito de frango cozido e analisado com pele possui menor umidade e maior gordura e colesterol que o peito de frango cozido com pele e analisado sem pele. Peito de frango cozido com pele e analisado sem pele apresentaram teor de colesterol similar aos cozidos sem pele. O método colorimétrico empregado foi de Searcy & Bergquist (1960) e quatro amostras para cada tratamento foi utilizado.

3.6.2- Em carne suína

Reitmeier & Prusa (1987) observaram que o teor de colesterol para carne de porco crua foi maior com 18% e 23% de gordura. Os valores obtidos para carne com 4, 9, 18 e 23% de gordura foram respectivamente: 55,93; 57,49; 69,59 e 65,86 mg/100g. Valores semelhantes foram obtidos por Bohac & Rhee (1988) para diferentes músculos suínos: 55,9 mg/100g para lombo ("longissimus dorsi", 53,1 mg/100g para pernil ("semimembranosus") e 59,7 mg/100g para pernil ("semitendinosus"). Em outro trabalho de Bohac et al. (1988), os teores obtidos foram um pouco mais altos, sendo para lombo, 63,6 mg/100g e pernil, 55,7-67,6 mg/100g. Valores entre 56,3-71,3 mg/100g foram obtidos por Tu et al. (1967) para cinco músculos diferentes e 98 mg/100g por Kritchevsky & Tepper (1961) para carne de porco. Por outro lado, teores de colesterol bem mais baixos ($30 \pm 0,3$ mg/100g) foram obtidos por Csallany et al. (1989). Na Tabela de composição química dos alimentos de Franco (1982) encontram-se os seguintes valores: carne de porco crua, 102 mg/100g; carne de porco crua, média gordura, 198 mg/100g; alcatra, 368 mg/100g; costela, 74 mg/100g; costeleta, 105 mg/100g e carne de porco curada, 235 mg/100g.

Não foi observada diferença significativa no nível de colesterol entre carne de porco com diferentes níveis de gordura (Morgan et al., 1988), entre diferentes cortes (Heymann et al., 1990) e entre as várias temperaturas internas usadas no cozimento (Prusa & Hughes, 1986).

Valores de colesterol para carne cozida com diferentes níveis de gordura foram relatados por Morgan et al. (1988) que encontraram 80-91 mg/100g, e para carne cozida em diferentes temperaturas internas (71-77°C) por Prusa & Hughes (1986) que obtiveram

ram 56-78 mg/100g, respectivamente. Heymann et al. (1990) trabalhando com temperaturas internas de 65,6, 71,1, 76,7 e 82,2°C e com diferentes graus de gordura relataram os valores de 96 - 105 mg/100g. Resultados semelhantes (92 - 101 mg/100g) foram obtidos por Reitmeier & Prusa (1987), para diferentes níveis de gordura e temperaturas internas de 71 e 77°C.

Bohac & Rhee (1988) descreveram que a inclusão de 10 ou 20% de óleo de canola na dieta de suínos ou 20% de óleo de colza na dieta de bovinos não teve efeito significativo no conteúdo de colesterol no músculo. Relataram, ainda, que não houve diferença significativa no conteúdo de colesterol de músculos bovinos e suínos de três diferentes localizações anatômicas e, também, entre músculos bovinos e suínos.

3.6.3 - Em carne bovina

Valores de colesterol encontrados na literatura para contrafilé cru estão tipicamente entre 55-65 mg/100g de carne (Hood 1987). Rhee et al. (1982a) acharam valores de colesterol de 52-66 mg/100g, Eichhorn et al. (1986a) de 58,3 a 63,9 mg/100g, Hood & Allen (1971) de 46-57 mg/100g, Hoelscher et al. (1988) de 60,9 - 63,5 mg/100g e Wheeler et al. (1987) de 63,32 mg/100g. Tu et al. (1967) relataram que o conteúdo para vários músculos bovinos variaram entre 51,4 e 65,8 mg/100g, apresentando em média 58 mg/100g. Bohac et al. (1988) encontraram para contrafilé cru, 59,1 - 63,2 mg/100g e para coxão mole cru, 57,4-69,3 mg/100g. Bohac & Rhee (1988) obtiveram: contrafilé ("longissimus dorsi"), 56,0 mg/100g; coxão mole ("semimembranosus"), 58,5 mg/100g e largarto ("semitendinosus"), 56,7 mg/100g. Entretanto, valores para carne de vaca crua de 36 mg/100g (Stromer et al., 1966) e de 116

mg/100g de carne (Kritchevsky & Tepper, 1961) foram reportados. O baixo teor encontrado por Stromer et al. (1966) pode ser devido à extração insuficiente dos lipídios no músculo (Rhee et al. 1982b). Na tabela de composição química dos alimentos de Franco (1982), encontram-se os seguintes valores: carne de boi magra, 123 mg/100g e carne de boi média gordura, crua 289 mg/100g.

Rhee et al. (1982a) obtiveram 77-87 mg/100g e 86-92 mg/100g para contrafilé cozido nas temperaturas internas de 60°C e 70°C, respectivamente. As amostras cozidas não mostraram diferença significativa no conteúdo de colesterol em relação a qualquer quantidade de gordura intramuscular estudada. Hoelscher et al. (1988) encontraram valores de 74,4-84,5 mg/100g e Wheeler et al. (1987) de 80,27 mg/100g.

Estudos iniciais do teor de colesterol em carnes mostraram que não havia consenso quanto à distribuição do colesterol em tecido muscular e tecido adiposo. Por exemplo, Stromer et al. (1966) relataram que o contrafilé da carne bovina continha 36-46 mg de colesterol por 100 g de tecido cru e que o tecido adiposo subcutâneo continha 113-150 mg de colesterol/100 g de tecido. Entretanto, Reiser (1975) calculou valores de colesterol com base no peso seco e baseado em calorias, resultando em colesterol na carne magra de 2 a 6 vezes maior do que na gordura. Rhee et al. (1982b) constataram que, quando expresso em termos do peso do tecido como consumido, a gordura tinha mais colesterol do que a carne magra (150%). Valores de 108,2 mg/100g de gordura intermuscular, 114,3 mg/100g de gordura subcutânea e 62,4 mg/100g de tecido muscular foram encontrados, quando cru. Hoelscher et al. (1988) obtiveram 60,9-63,5 mg/100g para tecido muscular e 113,5-121,2 mg/100g para tecido adiposo. Eichhorn et al. (1986b)

afirmaram que o tecido adiposo continha em torno de duas vezes mais colesterol que tecido muscular. Para Hood (1987) a média de colesterol para contrafilé separado da gordura subcutânea ($55,7 \pm 2,12$ mg/100g) foi significativamente menor que no tecido adiposo intramuscular ($97,3 \pm 9,1$ mg/100g) e no tecido adiposo subcutâneo ($94,1 \pm 9,7$ mg/100g). No entanto, quando a quantidade de lipídios muscular era baixa, o conteúdo de colesterol foi alto. Hoelscher *et al.* (1988) relataram que nos tecidos musculares, 60-80% do colesterol está localizado nas membranas e 20-40% como componentes de estocagem. Nos tecidos adiposos, a membrana continha 8-12% do colesterol total enquanto a fração de estoque contém 88-92%. Cozimento causou uma significativa troca na distribuição do colesterol entre membrana e tecidos de estocagem no tecido adiposo.

Rhee *et al.* (1982a) demonstraram que para contrafilé cru, não houve diferença significativa entre diferentes quantidades de gordura, exceto para aqueles completamente sem gordura, que apresentaram significativamente menos colesterol. Hoelscher *et al.* (1987) concluíram o mesmo, trabalhando com tortas de carne (cruas e cozidas). Houve entretanto, um aumento significativo no conteúdo de colesterol nas tortas de carne bovina com 30% de gordura.

Eichhorn *et al.* (1986b) relataram que o tipo de raça e dieta não afetaram significativamente o conteúdo de colesterol no tecido muscular, dos grupos estudados. Wheeler *et al.* (1987) acharam o mesmo para dias de dieta, tipo de raça e sexo.

3.6.4- Em ovos

O ovo de galinha é uma fonte rica de colesterol na dieta humana e, portanto, recentemente os conteúdos de colesterol em gemas têm sido reportados: 1528 a 1830 mg/100g (Oguntona & Hughes,

1988), 1097 mg/100g (Beyer & Jensen, 1989a), 1200 a 1360 mg/100g (Ingr et al. 1987), 1862 mg/100g (Kritchevsky & Tepper, 1961) e 1237 e 1240 mg/100g (Shen et al., 1982). Franco (1982) registra 463 mg/100g para ovo de galinha e 1550 mg/100g para gema de ovo crua.

O nível de colesterol nos ovos varia de acordo com muitos fatores como a estação do ano, a linhagem, o sistema de alimentação, produção dos ovos e idade das aves (Smolińska & Trziszka, 1982 e Pandey et al., 1989).

O conteúdo de gordura no alimento das galinhas poedeiras estimula um incremento no conteúdo de colesterol nas gemas, sendo que efeitos de diferentes gorduras foram variáveis (Sim & Bragg, 1977; Bartov et al., 1971; Teekell et al., 1975). O aumento na proporção de fibras no alimento das aves decresceu o conteúdo de colesterol na gema. O colesterol da gema diminuiu 4,39; 10,38 e 13,29% quando alimentadas com 4,41; 6,68 e 8,79% de fibra bruta em relação a milho-soja contendo 2,05% de fibra bruta. Colesterol na gema do ovo de galinhas poedeiras foi significativamente diminuindo com dietas de alfafa, aveias, girassol, arroz moído ou raspas de madeira quando comparadas com dieta básica. A maior redução foi achada pela alimentação com aveia ou raspas de madeira (McNaughton, 1978). Entretanto, a adição de 10, 20 e 30% de semente moída de linho na dieta não afetou o teor de colesterol dos ovos (Caston & Leeson, 1990).

A adição de lovastatina (inibidor da hidroximetilglutaril-Coenzima A redutase) na dieta das aves poedeiras baixou significativamente o conteúdo de colesterol nas gemas (Elkin & Rogler, 1990).

Kicha et al. (1979) encontraram valores de colesterol em gema entre 1340-1458 mg/100g para diferentes linhagens. Em todas as galinhas, a alta produção de ovos foi associada com decréscimo no valor de colesterol nas gemas. Semelhante conclusão foi obtida por Ingr et al. (1987). Para Bartov et al. (1971) existiu variação significativa na concentração do colesterol da gema dos ovos de diferentes aves. Ovos de uma mesma galinha mostraram constância no nível de colesterol.

Al-Zubaidy & Al-Taha (1984) mostraram que ovos produzidos por aves jovens apresentaram menor teor de colesterol do que os ovos produzidos por aves com mais idade (1772 mg/100g de gema na 1^o semana de produção e 2171 mg/100g de gema após 44 semanas de produção). A concentração de colesterol foi diretamente proporcional ao tamanho dos ovos.

Bitman & Wood (1980) determinaram a concentração de colesterol em ovos de 14 espécies de aves, que variaram de 1300 a 2500 mg/100g de gema. Riad et al. (1981) encontraram os valores de 1196, 1418, 1567 e 1927 mg/100g de gema para quatro espécies de aves (pato, peru, galinha e codorna, respectivamente).

Beyer & Jensen (1989a) conduziram um estudo comparativo para avaliar o conteúdo do colesterol em ovos, entre o método por CLAE e o colorimétrico de Zlatkis et al. (1953) modificado por Weiss et al. (1964). O método CLAE resultou em 1097 mg/100g de gema comparado com 1386 mg/100g pelo método colorimétrico. A separação do colesterol da fração da gema insaponificável por CLAE revelou que 17,5% dos cromóforos presentes na análise colorimétrica foram da fração não-colesterol.

Em outro estudo, Beyer & Jensen (1989b) determinaram o colesterol em ovos pelo método CLAE, obtendo como média o valor de 195 mg/ovo ou 1170 mg/100g de gema, que foi substancialmente menor que os encontrados nas tabelas de composição do ovo.

3.6.5 - Em massas com ovos.

O colesterol encontrado nos ovos tem servido de parâmetro de qualidade no controle das massas que contém ovos. A resolução 12/78 da CNNPA-MS estabelece três ovos por kg de massa que corresponde a 0,450 g de colesterol por kg de massa. A metodologia oficial utilizada pelos laboratórios de fiscalização é a colorimétrica que gera muita controvérsia, uma vez que não é específica para o colesterol, mas para qualquer esterol presente. Outras substâncias que tenham o núcleo do esterol também podem ser detectadas, superestimando desta forma o resultado final. O método utilizado na fiscalização também assume que os ovos contém uma concentração definida e constante de colesterol.

Hurst et al. (1985) usaram CLAE para determinar o conteúdo de colesterol em massas com ovos como um indicador de ovos sólidos. A média obtida de colesterol para massas com ovos foi 0,77 mg/g. Os conteúdos de colesterol para massas com 5,5% de ovos sólidos foram determinados e os resultados obtidos confirmaram 5,59% de ovos sólidos.

Kovacs (1990) propôs o método CGL para a determinação do colesterol e alguns esteróis de planta como campesterol, β -sitosterol e avenasterol, em produtos de massa, comparando-o com dois métodos da AOAC. Os teores de colesterol para os métodos da AOAC resultaram em 42,8 mg/100g e 55,0 mg/100g de massa, respectivamente enquanto que o de CGL obteve 61,2 mg/100g de massa.

Dumain et al (1988) demonstraram a aplicação do método enzimático para dosagem do colesterol em massa, em estudo comparativo com o método de CGL. Obtiveram pelo método enzimático e CGL, respectivamente: 895 mg/kg e 960 mg/kg para macarrão com três ovos/kg e 1145 mg/kg e 1296 mg/kg para macarrão com cinco ovos/kg. Por outro lado, Fombuena (1987) obteve valores superiores aos teóricos usando o método enzimático, devido à falta de especificidade da metodologia empregada.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Materiais

As amostras foram compradas em diferentes açougues e supermercados de Campinas, ao acaso.

4.1.1 - Amostras de carne de frango

Foram analisadas 15 amostras de frango cru de três marcas diferentes, sendo 5 amostras de cada marca. Além disso, 8 amostras pareadas foram analisadas cruas e assadas. Cada amostra de frango foi separada em carne branca, carne escura e pele. Todas as porções foram trituradas num processador de carne para a obtenção de uma massa homogênea.

4.1.2 - Amostras de carne suína

Foram analisados os seguintes cortes de carne suína: 13 amostras de bisteca, 12 amostras de lombinho, 10 amostras de pernil e 10 amostras de toucinho. De cada corte, 5 amostras pareadas foram analisadas cruas e assadas. As amostras cruas, pesando aproximadamente 1 kg, foram trituradas num processador de carne até a formação de uma massa homogênea. As amostras pareadas, pesando aproximadamente 1 kg, foram divididas em duas partes iguais. Uma parte foi triturada num processador de carne para a obtenção de uma massa homogênea, e a outra foi submetida a tratamento térmico (assada ou frita) antes de ser triturada.

Os cortes de bisteca, lombinho e pernil foram temperados com sal e alho (tempero completo) e assados em forno comum, a 200°C, durante 45 min. As amostras de toucinho, sem o couro, foram cortadas em cubos e fritas em fogo brando por um período de 15 min. Com o intuito de reproduzir o hábito geral dos consumidores a gordura externa das carnes não foi retirada.

4.1.3 - Amostras de carne bovina

Foram escolhidos cinco cortes que representam diversas localizações anatômicas (dianteiro, trazeiro), variação no teor de gordura (carne gorda e carne magra) e preços diferentes. Oitenta por cento da população consome contrafilé e coxão mole.

Foram analisadas 5 amostras cruas para cada um dos seguintes cortes: coxão mole, coxão duro e peito. Foram analisadas também, 5 amostras pareadas cruas e assadas de contrafilé e de músculo. As amostras cruas, pesando em torno de 1 kg, foram trituradas num processador de carne até obtenção de uma massa homogênea. Os cortes de contrafilé e músculo, pesando aproximadamente 1 kg, foram divididas em duas partes iguais. Uma parte foi triturada num processador de carne como as anteriores e a outra foi submetida a um tratamento térmico. O contrafilé cortado em bifês foi assado em chapa quente ao ponto e o músculo foi cozido em água quente em panela de pressão por 45 min, como normalmente é consumido. A gordura existente, tanto nas amostras cruas como nas amostras cozidas, não foi retirada.

Para análise das amostras de carne foi tomada uma alíquota de 10 g, em duplicata.

4.1.4 - Amostras de ovos

Foram analisadas vinte amostras de ovo, sendo dez de ovo com casca branca e dez de ovo com casca vermelha em duplicata. Para cada amostra, foram misturadas apenas as gemas de três ovos. Os pesos totais (clara + gema) foram anotados.

4.1.5 - Amostras de massas com ovos

Foram analisadas cinco amostras de massa com ovos em duplicata, de cinco marcas diferentes. As amostras foram trituradas num moinho até a obtenção de um pó que passasse por um tamis de 40 mesh.

Na tentativa de reconfirmar a confiabilidade dos dados foi preparada uma massa caseira com 3 ovos, 1 kg de farinha e 200 ml de água. Após secagem a 100°C por 1 hora a amostra foi triturada como as anteriores e analisada em triplicata.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Para amostras de carnes

A determinação da umidade foi feita segundo o método da AOAC pesando 2 g de amostra e deixando 16-18 horas em estufa a 100°C até peso constante.

A metodologia utilizada para a determinação de colesterol em carne foi baseada no trabalho de Bohac et al. (1988).

Esta metodologia foi adaptada às condições do laboratório, de acordo com a Figura 4.

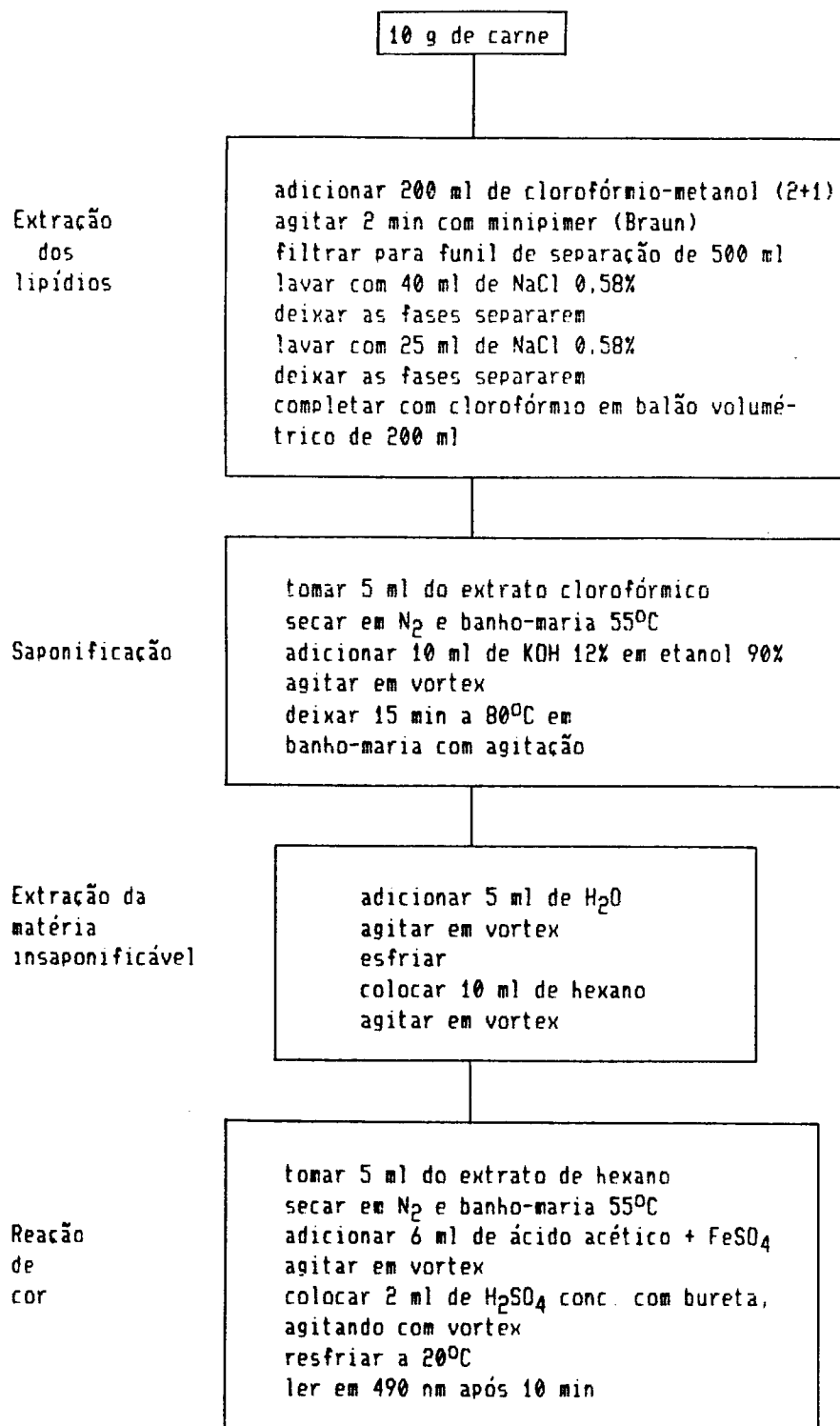


Figura 4 - Fluxograma para determinação de colesterol em carnes.

A extração dos lipídios foi feita segundo Folch et al. (1957) e Hubbard et al. (1977). A partição entre clorofórmio-metanol (2:1) e NaCl 0,58% foi realizada com a finalidade de remover os contaminantes não lipídicos contidos no extrato

A reação de cor foi de acordo com o método de Searcy & Bergquist (1960). A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro Carl-Zeiss com monocromador M4QIII-91287 e amplificador PM-QII-86743.

4.2.2 - Para amostras de ovos

As gemas dos ovos foram homogeneizadas e os lipídios foram extraídos de acordo com Folch et al. (1957) e Hubbard et al. (1977). Uma alíquota de 2 g com 40 ml de clorofórmio-metanol (2:1) foi agitada em minipimer (Braun) por 2 min. O extrato clorofórmio-metanólico foi passado para um tubo de centrifuga, adicionado de 8 ml de NaCl 0,58% e agitado levemente. Após centrifugar por 10 min a 2500 rpm, a fase sobrenadante foi retirada por sucção e o extrato foi transferido para um balão volumétrico de 50ml e o volume completado com clorofórmio. O extrato clorofórmico foi usado para análise do colesterol por 2 métodos: para o colorimétrico segundo Bohac et al. (1988) e para o método por CLAE.

4.2.2.1 - Método colorimétrico segundo Bohac et al.

A metodologia utilizada foi a mesma que em 4.2.1, variando apenas no volume das alíquotas tomadas, como mostra a Figura 5.

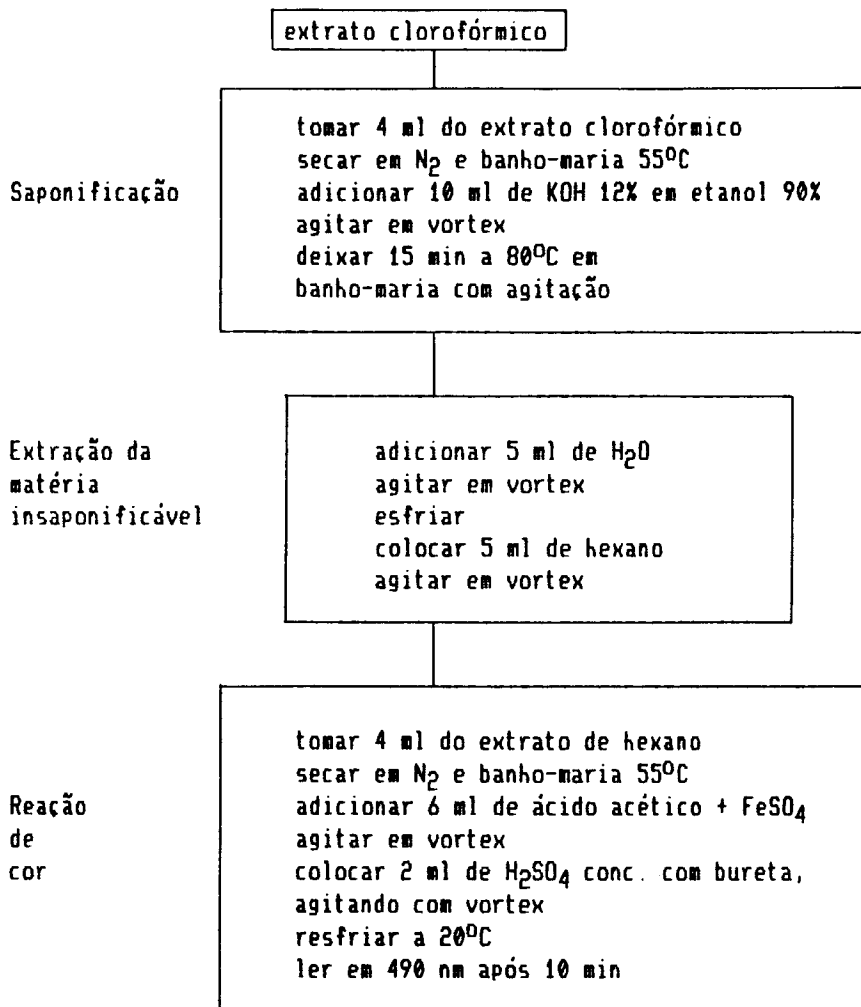


Figura 5 - Fluxograma para determinação de colesterol em ovos, segundo Bohac *et al.*

A medida de absorbância foi feita em um espectrofotômetro Perkin-Elmer computadorizado lambda-6. A curva padrão foi feita de 0 a 900 μg de colesterol purificado demonstrando linearidade na faixa das amostras analisadas.

4.2.2.2 - Método colorimétrico segundo Instituto Adolfo Lutz (IAL)

O método colorimétrico descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985) (Figura 6) é o indicado e seguido pelos laboratórios oficiais na fiscalização de alimentos.

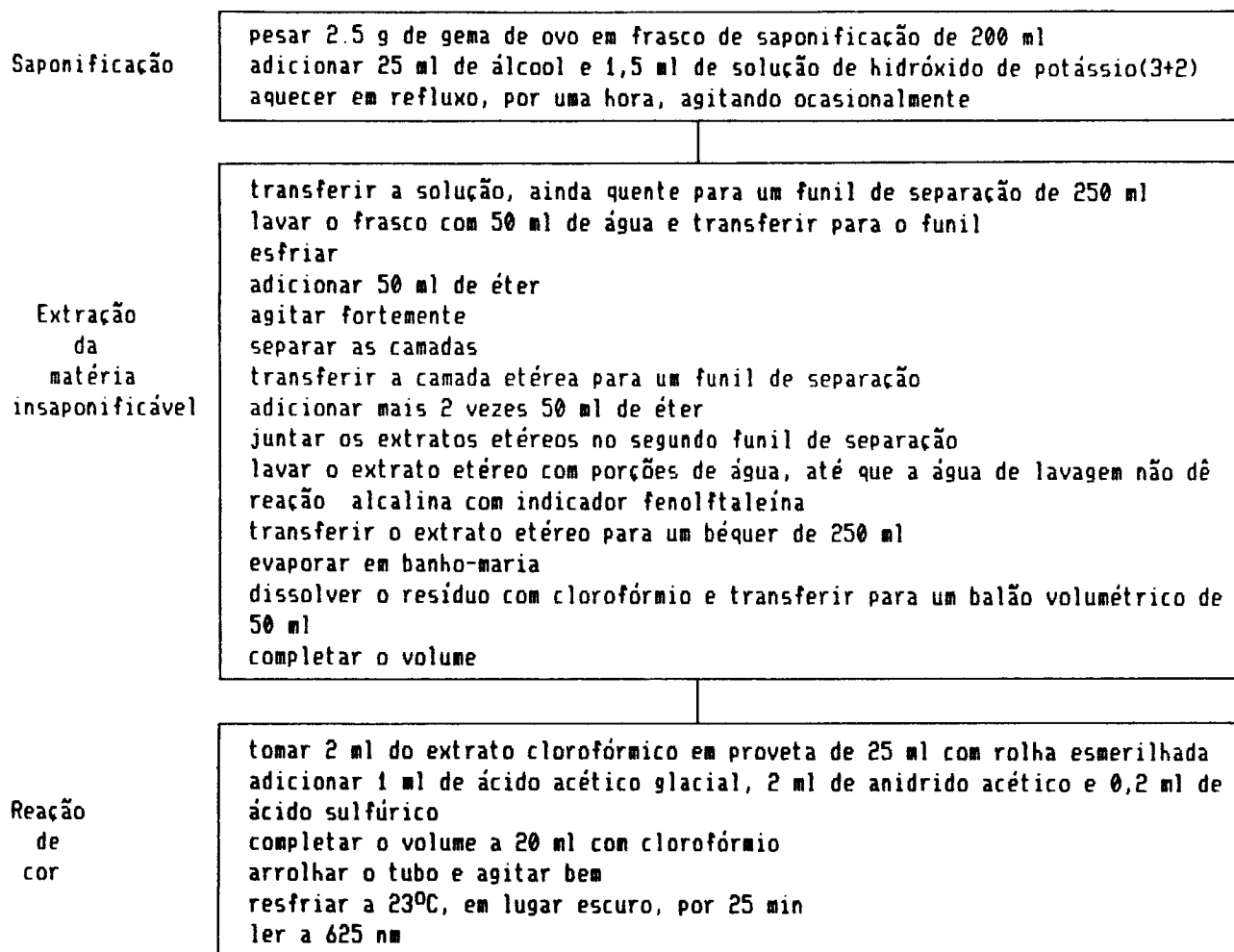


Figura 6 - Fluxograma para determinação de colesterol em ovos, de acordo com IAL.

A medida da absorbância foi feita em um espectrofotômetro Perkin-Elmer computadorizado lambda-6. A curva padrão foi feita com colesterol Sigma no intervalo de 0 a 100 mg/L.

4.2.2.3 - Método por CLAE

A metodologia utilizada foi baseada na de Duncan et al. (1979) e Beyer & Jensen (1989a), com modificações. A saponificação foi feita segundo Bohac et al. (1988). A Figura 7 mostra a sequência das etapas.

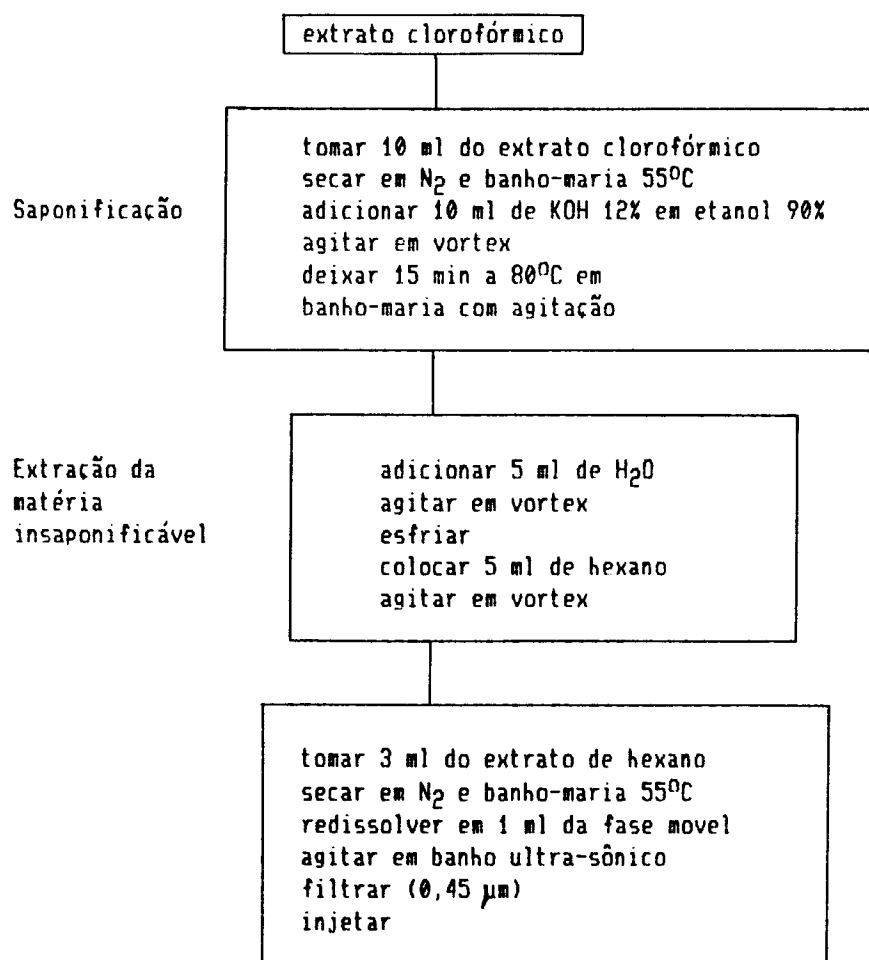


Figura 7 - Fluxograma para determinação de colesterol em ovos por CLAE

Foi utilizado um cromatógrafo marca Varian, com injetor Varian modelo 9010 Solvent Delivery System adaptado com "loop" de amostra de 10 µl, detector Varian modelo 9065 Polichrom computadorizado com detector conjunto de diodos 190-367 nm acoplado com video 300A Amdek, integrador Varian modelo 4400, e registrador Hewlett-Packard modelo 2225 D+. A coluna utilizada foi Spherisorb ODS-1, 5 µm (150 x 4,6 mm) (Alltech), precedida por coluna de guarda C₁₈ Micropak MCH-10, 10 µm de 3 cm. A fase móvel foi acetoneitrila-isopropanol (50:50) num fluxo de 1,2 ml/min com pressão de 73 atm. Todos os solventes usados foram grau cromatográficos.

filtrados ($0,45 \mu\text{m}$) e degasseificados antes do uso. O pico do colesterol foi monitorado a 205 nm. Aliquotas do extrato do ovo foram secadas em N_2 , redissolvidas em 1 ml de fase móvel e filtradas ($0,45 \mu\text{m}$) antes da injeção no cromatógrafo líquido. A identificação dos picos foi feita por comparação dos tempos de retenção do padrão e da amostra, complementado pelo espectro obtido pelo detector conjunto de diodos. Para a quantificação dos picos utilizou-se o método do padrão externo. Os níveis utilizados para a curva padrão foram entre 5 e 40 $\mu\text{g}/\text{injeção}$ (10 μl).

Alguns testes preliminares foram feitos para escolha da fase móvel e da coluna C_{18} fase reversa. Foram testadas as seguintes fases móveis: acetonitrila:metanol (50:50), acetonitrila:metanol (60:40), hexano:isopropanol (99:1) e acetonitrila:isopropanol (50:50). Foram testadas também duas colunas C_{18} , uma de 30 cm ($10 \mu\text{m}$) e a outra de 15 cm ($5 \mu\text{m}$), ambas da Alltech. A melhor separação do colesterol foi conseguida com acetonitrila:isopropanol (50:50) e com coluna de C_{18} de 15 cm ($5 \mu\text{m}$).

4.2.3 - Para amostras de massas com ovos

Foi feito um estudo comparativo entre os métodos colorimétricos do IAL e de Bohac et al. e o método de CLAE desenvolvido.

4.2.3.1 - Método colorimétrico do IAL

Para massas com ovos, o IAL (1985) recomenda o seguinte procedimento (Figura 8):

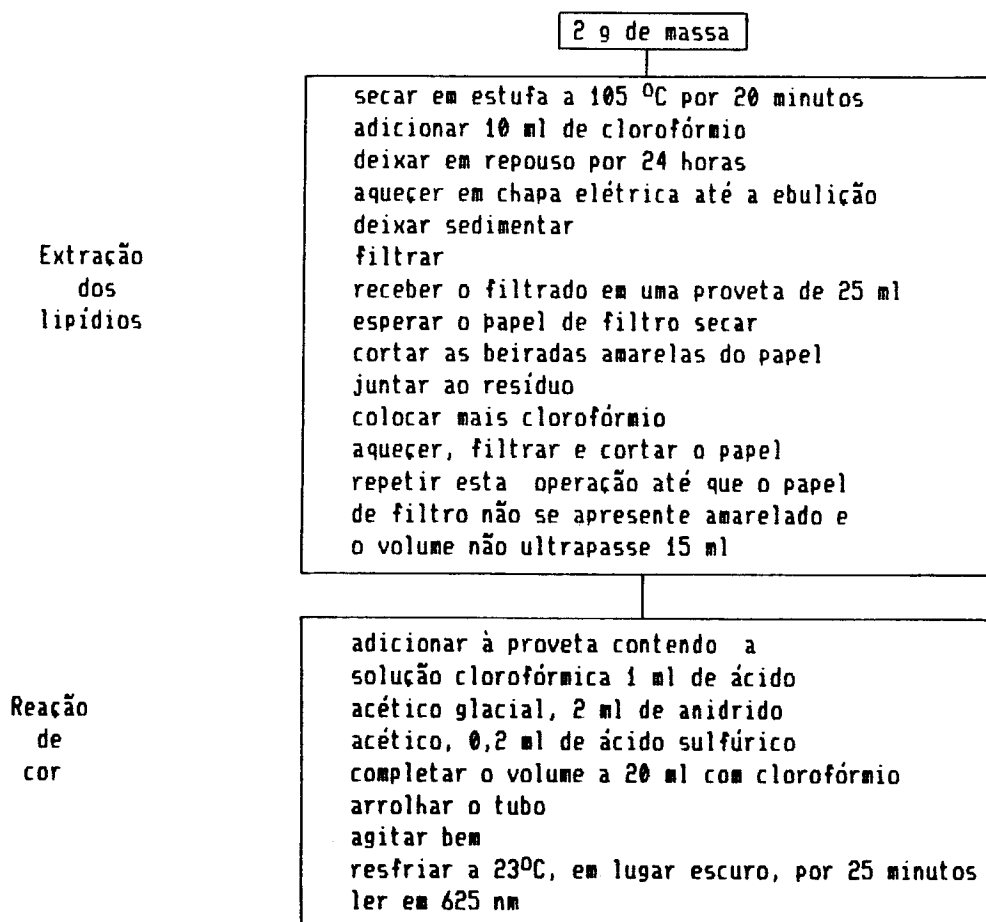


Figura 8 - Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos, segundo IAL.

A medida da absorbância foi feita em um espectofotômetro Perkin-Elmer computadorizado lambda-6. A curva padrão foi feita entre 0 e 100 mg/L, com colesterol Sigma

4.2.3.2.- Método Colorimétrico segundo Bohac *et al*.

A metodologia utilizada foi a mesma que para ovos (4.2.2. e 4.2.2.1.), com variações no volume das aliquotas tomadas, como mostra a Figura 9.

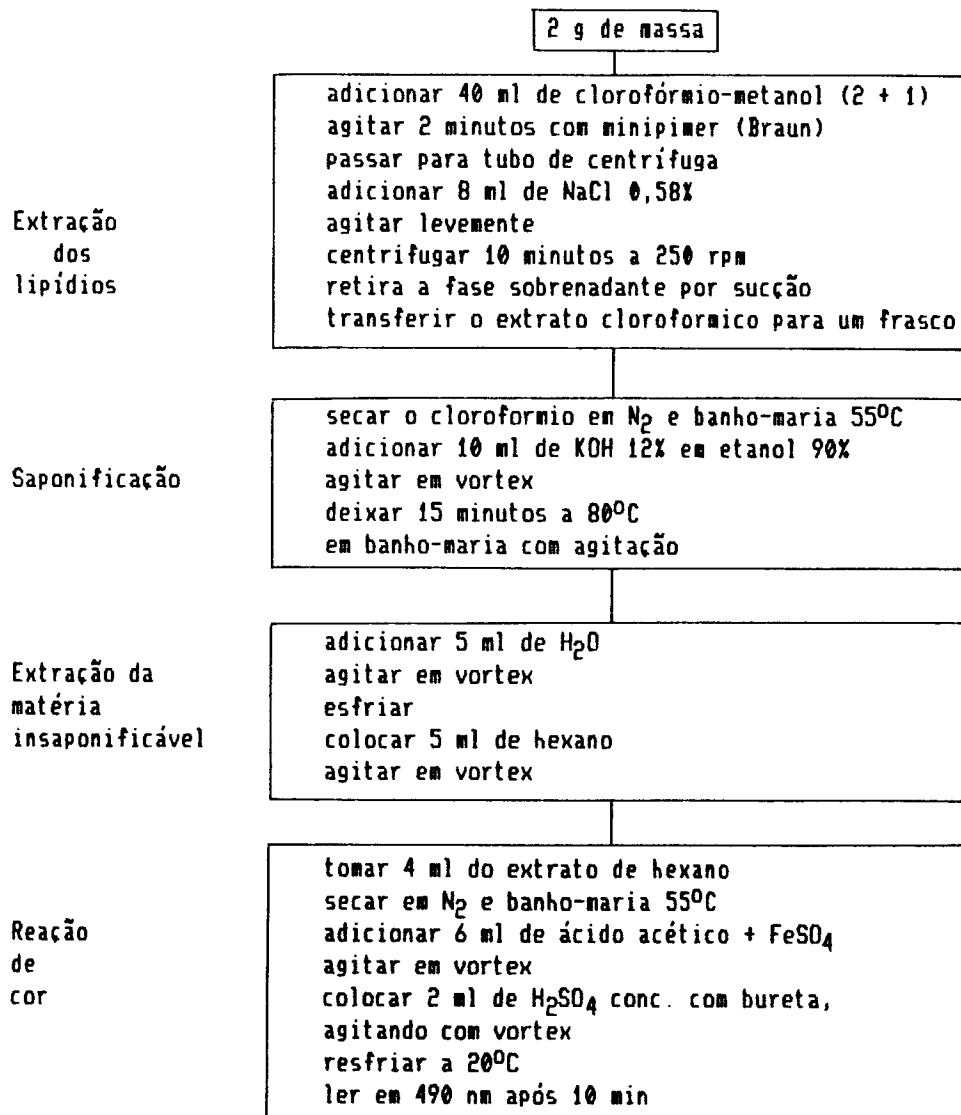


Figura 9 - Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos, segundo Bohac et al

4.2.3.3 - Método por CLAE

A extração dos lipídios foi feita semelhante a do método colorimétrico do IAL. A saponificação foi de acordo com Bohac et al (1988). A Figura 10 mostra a sequência de etapas.

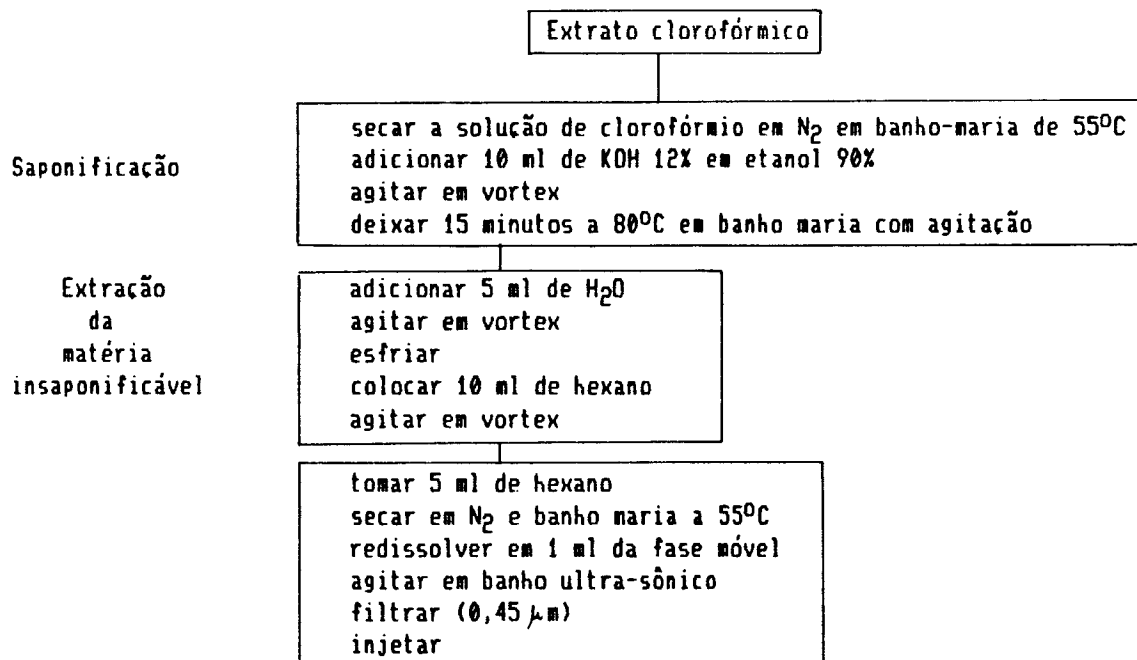


Figura 10 - Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos por CLAE.

Foram testadas as seguintes proporções da fase móvel acetoneitrila:isopropanol, 50:50; 60:40; 65:35; 70:30; 75:25 e 80:20. A melhor separação foi obtida com a proporção 75:25.

O cromatógrafo líquido utilizado e as condições cromatográficas foram as mesmas que as descritas em 4.2.2.3, com exceção da fase móvel.

4.3 - Análise estatística

Foi realizada análise de variância de um ("one-way") fator, com auxílio do Software MICROSTAT. A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Avaliação do método colorimétrico para carne

O método utilizado para carnes é simples, comparativamente barato e não requer aparelhos especiais, portanto, é possível de ser usado por laboratórios nacionais. No entanto, os resultados são facilmente afetados por pequenas mudanças na execução, necessitando uma padronização das condições de análise.

A reação de cor requer certos cuidados para que se tenha boa repetibilidade, tais como: 1) adicionar o ácido acético e resfriar à 20°C; 2) adicionar o ácido sulfúrico concentrado por meio de uma bureta sobre o ácido acético em agitação; 3) resfriar à 20°C por 10 minutos.

A repetibilidade do método não foi adequada inicialmente, sendo necessário vários testes. Foram estudados o tempo de reação e o comprimento de onda da leitura.

A variação da absorbância em relação ao tempo de reação de 5, 10, 15 e 20 min pode ser apreciada nas Figuras 11 e 12. Observou-se que as absorbâncias diferiram ligeiramente durante o período da reação estudado. No entanto, em 490 nm apresentaram-se muito próximas, quase sobrepondo-se, confirmando ser este o melhor comprimento de onda da leitura.

A eficiência da extração do colesterol foi verificada submetendo-se o resíduo a uma segunda extração. Como não ocorreu formação de cor, evidenciou-se, assim, a eficiência da primeira extração.

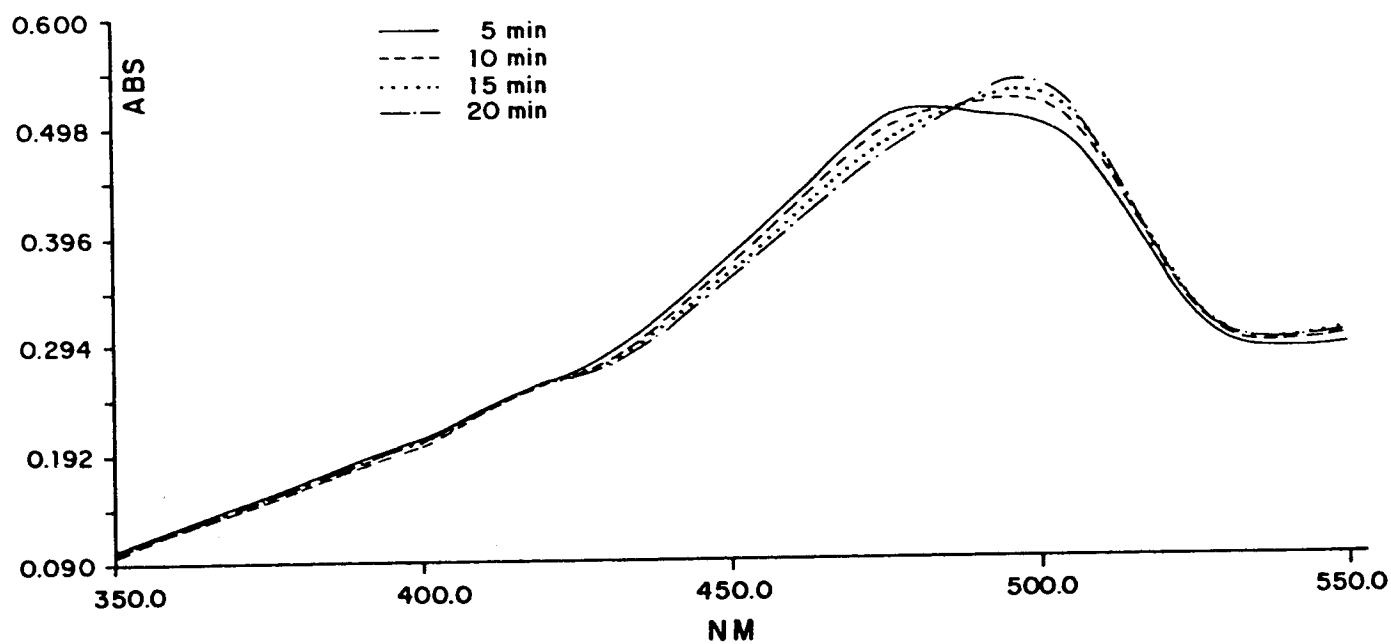


Figura 11 - Espectros de absorvância do colesterol após 5, 10, 15 e 20 min de reação com ác. acético / $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ (350-550 nm).

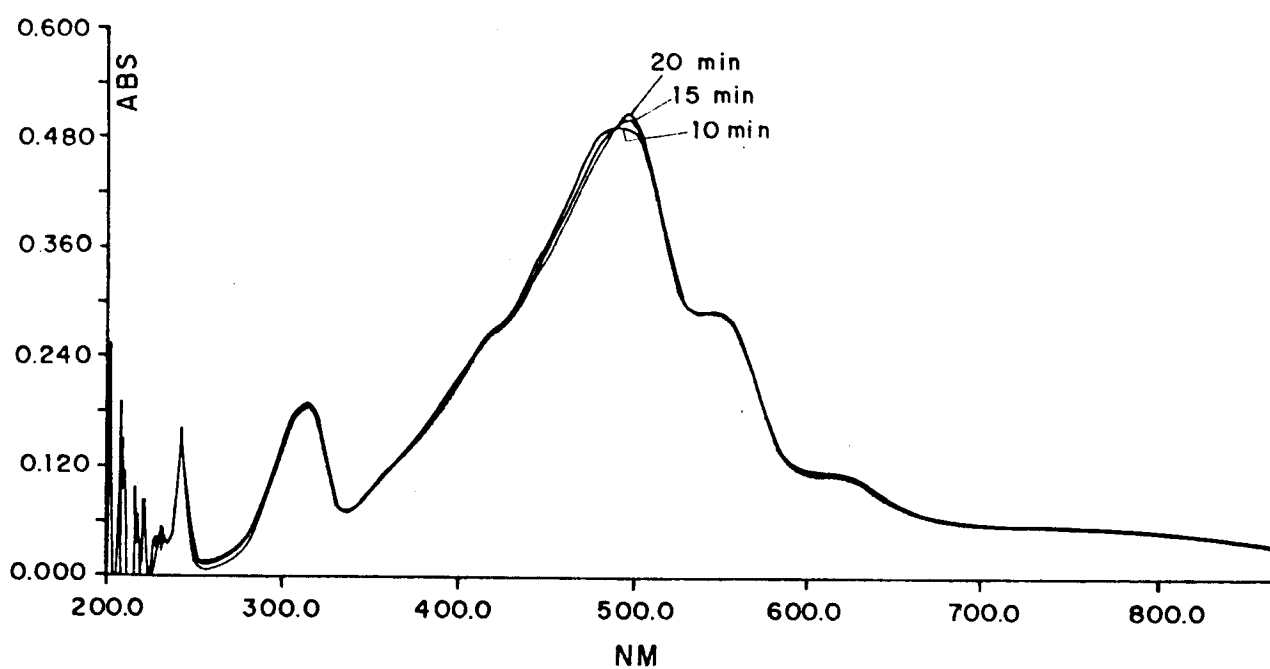


Figura 12 - Espectros de absorvância do colesterol após 10 , 15 e 20 min de reação com ác. acético / $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ (200-900 nm).

Para a construção da curva padrão, de 0 a 400 μs de colesterol purificado foram submetidos à saponificação e à etapa de desenvolvimento de cor. Com as diluições, a concentração final de colesterol foi de 0 a 200 μg , respectivamente. A curva padrão demonstrou linearidade na faixa das amostras analisadas (Figura 13).

O teste de recuperação foi feito em amostras de carne branca de frango, adicionando-se quantidades conhecidas de colesterol purificado no extrato clorofórmio:metanol (2:1). A recuperação obtida foi de 90 a 100% (Tabela 5).

Tabela 5 - Recuperação do colesterol adicionado em carne branca de frango.

Amostras	Colesterol adicionado (mg/100g)	Conc. média de colesterol (mg/100g)*	Recuperação (%)
Controle	0	53	-
A	25	78	100
B	50	97	94
C	75	115	90
D	100	143	94

*Média de análises em duplicata.

Segundo Bohac et al. (1988), é importante que na etapa da saponificação seja adicionado um antioxidante (PG, BHT ou pirogalol) para evitar a oxidação de certos compostos no extrato lipídico da carne, os quais serão extraídos pelo hexano. Verificou-se no presente trabalho, no entanto, que os antioxidantes poderiam interferir na reação de cor, superestimando os resultados (Tabela 6). Optou-se, então, por não adicionar antioxidante.

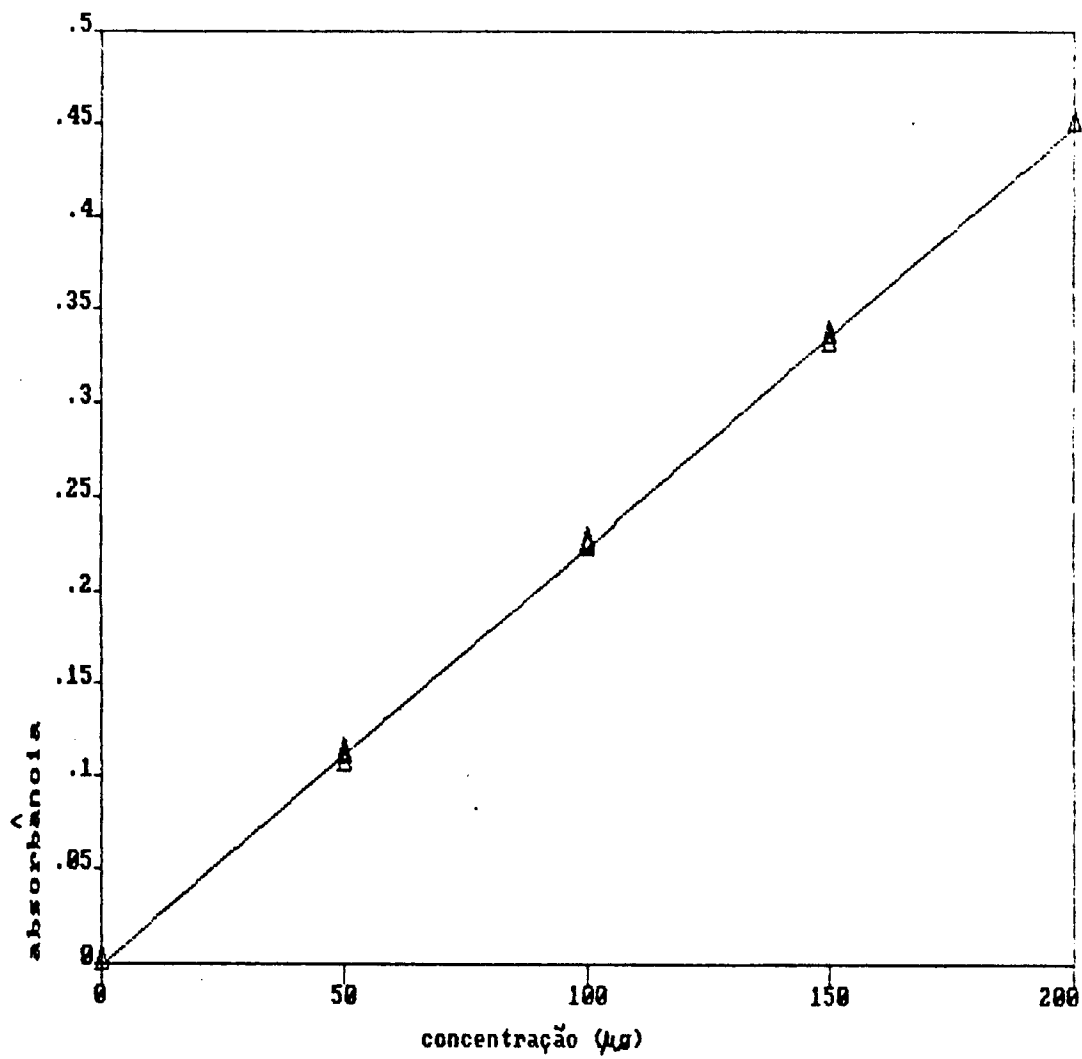


Figura 13 - Curva padrão do colesterol reagido
com ác. acético / $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$, em 490 nm.

Tabela 6: Efeito dos antioxidantes adicionados na etapa da saponificação

Antioxidante	Concentração de colesterol em carne de frango (mg/100g)	
	Carne Branca	Carne Escura
Sem antioxidante	56	66
BHT(0,5ml de BHT 0,01%)	51	70
PG(1,5ml de PG 0,01%)	58	67
	52	70
	66	69
	61	74

BHT-butil-hidroxitolueno; PG-galato de propila

5.2 - Teores de colesterol em carne de frango

Os valores de colesterol obtidos para carne de frango crua encontram-se na Tabela 7. A carne branca apresentou menor concentração de colesterol (58 ± 10 mg/100g), seguida da carne escura (80 ± 9 mg/100g) e da pele (104 ± 5 mg/100g). Os resultados estão de acordo com Prusa & Lonergan (1987) que obtiveram 63,16 mg/100g para peito e 93,90 mg/100g para pele. Teores de 63,7 mg/100g para peito foram relatados por Labrador & Sangronis (1987). Valores de 67 mg/100g para carne branca, 90 mg/100g para carne escura e 128 mg/100g para pele foram encontrados por Karkalas et al. (1982). Resultados diferentes estão referenciados na Tabela de Franco (1982) que apresenta 98 mg/100g para carne escura e 101 mg/100g para carne branca. Os teores de colesterol em base seca obtidos por Prusa & Lonergan (1987) foram 225,31 mg/100g para peito e 205,22 mg/100g para pele. Os nossos valores foram em média de 242 ± 41 mg/100g para carne branca, 344 ± 36 mg/100g para carne escura e 190 ± 10 mg/100g para pele.

Em relação às marcas A, B e C, notou-se pequenas variações (Figura 14) devido, provavelmente, as diferenças de linhagem e alimentação. Não existiu diferença significativa a nível de 5% na porção de pele crua, base úmida e seca, entre as três marcas, mas existiu diferença significativa a nível de 5% entre as marcas de carne branca crua, em base úmida e seca. Esta diferença deve-se à marca A, uma vez que houve diferença significativa a nível de 5% entre as marcas A e B, A e C e não entre B e C. A carne escura apresentou maior variação. Em base úmida existiu diferença significativa entre as três marcas a nível de 5% porém, não existiu diferença a nível de 1% entre a marca A e B, B e C. Quando o colesterol foi calculado em base seca, existiu diferença significativa a nível de 5% entre as três marcas e esta diferença deve-se à marca A, uma vez que existiu diferença significativa a nível de 5% entre a marca A e B, A e C e não entre B e C.

Tabela 7- Concentração de colesterol em carne de frango crua de diferentes marcas.

Porção analisada	Concentração de colesterol (mg/100g)							
	marca A		marca B		marca C		Geral	
	faixa	média* ± DP	faixa	média* ± DP	faixa	média* ± DP	faixa	média** ± DP
Base úmida								
Carne branca	58- 79	69 ± 7 a	49- 58	54 ± 3 b	48- 56	51 ± 3 b	48- 79	58 ± 10
Carne escura	76- 98	89 ± 7 a	72- 95	80 ± 8 b	55- 82	72 ± 8 c	55- 98	80 ± 9
Pele	96-126	108 ± 11 a	84-114	99 ± 10 a	88-123	105 ± 11 a	84-126	104 ± 5
Base seca								
Carne branca	252-332	289 ± 31 a	207-240	222 ± 12 b	193-233	214 ± 14 b	193-240	242 ± 41
Carne escura	331-434	382 ± 40 a	284-407	338 ± 36 b	265-351	310 ± 25 b	265-434	344 ± 36
Pele	132-240	184 ± 36 a	170-196	185 ± 10 a	153-229	202 ± 26 a	131-240	190 ± 10

*Média de 5 amostras em duplicata.

** Média das três marcas.

Valores na mesma linha horizontal com letras diferentes são significativamente diferente a nível de 5%

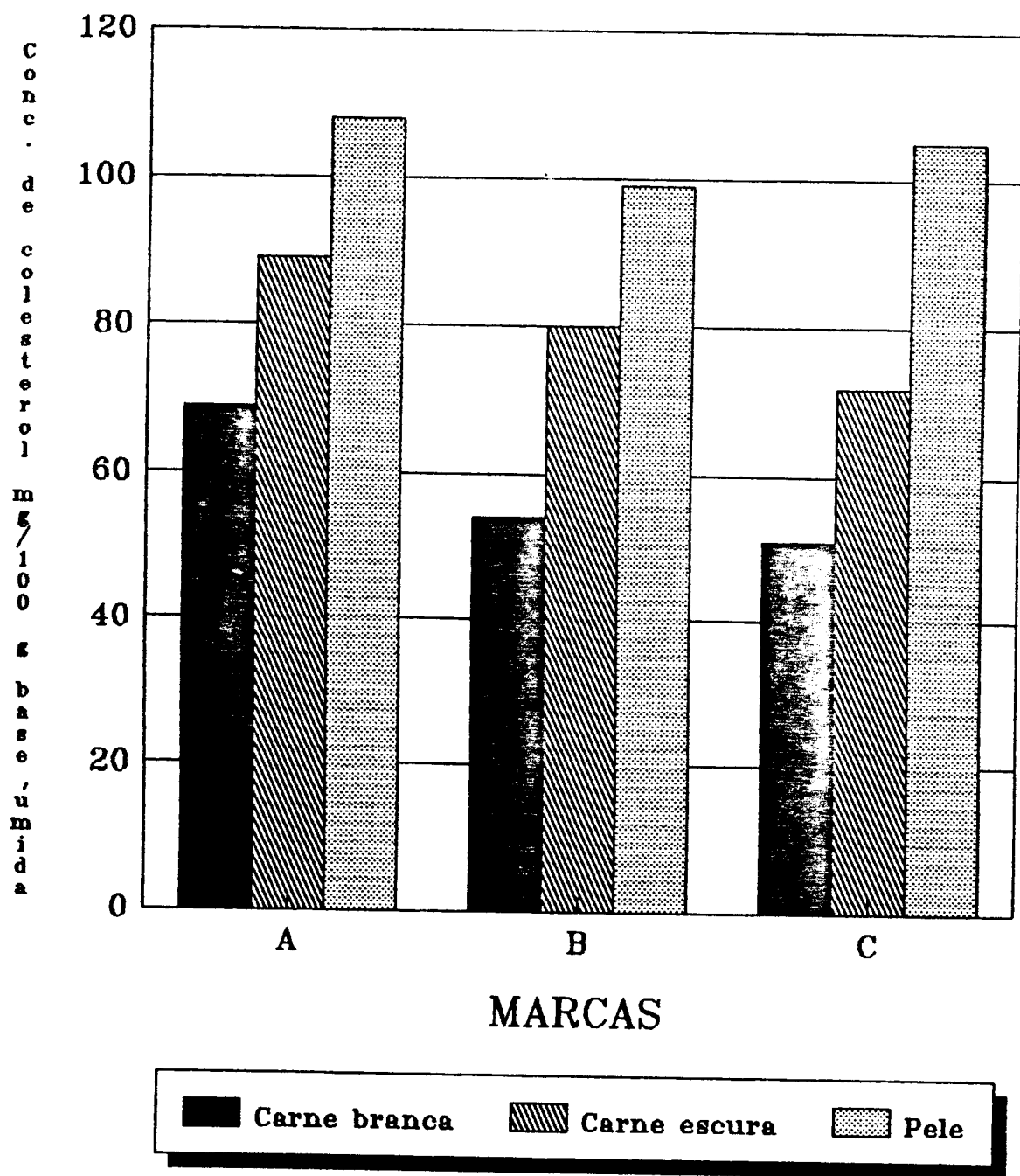


Figura 14 - Concentração de colesterol em carne de frango crua de diferentes marcas

Para o consumidor, é importante saber os teores de colesterol dos alimentos na forma em que estes são consumidos. Na Tabela 8 e Figura 15 estão apresentadas as concentrações de colesterol de frango assado, que foram maiores que a de frango cru, uma vez que houve retirada de água e conseqüente concentração dos componentes. Os resultados obtidos para carne branca (75 ± 17 mg/100g) são congruentes com Prusa & Lonergah (1987) que encontraram em média 77,86 mg/100g para peito de frango grelhado e com Karkalas *et al.* (1982) que obtiveram 80 mg/100g. Os nossos resultados de carne escura e pele (124 ± 20 mg/100g e 139 ± 37 mg/100g, respectivamente) foram mais altos que os de Karkalas *et al.* (1982), que reportaram 92 e 73 mg/100g, respectivamente.

Tabela 8 -Concentração de colesterol em carne de frango assada.

Porção analisada	% Unidade		Concentração de colesterol (mg/100g, base úmida)	
	faixa	média* \pm DP	faixa	média* \pm DP
Carne branca	51-68	63 \pm 5	58-113	75 \pm 17
Carne escura	39-63	55 \pm 9	97-171	124 \pm 20
Pele	13-46	31 \pm 9	109-228	139 \pm 37

*Médias de 8 amostras analisadas em duplicatas.

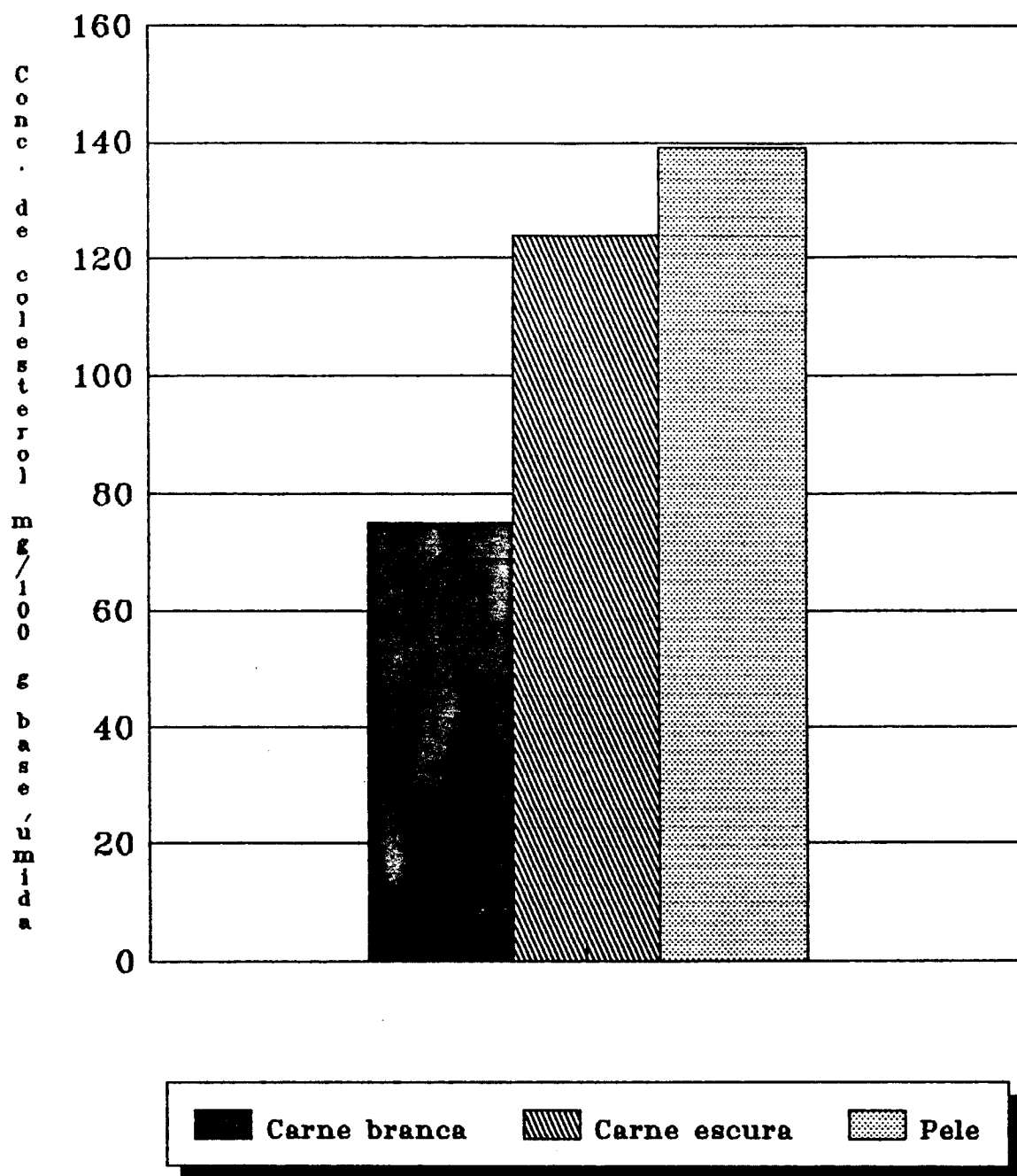


Figura 15- Concentração de colesterol em carne de frango assada.

Para avaliar a possibilidade de perdas durante o cozimento foram calculados os teores de colesterol de amostras pareadas, em base seca para eliminar a influência da água (Tabela 9 e Figura 16). Não existiu diferença significativa a nível de 5% entre a pele crua e pele assada. Houve, no entanto, uma perda significativa para carne branca e carne escura em torno de 8 e 14%, respectivamente.

Tabela 9 - Efeito do cozimento na concentração do colesterol em carne de frango.

Porção analisada	Concentração de colesterol (mg/100g, base seca)			
	Cru		Assada	
	faixa	média* ± DP	faixa	média* ± DP
Carne branca	193-286	224 ± 23 a	168-253	206 ± 26 b
Carne escura	265-406	328 ± 35 a	192-346	283 ± 40 b
Pele	153-229	194 ± 23 a	152-268	203 ± 34 a

*Médias de 8 amostras pareadas analisadas em duplicatas.

Valores na mesma linha horizontal com letras diferentes são significativamente diferente a nível de 5%.

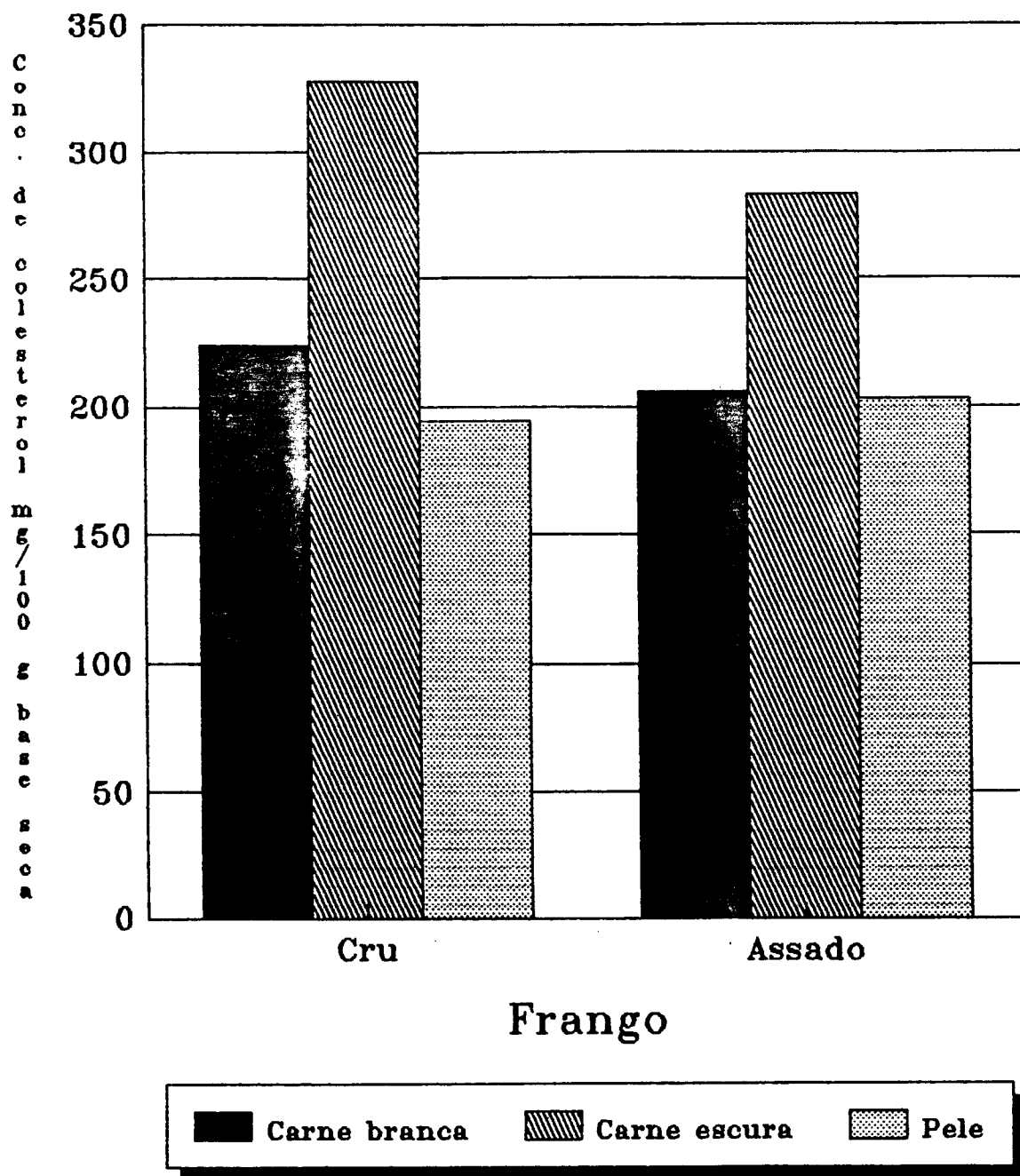


Figura 16 - Concentração de colesterol em carne de frango crua e assada, base seca.

5.3 - Teores de colesterol em carne suína

A Tabela 10 apresenta os valores de colesterol para quatro cortes de carne de porco crua. Não houve diferença significativa a nível de 5% nos teores de colesterol encontrados entre os quatro cortes de carne cruas. Os teores obtidos, variaram de 49 ± 5 a 54 ± 6 mg/100g que são congruentes com Prusa & Hughes (1986) que encontraram 45,09 mg/100g. Bohac & Rhee (1988) obtiveram 53,1 a 59,7 mg/100. Valores maiores, foram relatados por Reitmeier & Prusa (1987) (56-70 mg/100g); por Tu et al. (1967) (56,3-71,3 mg/100g); e por Kritchevsky & Tepper (1961) (98 mg/100g). Níveis mais altos ainda, encontram-se na Tabela de Franco (1982): 102,0, 198,0 e 368,0 mg/100g para carne de porco crua, carne de porco crua de gordura média e alcatra, respectivamente. No entanto, valores bem mais baixo ($30 \pm 0,3$ mg/100g) foram obtidos por Csallany et al. (1989). O toucinho apresentou um valor ligeiramente maior de colesterol, média de 54 ± 6 mg/100g (Figura 17). Não foi encontrado na literatura valores de colesterol para toucinho.

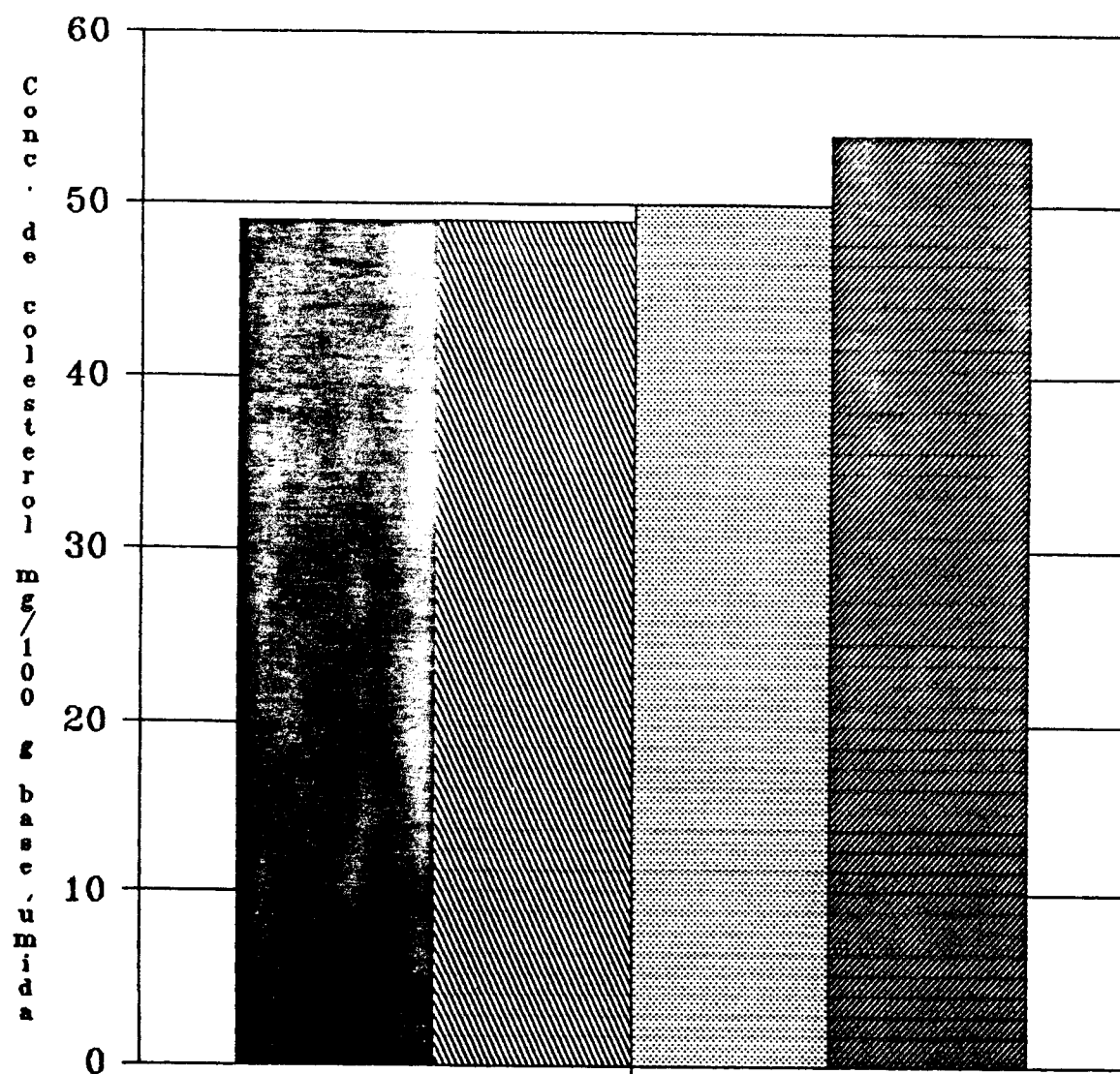
Quando calculados em base seca, os teores de colesterol obtidos por Prusa & Hughes (1986) foram em média 152,05 mg/100g e para Reitmeier & Prusa (1987) de 170-209 mg/100g, que são semelhantes aos nossos resultados (158-187 mg/100g), com exceção do toucinho que apresentou 61 mg/100g. Entre bisteca, lombinho e pernil, não existiu diferença significativa a nível de 5%; o toucinho apresentou diferença significativa a nível de 5% com os demais cortes.

Tabela 10 - Concentração de colesterol em cortes de carne suína crua.

Corte	n ^o amostras [‡] analisadas	% unidade		Concentração de colesterol (mg/100)			
				Base úmida		Base seca	
		faixa	média ± DP	faixa	média ± DP	faixa	média ± DP
Bisteca	8	64-73	69 ± 3	40-58	49 ± 5 a	112-196	158 ± 26 a
Lombinho	7	70-74	73 ± 2	40-60	49 ± 7 a	155-229	184 ± 23 a
Pernil	5	71-75	73 ± 2	42-60	50 ± 6 a	167-242	187 ± 26 a
Toucinho	5	8-23	12 ± 6	49-66	54 ± 6 a	53-74	61 ± 6 b

‡ Amostras analisadas em duplicatas.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferente a nível de 5%.



Corte



Figura 17- Concentração de colesterol em carne suína crua.

A Tabela 11 apresenta os valores para carne suína cozida. Os teores de colesterol para bisteca, lombinho e pernil assado variaram de 69 ± 12 a 97 ± 6 mg/100g, que são semelhantes a Morgam *et al.* (1988) que obtiveram os valores de 80-91 mg/100g e Reitmeier & Prusa (1987) que encontraram 92-101 mg/100g e Heymann *et al.* (1990) que acharam teores de 96-105 mg/100g. Prusa & Hughes (1986) relataram valores menores, 56-78 mg/100g, dependendo do tipo de cozimento e temperatura interna da carne.

O toucinho frito apresentou em média valores menores (56 ± 6 mg/100) que as carnes devido à grande perda de gordura durante o cozimento.

Tabela 11 - Concentração de colesterol em cortes de carne suína cozida.

Corte	% umidade		Concentração de colesterol (mg/100g, base úmida)	
	faixa	média* ± DP	faixa	média* ± DP
Bisteca	28-34	32 ± 3	88-109	97 ± 6 a
Lombinho	50-55	54 ± 2	49- 87	69 ± 12 c
Pernil	46-53	50 ± 3	71- 96	82 ± 8 b
Toucinho	0,1-7	2 ± 3	47- 66	56 ± 6 d

*Médias de 5 amostras analisadas em duplicatas.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferente a nível de 5%.

Entre todos os cortes analisados houve diferença significativa a nível de 5%. No entanto, Morgam *et al.* (1988) não encontraram diferença significativa ($P > 0,10$) no conteúdo de colesterol em carne de porco cozida com diferentes níveis de gordura subcutânea antes do cozimento, pelos métodos caseiros comuns.

Os valores encontrados para carne assada, em base seca, variaram de 143 ± 8 a 164 ± 22 mg/100g, os quais estão de acordo com Prusa & Hughes (1986) que relataram em média 146-187 mg/100g. Teores maiores foram referenciados por Reitmeier & Prusa (1987), de 179 a 262 mg/100g. Não existiu diferença significativa a nível de 5% entre bisteca, lombinho e pernil mas, existiu a nível de 5% entre toucinho e os demais cortes (bisteca, lombinho e pernil)

O efeito do cozimento pode ser apreciado na Tabela 12 e Figura 18. Não houve perda significativa a nível de 5% para bisteca e toucinho. O pernil e o lombinho sofreram perdas significativas de aproximadamente 12 e 19%, respectivamente.

Tabela 12 - Efeito do cozimento na concentração de colesterol em carne suína.

Corte	Concentração de colesterol (mg/100g, base seca)			
	Cru		Assada	
	faixa	média* \pm DP	faixa	média* \pm DP
Bisteca	127-197	156 ± 21 a	130-155	143 ± 8 a
Lombinho	155-229	183 ± 23 a	108-188	148 ± 28 b
Pernil	176-242	187 ± 26 a	136-204	164 ± 22 b
Toucinho	53- 74	61 ± 6 a	47- 71	57 ± 7 a

*Médias de 5 amostras analisadas em duplicatas.

Valores na mesma linha horizontal com letras diferentes são significativamente diferente a nível de 5%

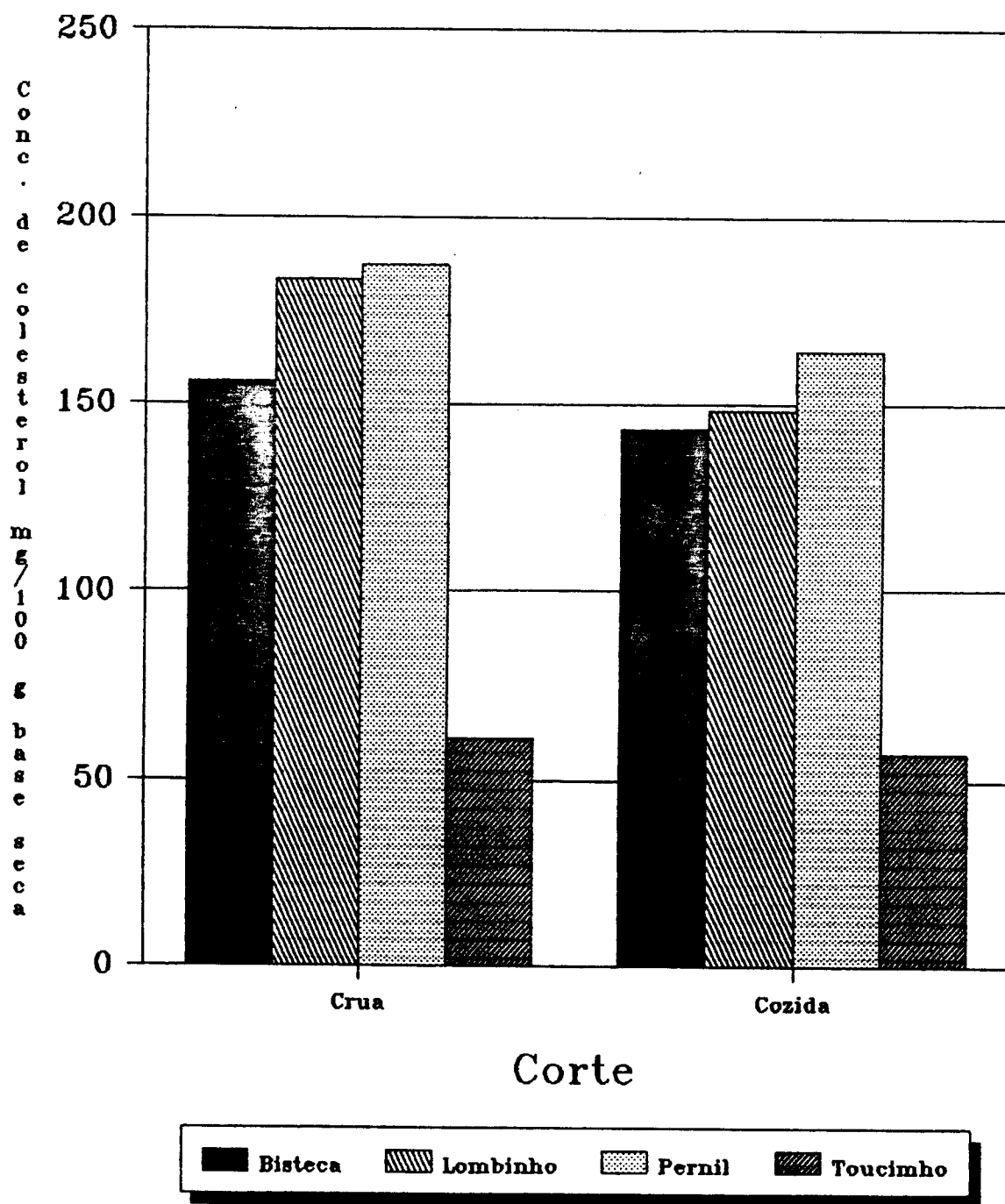


Figura 18- Concentração de colesterol em carne suína crua e cozida, base seca.

5.4 - Teores de colesterol em carne bovina

Os cortes escolhidos (contrafilé, coxão duro, coxão mole, músculo e peito) foram de diferentes localizações anatômicas e variados graus de gordura.

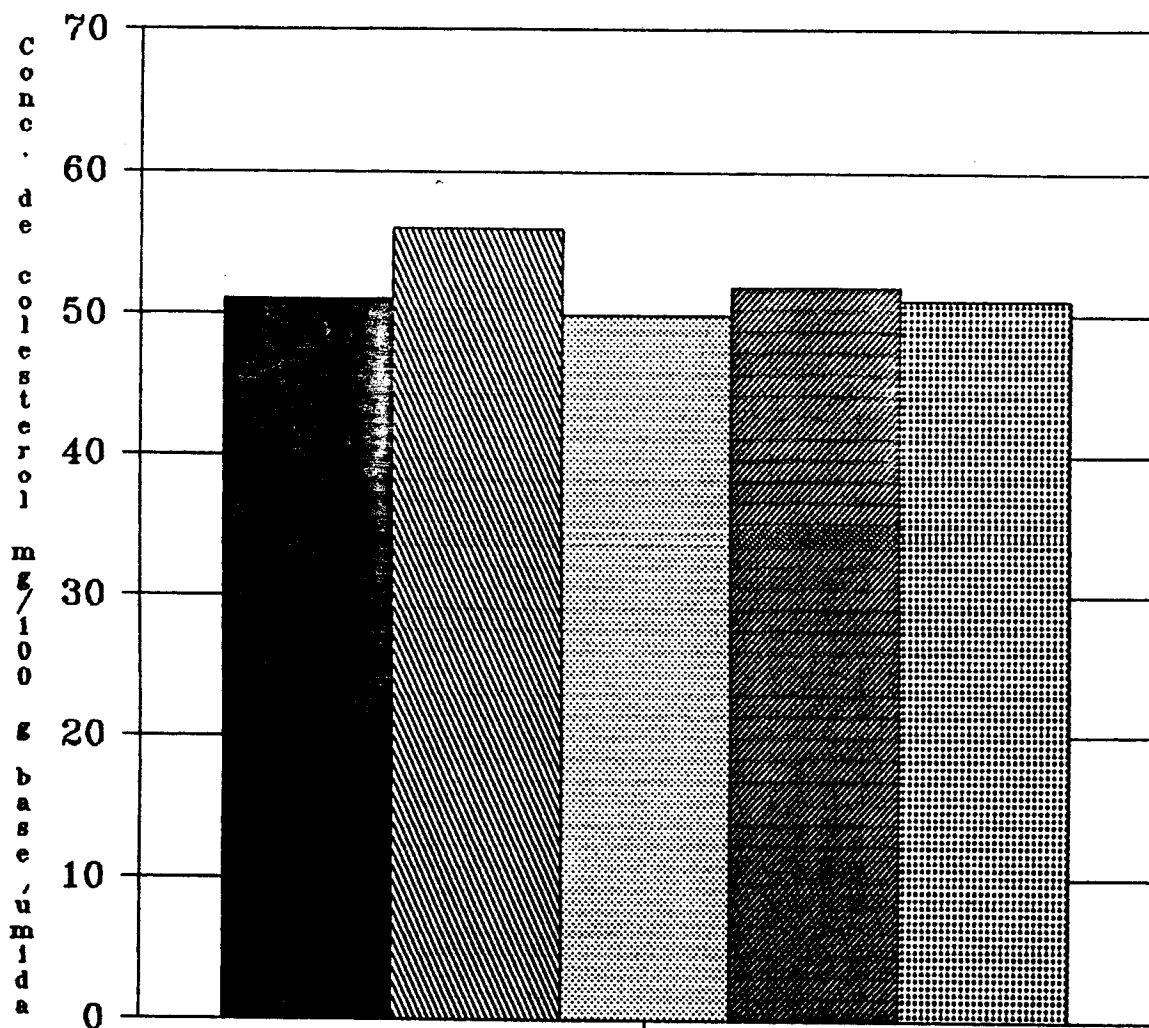
Os resultados de carne bovina crua encontram-se na Tabela 13 e Figura 19.

Tabela 13 - Umidade e concentração de colesterol em cortes de carne bovina crua.

Corte	% umidade		Concentração de colesterol (mg/100g)			
			Base úmida		Base seca	
	faixa	média* ± DP	faixa	média* ± DP	faixa	média* ± DP
Contrafilé	65-72	68 ± 3	41-59	51 ± 6 a	128-176	160 ± 16 b
Coxão Duro	66-70	68 ± 2	47-68	56 ± 6 a	141-206	174 ± 20 b
Coxão Mole	69-73	72 ± 2	44-58	50 ± 4 a	152-216	179 ± 18 b
Músculo	74-76	75 ± 1	46-61	52 ± 4 a	174-246	208 ± 22 a
Peito	63-74	69 ± 4	44-58	51 ± 6 a	143-203	165 ± 17 b

*Médias de 5 amostras analisadas em duplicatas.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferente a nível de 5%.



Corte

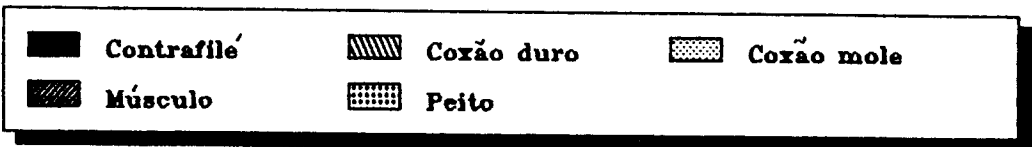


Figura 19- Concentração de colesterol em carne bovina crua.

Os valores descritos na literatura divergiram bastante, porém, muitos pesquisadores obtiveram resultados semelhantes aos nossos (50 ± 4 a 56 ± 6 mg/100g). Teores médios de 55,7 mg/100g (Hood, 1987), 52-66 mg/100g (Rhee et al., 1982a), 58,3-63,9 mg/100g (Eichhorn et al., 1986a) e 46-57 mg/100g (Hood & Allen, 1971) foram obtidos para contrafilé cru. Tu et al. (1967) relataram que o conteúdo de colesterol para vários músculos bovinos variaram de 51,4 a 65,8 mg/100g. Bohac et al. (1988) encontraram para contrafilé cru, 59,1-63,2 mg/100g e para coxão mole, 57,4-69,3 mg/100g. Bohac & Rhee (1988) obtiveram para contrafilé 56 mg/100g e para coxão mole 58,5 mg/100g, os quais são um pouco maiores que os nossos. Valores acima destes (63,32 mg/100g) foram encontrados por Wheeler et al., (1987) e por Hoelscher et al. (1988), que relataram valores de 60,9 a 63,5 mg/100g. Concentrações bem mais altas são apresentadas na Tabela de Franco (1982): 123 e 289 mg/100g para carne de boi magra e carne de boi de gordura média, respectivamente. Observou-se na Figura 19, que o coxão duro apresentou maior teor de colesterol, embora não tenha existido diferença significativa a nível de 5% entre os cinco cortes de carne bovina crua. Dados semelhantes foram constatados por Rhee et al. (1982a) que não encontraram diferença significativa entre músculos com diferentes quantidades de gordura.

Os valores de colesterol para contrafilé cru com diferentes níveis de gordura, em base de peso seco obtidos por Rhee et al. (1982a) variaram de 192 a 229 mg/100g. Observou-se na Tabela 13 que os teores obtidos nos cortes de carne analisadas foram em geral mais baixos, variando em média de 160 a 208 mg/100g. Existiu diferença significativa a nível de 5% entre músculo e os demais cortes (contrafilé, coxão duro, coxão mole e peito).

O efeito do cozimento na carne bovina foi determinado nos cortes de contrafilé por ser uma das mais consumidas pela população e no músculo por possuir maior teor de gordura intramuscular.

Os teores de colesterol obtidos para contrafilé frito e músculo cozido, foram em média de 66 ± 6 e 67 ± 4 mg/100g, respectivamente. Rhee *et al.* (1982b) relataram 101,9 mg/100g, Wheeler *et al.* (1987), 80,27 mg/100g, Rhee *et al.* (1982a) de 77 a 92 mg/100g e Hoelscher *et al.* (1988) de 74,4 a 84,5 mg/100g para contrafilé cozido.

Pela Tabela 14 e Figura 20 verificou-se uma pequena perda significativa a 5%, pelos tratamentos térmicos, que corresponderam a 14 e 16% para contrafilé e músculo, respectivamente.

Tabela 14 - Concentração de colesterol em cortes de carne bovina crua e cozida, base seca.

Corte	Concentração de colesterol (mg/100g)			
	Cru		Assada	
	faixa	média* ± DP	faixa	média* ± DP
Contrafilé	128-176	160 ± 16 a	121-157	138 ± 13 b
Músculo	174-256	208 ± 22 a	149-194	175 ± 13 b

*Médias de 5 amostras pareadas analisadas em duplicatas

Valores na mesma linha horizontal com letras diferentes são significativamente diferente a nível de 5%

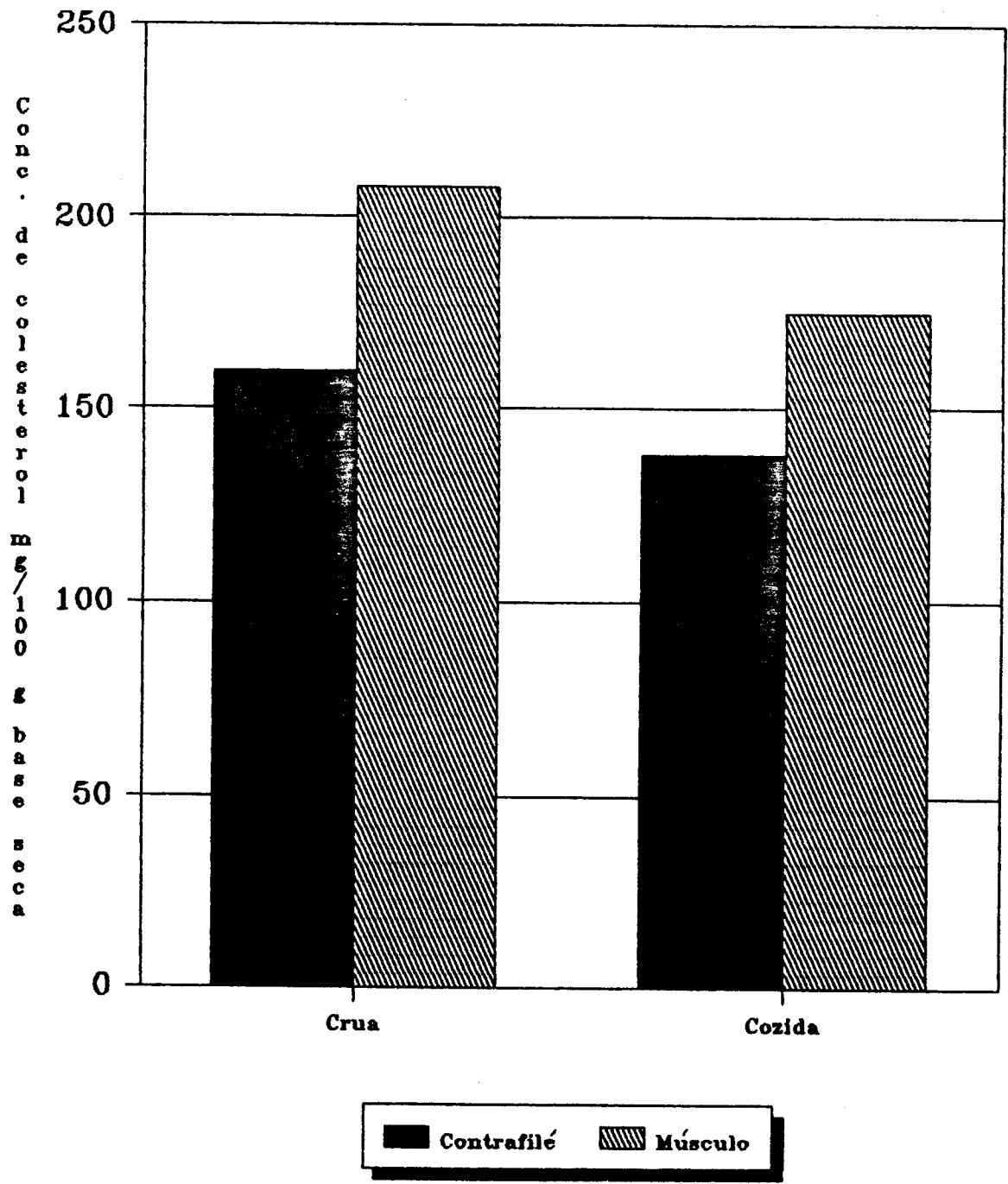


Figura 20- Concentração de colesterol em carne bovina crua e cozida, base seca.

5.5 - Comparação dos teores de colesterol entre carne de frango, suína e bovina

Os resultados de colesterol para carne suína e bovina crua, em base úmida não apresentaram diferença significativa entre todos os cortes analisados. Bohac & Rhee (1988) também não encontraram diferença significativa no conteúdo de colesterol de músculos suínos e bovinos de três localizações anatômicas. Em média, as carnes bovinas analisadas no presente trabalho, continham ligeiramente mais colesterol que as suínas. Tu et al. (1967) evidenciaram o contrário.

A concentração de colesterol para carne de frango cru obtida foi em média de 58 ± 10 , 80 ± 9 e 104 ± 5 mg/100g para carne branca, carne escura e pele, respectivamente, que são valores bem maiores que os obtidos para carne suína e bovina (49 ± 5 a 56 ± 6 mg/100g).

Cabe lembrar, no entanto, que os níveis de colesterol no sangue não depende somente do conteúdo de colesterol dos alimentos, mas também do balanço entre ácidos graxos saturados e ácidos graxos insaturados (Anderson et al., 1976).

5.6 - Avaliação do método CLAE para ovos

O método CLAE apresenta três etapas pré-cromatográficas: extração dos lipídios, saponificação e extração da matéria insaponificável.

Foram testados três procedimentos de saponificação com 0,4 g de amostra: (a) 2,5 ml KOH 2% recentemente preparada em álcool absoluto e incubadas a 37°C por 1,5 h (Beyer & Jensen, 1989a); (b) 2,5 ml KOH 2% recentemente preparada em álcool absoluto e incubadas a 45°C por 1 h (Duncan *et al.*, 1979); (c) 10 ml KOH 2% recentemente preparada em álcool absoluto 90% e banho-maria com agitação por 15 min. a 80°C (Bohac *et al.*, 1988).

Os resultados obtidos não foram significativamente diferente a nível de 5% (Tabela 15). Optou-se, então pela saponificação de Bohac *et al.* (1988), por ser mais rápida.

Tabela 15 - Comparação de três procedimentos de saponificação

Método	Concentração de colesterol (mg/100g)
Beyer & Jensen (1989a)	992 a
Duncan <i>et al.</i> (1979)	1000 a
Bohac <i>et al.</i> (1988)	992 a

Valores na mesma coluna com letras iguais não são significativamente diferente a nível de 5%.

A recuperação foi feita adicionando-se quantidades conhecidas de colesterol no extrato clorofórmico:metanólico (2:1), obtendo-se valores acima de 95%, como mostra a Tabela 16.

Tabela 16 - Recuperação do colesterol em gema de ovo pelo método CLAE.

mg adicionada	n	% Recuperação
8	2	95
16	2	97

n = número de determinações.

A média dos tempos de retenção, desvios padrão e coeficientes de variação (CVs) do colesterol em amostras de ovo, encontram-se na Tabela 17. O CV do tempo de retenção (CV = 1.4) foi menor que 2% demonstrando uma boa reprodutibilidade entre análises.

Tabela 17 - Reprodutibilidade do tempo de retenção do colesterol em três dias consecutivos

dias	n	Tempo de retenção (min.)	
		Média ± DP	%CV
1º	10	4.1 ± 0.02	1.7
2º	10	4.1 ± 0.03	0.7
3º	10	4.2 ± 0.07	0.4
Média Geral ± DP		4.1 ± 0.06	1.4

n = número de determinações.

O cromatograma característico do padrão colesterol e de uma amostra de gema de ovo, nas condições cromatográficas estabelecidas para análise, podem ser observados na Figura 21.

O pico do colesterol foi identificado pela comparação dos tempos de retenção do padrão e da amostra e também pelos espectros de absorvância do padrão e amostra obtidos pelo detector conjunto de diodos como mostra a Figura 22.

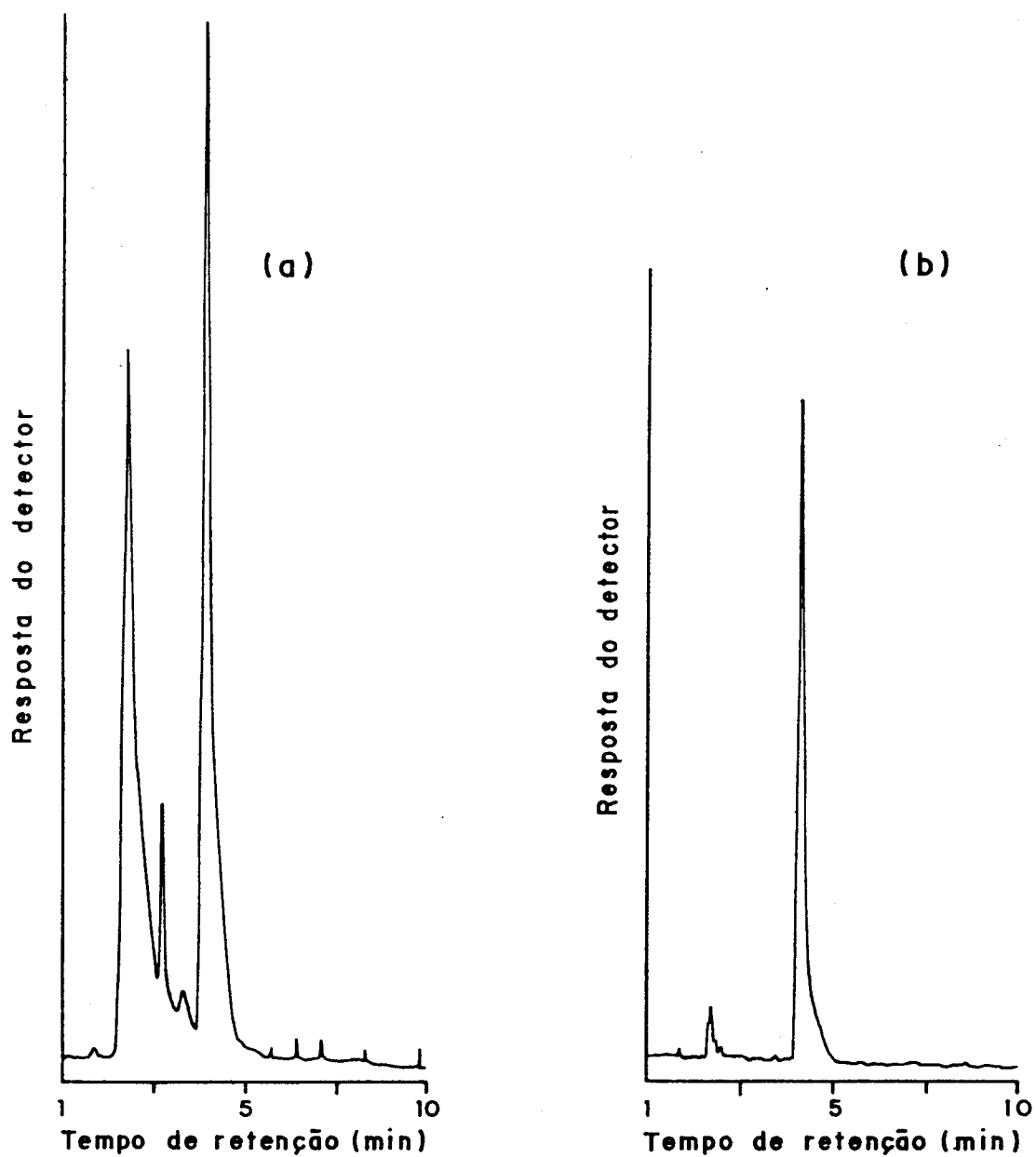


Figura 21 - Cromatogramas característicos de uma amostra de gema de ovo (a) e do padrão colesterol (b). Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb DDS-1, 5 μ m (150 x 4,6 mm); fase móvel, acetonitrila:isopropanol (50:50); fluxo, 1,2 ml/minuto; detector conjunto de diodos 205 nm.

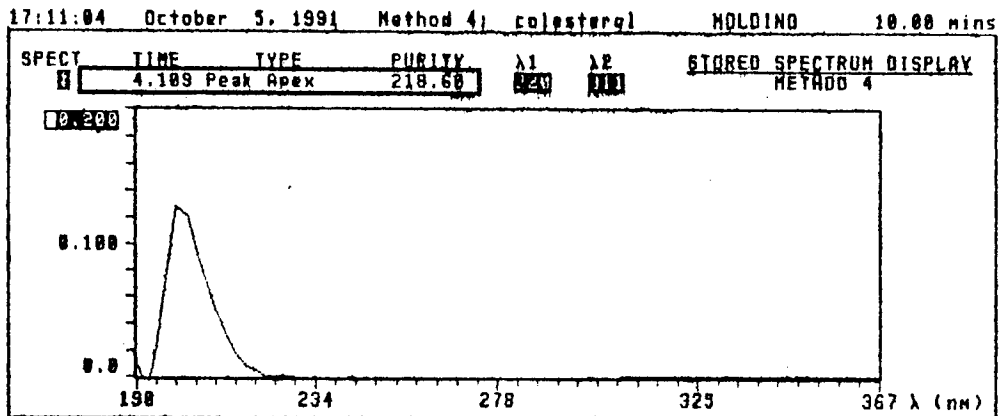
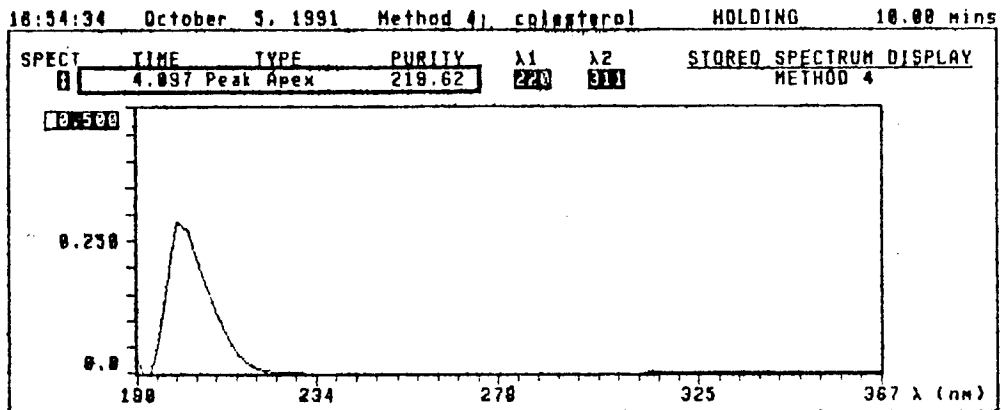


Figura 22 - Espectros característicos de absorvância do padrão colesterol (a) e da amostra gema de ovo (b) obtidos pelo detector conjunto de diodos.

5.7 - Comparação de métodos colorimétricos e por CLAE para ovos

Pela literatura, percebe-se que existe uma maior preocupação em relação a substância interferente na determinação de colesterol em ovos, o que justifica um estudo comparativo de vários métodos.

Os resultados obtidos para gema de ovo por dois métodos colorimétricos e por CLAE encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 - Comparação dos valores de colesterol em gema de ovo (mg/100g) obtidos por dois métodos colorimétricos e por CLAE.

Amostras	Colorimétrico				CLAE	
	Bohac <u>et al.</u>		IAL		média*	%CV
	média*	%CV	média*	%CV		
1	1245	4.8 a	1778	0.7 b	1073	4.3 a
2	1164	0.3 a	1731	8.6 b	1021	3.8 a
3	1051	5.8 a	1544	7.2 b	940	7.9 a
4	1028	7.9 a	1678	0.6 b	1021	4.6 a
5	1031	1.2 a	1674	5.1 b	1025	9.5 a
Média Geral ± DP	1104 ± 100		1681 ± 104		1036 ± 49	
%CV	9.0		6.2		4.7	

*Média da duplicata.

Valores na mesma linha horizontal, com letras diferentes são significativamente diferente a nível de 5%.

O método por CLAE foi o que apresentou valores menores e também menor variação (CV = 4,7). Os resultados obtidos pelo método de Bohac et al. foram ligeiramente mais altos, mas não significativamente diferente com os de CLAE. Os teores obtidos pelo método do Instituto Adolfo Lutz (IAL) foram maiores, demonstrando a presença de interferentes.

Jiang et al. (1991) também obtiveram valores maiores (1460 mg/100g) de colesterol em ovo com o método colorimétrico do que com os métodos enzimáticos, CGL e CLAE (1230, 1170 e 1170 mg/100g, respectivamente). O método colorimétrico gerou resultados 23% mais altos que os de CLAE. O método colorimétrico utilizado foi o de Abell et al. (1952) que envolveu a reação com ácido acético, anidrido acético e ácido sulfúrico, e a leitura foi feita a 620 nm, semelhante ao método do IAL.

Resultados semelhantes foram obtidos por Beyer & Jensen (1989a), que obtiveram 1601 mg/100g de gema pelo método colorimétrico e 1097 mg/100g pelo método por CLAE. O método colorimétrico seguido foi de Zlatkis et al. (1953) que envolveu a reação do colesterol com o reagente cloreto férrico. Os valores de colesterol pelo método colorimétrico foram 26% mais altos quando comparados com os resultados obtidos por CLAE.

Os teores encontrados na literatura para ovo variam de 1097 mg/100g de gema (Beyer & Jensen, 1989a) até 1862 mg/100g de gema (Kritchevsky & Tepper, 1961). Os trabalhos mais recentes que empregaram CLAE e CGL apresentaram resultados em torno de 1000 a 1100 mg/100g de gema, enquanto que os mais antigos que utilizaram métodos colorimétricos relataram valores bem maiores.

Os resultados da presente investigação, no entanto, demonstraram que, dependendo do procedimento colorimétrico, pode-se obter resultados comparáveis ao método por CLAE. Enquanto que, os valores obtidos pelo método colorimétrico do IAL (1985) foram 62% mais altos, os de Bohac et al. (1988) aproximaram-se aos de CLAE.

5.8 - Teores de colesterol em ovos

Utilizando o melhor método, os valores de colesterol de ovo com casca branca e vermelha foram determinados (Tabela 19). Não existiu diferença entre os teores de colesterol para ovo branco (10 mg/g de gema ou 190 mg/ovo) e vermelho (10 mg/gema ou 191 mg/ovo). Os valores obtidos estão de acordo com Jiang *et al.* (1991) que encontraram 195.0 mg/ovo ou 11.7 mg/g de gema, e com Beyer & Jensen (1989a) que obtiveram 198 mg/ovo ou 10.97 mg/g de gema e com Beyer & Jensen (1989b) que apresentaram 195 mg/ovo e 11,7 mg/g de gema. Todos os trabalhos utilizaram CLAE.

Ferreira & Campos (1980) obtiveram em média 1200, 1230, 1250 e 1270 mg/100g de gema de 4 poedeiras comerciais alimentadas com dietas de diferentes níveis calóricos. Utilizaram o método colorimétrico de Zlatkis *et al.* (1953). Na Tabela de Franco (1982) o valor encontrado foi de 1500 mg/100g de gema.

Tabela 19 - Concentração de colesterol em ovos determinados por CLAE.

Tipo de ovo	Nº de Amostras	Concentração de Colesterol	
		Gema (mg/g) média ± DP	Ovo (clara + gema) mg/ovo média ± DP
Branco	10	10 ± 1.0	190 ± 22
Vermelho	10	10 ± 0.5	191 ± 16

A variação e peso médio da gema foi 18.3 ± 1.8 g e 18.5 ± 1.6 g e do ovo (clara + gema) 55.6 ± 3.7 g e 57.5 ± 5.0 g, para o ovo branco e vermelho, respectivamente.

5.9 - Avaliação do método por CLAE para massas com ovos

Embora o método colorimétrico do IAL não incluisse a etapa de saponificação para massa com ovos, os testes preliminares demonstraram a importância da mesma para remoção dos interferentes, como mostram os cromatogramas na Figura 23.

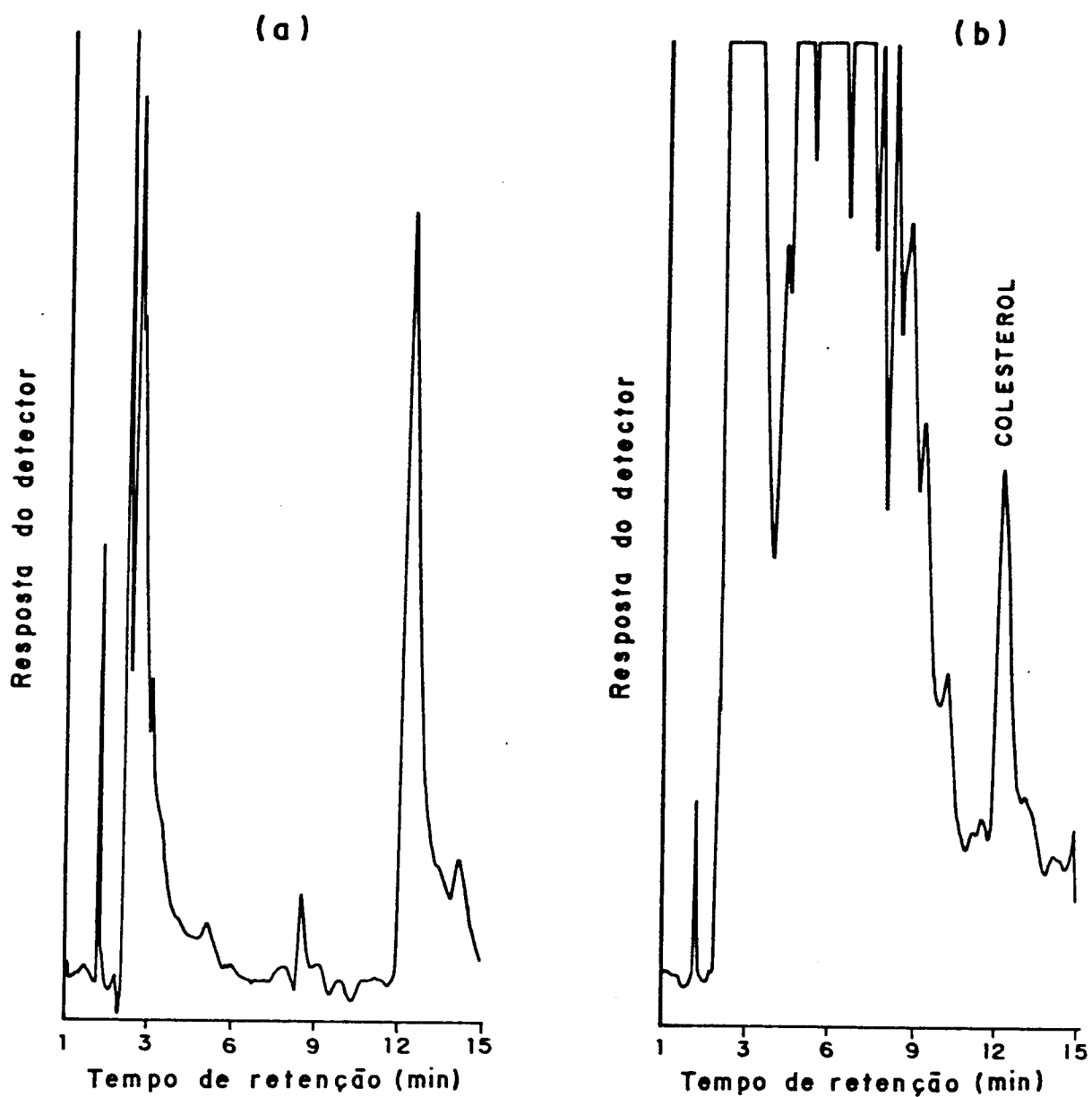


Figura 23 - Cromatogramas de uma amostra de massa com ovos saponificada (a) e não saponificada (b). Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-1, 10 μ m (300 x 4 mm); fase móvel, acetonitrila:metanol (50:50); fluxo, 1,2 ml/minuto; detector, conjunto de diodos 205 nm.

A recuperação para massa com ovos foi feita adicionando-se quantidades conhecidas de colesterol no extrato de clorofórmio, obtendo-se valores acima de 97% (Tabela 20).

Tabela 20 - Recuperação do colesterol em massa com ovos pelo método por CLAE.

mg adicionada	n	% Recuperação
0.2	2	98
0.4	2	97

n = número de determinações

A eficiência da extração foi verificada através de duas extrações consecutivas. O valor máximo obtido na segunda extração foi de 0,02 g de colesterol/kg de massa, que equivale ao teor de colesterol de 0,1 ovo, o qual é desprezível, demonstrando a eficiência da extração.

A média dos tempos de retenção, desvios padrão e coeficientes de variação (CVs) do colesterol, podem ser observados na Tabela 21. O CV do tempo de retenção foi menor que 2%, demonstrando uma boa reprodutibilidade entre análises.

Tabela 21 - Reprodutibilidade do tempo de retenção do colesterol em três dias consecutivos

dias	n	Tempo de retenção (min.)	
		média ± DP	%CV
1º	6	9.2 ± 0.02	0.2
2º	12	9.5 ± 0.1	1.1
3º	16	9.4 ± 0.1	1.4
Média Geral ± DP		9.4 ± 0.2	1.6

n = número de determinações.

A Figura 24 mostra o cromatograma característico do padrão de colesterol e de uma amostra de massa nas condições cromatográficas estabelecidas para análise.

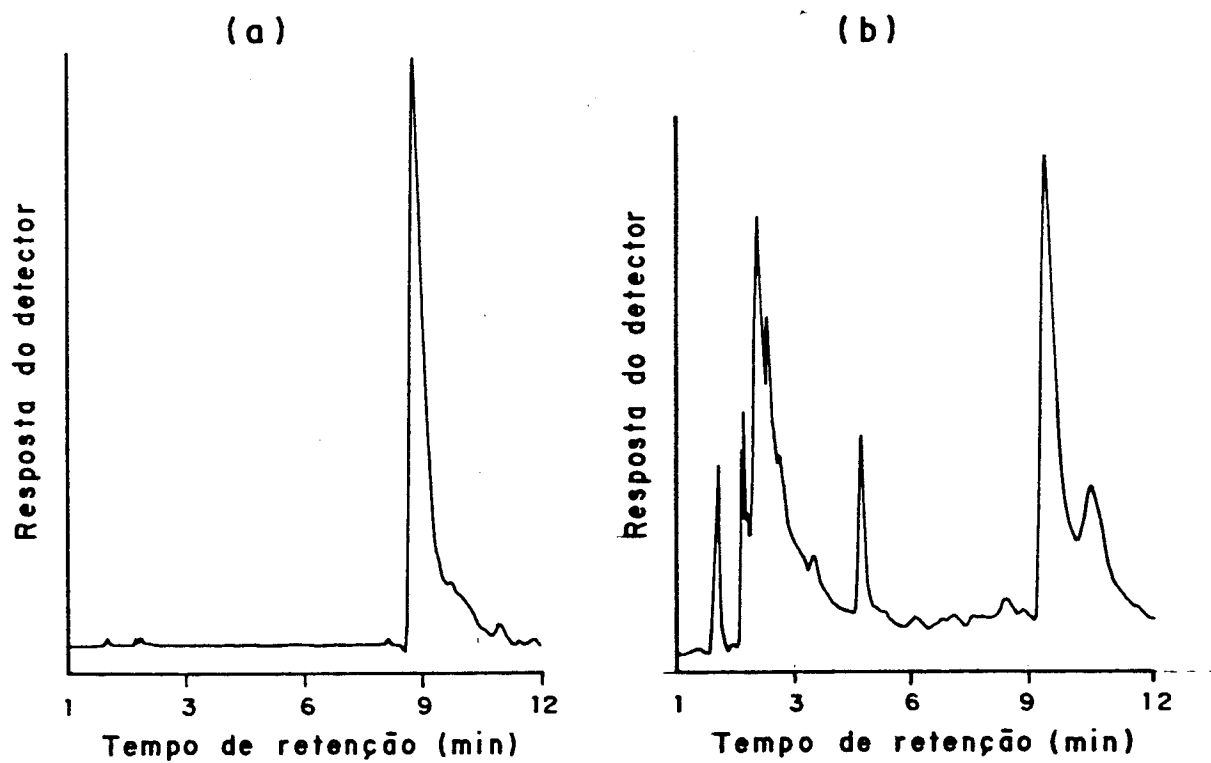
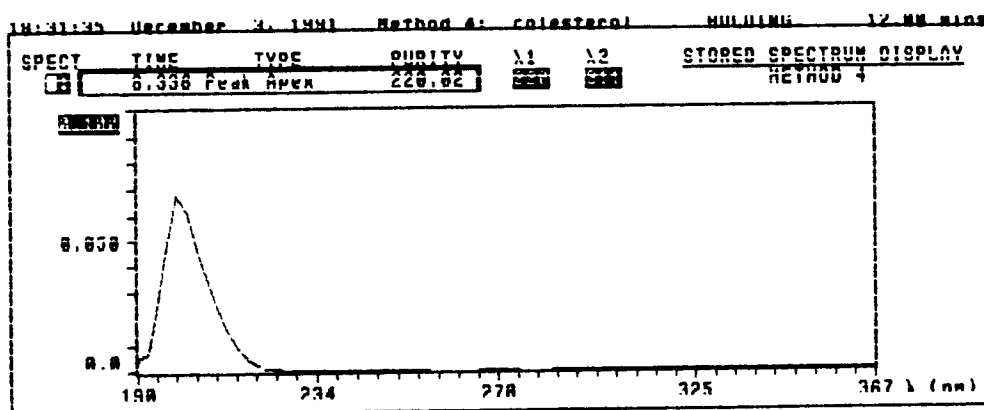
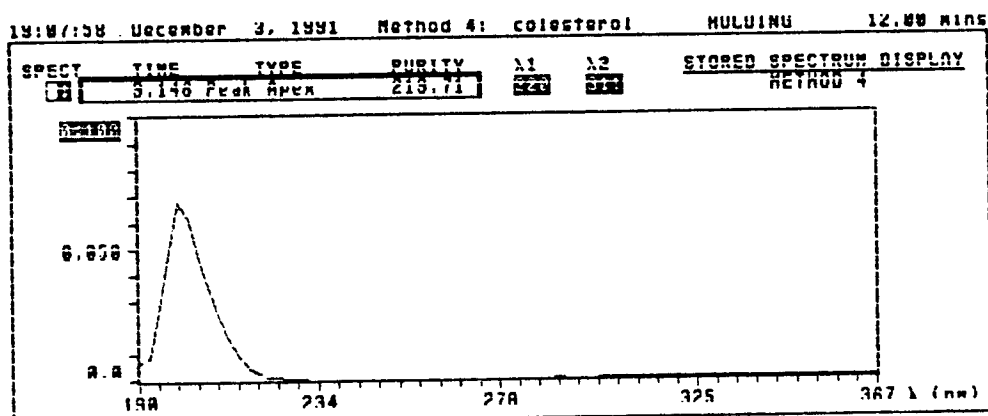


Figura 24 - Cromatogramas característicos do padrão colesterol (a) e de uma amostra de massa com ovos (b). Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-1,5 μm (150 x 4,6 mm); fase móvel, acetonitrila:isopropanol (75:25); fluxo, 1,2 ml/minutos; detector, conjunto de diodos 205 nm.

A identificação do pico do colesterol foi feita também pela comparação dos espectros de padrão colesterol e da amostra obtidos pelo detector conjunto de diodos como mostra a Figura 25.



(a)



(b)

Figura 25 - Espectros característicos de absorvância de uma amostra de massa com ovos (a) e do padrão colesterol (b) obtidos pelo detector conjunto de diodos.

5.10 - Teores de colesterol em massas com ovos

Os níveis de colesterol em massa com ovos obtidos pelos métodos colorimétricos (IAL e Bohac *et al*) e por CLAE encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22 - Comparação dos valores de colesterol em massas com ovos (g/kg) obtidos por dois métodos colorimétricos e CLAE.

Amostras*	Colorimétrico				CLAE	
	IAL		Bohac <i>et al</i>		Média ± DP	%CV
	Média ± DP	%CV	Média ± DP	%CV		
1	0.39 ± 0.03 a	7.2	0,52 ± 0.01 a	1,9	0.11 ± 0.01 b	10.0
2	0.77 ± 0.03 a	3.6	0,64 ± 0.05 a	7,8	0.24 ± 0.01 b	4.2
3	0.76 ± 0.01 a	0.9	0,70 ± 0.01 a	1,4	0.18 ± 0.01 b	3.8
4	0.42 ± 0.03 a	6.5	0,44 ± 0.01 a	2,3	0.02 ± 0.01 b	0.2
5	0.48 ± 0.02 a	4.4	0,60 ± 0.01 a	1,7	0.24 ± 0.01 b	5.9
Média Geral ± DP	0.56 ± 0.2	4.5	0,58 ± 0,10	3,0	0.16 ± 0.1	4.8

*Amostras analisadas em duplicata.

Valores na mesma linha horizontal, com letras diferentes são significativamente diferente a nível de 5%.

Observou-se que todos os valores de colesterol obtidos pelos métodos colorimétricos foram maiores que os por CLAE.

A resolução 12/78 de CNNPA-MS e portaria 37/80 da DINAL-MS de 16 de Dezembro de 1980 estabeleceu que "massas com ovos" devem conter no mínimo 3 ovos/kg, correspondendo ao valor de 0,450 g de colesterol/kg. Este valor foi aparentemente calculado, considerando-se que cada ovo continha 150 mg de colesterol. A legislação não esclareceu a fonte dos dados, contudo este valor está coerente com os resultados obtidos atualmente pelo método CLAE (190 mg/ovo).

O método do IAL é o oficial para a determinação do colesterol em massa com ovos pelos laboratórios públicos.

Pelos resultados obtidos por esta metodologia apenas duas massas apresentaram colesterol abaixo do mínimo estabelecido. No entanto, utilizando-se o método por CLAE todas as marcas de massa com ovos analisadas, deram valores de colesterol abaixo do mínimo permitido pela legislação vigente, indicando que menos de 3 ovos foram adicionados por kilo de farinha.

Considerando a discrepância nos resultados, foi preparada uma massa caseira com 3 ovos, 1 kg de farinha e 200 ml de água. Após secagem em estufa a 100°C por 1 hora, a massa foi finamente pulverizada, como as amostras anteriores, e o teor de colesterol determinado. A média das triplicatas utilizando CLAE, foi de $0,442 \pm 0,012$ g/kg, correspondendo ao valor teórico dos 3 ovos adicionados na massa.

Portanto, o método colorimétrico utilizado pelos laboratórios de fiscalização (IAL), como indicador da presença de ovo superestimou os valores de colesterol e, conseqüentemente, a quantidade de ovo nas massas. Com o intuito de se obter uma alternativa, utilizando ainda um método colorimétrico, o de Bohac et al foi realizado e os resultados obtidos não diferiram significativamente a nível de 5% do IAL. Assim, é evidente a necessidade de que a metodologia oficial seja modificada a fim de se obter resultados semelhantes aos dos CLAE.

6- CONCLUSÕES

- 1- O método colorimétrico de Bohac et al. mostrou ser confiável para a determinação de colesterol em carnes, com recuperação em média de 94%.
- 2- Para carne de frango o teor de colesterol, nas diferentes porções, apresentou valores crescentes para carne branca, carne escura e pele.
- 3- As perdas pelo cozimento na carne de frango (assado) foram insignificantes a nível de 5% para a pele, ocorrendo uma perda significativa de aproximadamente 8 e 14% para carne branca e escura, respectivamente.
- 4- Pequenas variações no teor de colesterol foram encontradas entre marcas de carne de frango devido, provavelmente, às diferenças de matriz e alimentação.
- 5- Entre os cortes de carne suína crua analisados, bisteca, lombinho, pernil e toucinho, não houve diferença significativa a nível de 5%.
- 6- O cozimento não causou perdas significativa a nível de 5% para bisteca e toucinho; lombinho e pernil sofreram perdas significativas em torno de 12 e 19%, respectivamente.

- 7- Entre os cortes de carne bovina crua analisados, contrafilé, coxão duro, coxão mole, músculo e peito, também não houve diferença significativa a nível de 5%.
- 8- O cozimento causou perdas significativas de 14% no contrafilé frito e 16% no músculo cozido.
- 9- Embora as carnes bovinas cruas continham ligeiramente mais colesterol que as suínas, não houve diferença significativa, entre as duas, em todos os cortes analisados. As concentrações de colesterol obtidas para carne de frango cru foram maiores.
- 10- Não houve diferença significativa nos teores de colesterol de ovos obtidos pelo método colorimétrico de Bohac et al e CLAE, que mostraram ser confiáveis. Já o método do IAL superestimou os resultados.
- 11- Os teores de colesterol encontrado em ovo com casca branca e vermelha por CLAE, não diferiram significativamente a nível de 5%.
- 12- O método por CLAE para determinação do colesterol em massas mostrou ser confiável. Os valores de colesterol obtidos nas massas analisadas foram menores que o mínimo exigido pela legislação vigente.
- 13- Os métodos colorimétricos do IAL e Bohac et al. superestimaram o teor de colesterol em massas, não sendo recomendáveis para análise de fiscalização.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abell, L.L.; Levy, B.B.; Brodie, B.B. & Kendall, F.E. 1952. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its especificity. Journal of Biological Chemistry, 195: 357.
- Adams, M.L.; Sullivan, D.M.; Smith, R.L. & Richter, E.F. 1986. Evaluation of direct saponification method for determination of cholesterol in meats. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 69(5): 844.
- Al-Hasani, S.M.; Shabany, H. & Hlavac, J. 1990. Rapid determination of cholesterol in selected frozen foods. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 73(5): 817.
- Al-Zubaidy, S.S. & Al-Taha, T.J. 1984. Cholesterol content and some physical and chemical components of eggs from chicken hens of five different ages. Iraqi Journal of Agricultural Sciences "Zanco", 2(4): 7.
- Anderson, J.T.; Grande, F. & Keys, A. 1976. Independence of the effects of cholesterol and degree of saturation of the fat in the diet on serum cholesterol in man. American Journal of Clinical Nutrition, 29:1184.
- Anderson, J.T.; Grande, F. & Keys, A. 1973. Cholesterol-lowering diets. Journal of the American Dietetic Association, 62: 133.

Ansbacher, S. & Supplee, G.C. 1934. The cholesterol content and the antirachitic activation of milk constituents. The Journal of Biological Chemistry, 105(2): 391.

Association of Official Analytical Chemists - A.O.A.C. 1990. 15 ed. Washington, DC. v. 2.

Bang, H.O.; Dyerberg, J. & Hjerne, N. 1976. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. Acta Medica Scandinava, 200: 69.

Bartov, I.; Bornstein, S. & Budowski, P. 1971. Variability of cholesterol concentration in plasma and egg yolks of hens and evaluation of the effect of some dietary oils. Poultry Science, 50: 1357.

Beyer, J.D.; Milani, F.X.; Dutelle, M.J. & Bradley, R.L. 1989. Eggs and egg products. Gas chromatographic determination of cholesterol in egg products. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 72(5): 746.

Beyer, R.S. & Jensen, L.S. 1989a. Overestimation of the cholesterol content of eggs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37: 917.

Beyer, R.S. & Jensen, L.S. 1989b. Cholesterol content of commercially produced eggs in Georgia. Poultry Science, 68 1703.

- Bitman, J. & Wood, D.L. 1980. Cholesterol and cholesteryl esters of eggs from various avian species. Poultry Science, 59: 2014.
- Bohac, C.E.; Rhee, K.S.; Cross, H.R. & Ono, K. 1988. Assessment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. Journal of Food Science, 53(6): 1642.
- Bohac, C.E. & Rhee, K.S. 1988. Influence of animal diet and muscle location on cholesterol content of beef and pork muscles. Meat Science, 23: 71.
- Brasil. 1988. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões de Alimentos (CNNPA). Resolução 12/78 e portaria 37/80 da DINAL. In: Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. São Paulo.
- Brown, H.G. 1987. Adaptation of an HPLC system to quantify cholesterol. Journal of the American Oil Chemists' Society, 64(1): 106
- Brown, M.S.; Kovanen, P.T. & Goldstein, J.L. 1981. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. Science, 212(8) 628.
- Brown, W.D. 1961. Errors in the determination of serum cholesterol. Australian Journal Experimental Biology and Medical Science, 39: 209.

- Burr, M.L. 1989. Fish and the cardiovascular system. Progress in Food and Nutrition Science 13: 291.
- Caston, L. & Leeson, S. 1990. Dietary flax and egg composition. Poultry Science, 69: 1617.
- Crawford, N. 1958. An improved method for determination of free and total cholesterol using the ferric chloride reaction. Clinica Chimica Acta, 3: 357.
- Csallany, A.S.; Kindom, S.E.; Addis, P.B. & Lee, J. 1989. HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. Lipids, 24(7): 645.
- Duncan, I.W.; Culbreth, P.H. & Burtis, C.A. 1979. Determination of free, total, and esterified cholesterol by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 162: 281.
- Dumain, J.; Simler, N.; Banner, C.; Quentric, Y.; Pailler, F.M. 1988. évaluation de la quantité d'oeufs incorporée dans les pâtes alimentaires aux oeufs. Annales Falsifications de l'Expertise Chimique et Toxicologique, 81(872): 427.
- Dyerberg, J. 1986. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. Nutrition Reviews, 44(4): 125.

- Eichhorn, J.M.; Coleman, L.J.; Wakayama, E.J.; Blomquist, G.J.; Bailey, C.M. & Jenkins, T.G. 1986b. Effects of breed type and restricted versus ad libitum feeding on fatty acid composition and cholesterol content of muscle and adipose tissue from mature bovine females. Journal of Animal Science, 63: 781.
- Eichhorn, J.M.; Wakayama, E.J.; Blomquist, G.J. & Bailey, C.M. 1986a. Cholesterol content of muscle and adipose tissue from crossbred bulls and steers. Meat Science, 16: 71.
- Elkin, R.G. & Rogler, J.C. 1990. Reduction of the cholesterol content of eggs by the oral administration of lovastatin to laying hens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38: 1635.
- Ferreira, M.O.D. & Campos, E. 1980. Efeito do nível de energia da dieta sobre o nível de colesterol da gema. Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 32(1): 77.
- Folch, J.; Lees, M. & Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry, 226: 497.
- Fombuena, M.R.E. 1987. Control de los principales parámetros de pastas "al huevo". Técnicas de Laboratorio, 12(142): 140.

- Franco, G. 1982. Nutrição. Texto básico e tabela de composição química dos alimentos. , 6ª ed. Rio de Janeiro. Atheneu. pg. 181
- Garder. J.A & Williams, M. 1921. Sources of error in the estimation of cholesterol in tissue fats. Biochemical Journal, 15: 371.
- Goh, E.H.; Colles, S.M. & Otte, K.D. 1989. HPLC analysis of desmosterol, 7-dehydrocholesterol, and cholesterol. Lipids, 24(7): 652.
- Hamm, D. & Ang, C.Y.W. 1984. Effect of sex and age on proximate analysis, cholesterol and selected vitamins in broiler breast meat. Journal of Food Science, 49: 286.
- Harper, H.A.; Rodwell, V.W.; Mayes, P.A. 1982. Manual de Química Fisiológica. 5ª ed.. São Paulo. Ateneu Editora São Paulo Ltda. pg. 374-381.
- Hegsted, D.M.; McGrandy, R.B., Mevers, M.L. & Stare, F.J. 1965. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. The American Journal of Clinical Nutrition, 17: 281.
- Heymann, H.; Hedrick, H.B.; Karrasch, M.A.; Eggeman, M.K. & Ellersieck, M.R. 1990. Sensory and chemical characteristics of fresh pork roasts cooked to different endpoint temperatures. Journal of Food Science, 55(3): 613.

Hoelscher, L.M.; Savell, J.W.; Harris, J.M.; Cross, H.R. & Rhee, K.S. 1987. Effect of initial fat level and cooking method on cholesterol content and caloric value of ground beef patties. Journal of Food Science, 52(4): 883.

Hoelscher, L.M.; Savell, J.W.; Smith, S.B. & Cross, H.R. 1988. Subcellular distribution of cholesterol within muscle and adipose tissues of beef loin steaks. Journal of Food Science, 53(3): 718.

Hood, R.L. 1987. A note on the cholesterol content of beef rib steaks. CSIRO Food Research Q., 47: 44.

Hood, R.L. & Allen E. 1971. Influence of sex and postmortem aging on intramuscular and subcutaneous bovine lipids. Journal of Food Science, 36: 786.

Hostmark, A.T.; Lystad, E.; Spydevold, O. & Haugh, A. 1984. Estimation of lipoprotein and apoprotein distribution in rat plasma by cumulative density ultracentrifugation and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemical Medicine, 32: 54.

Hubbard, W.D.; Sheppard, A.J.; Newkirk, D.R.; Prosser, A.R. & Osgood, T. 1977. Comparison of various methods for the extraction of total lipids, fatty acids, cholesterol, and other sterol from food products. Journal of the American Oil Chemists' Society, 54: 81.

Hurst, W.J.; Aleo, M.D. & Martin Jr., R.A. 1985 HPLC determination of the cholesterol content of egg noodles as an indicator of egg solids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33(5): 820.

Ingr, I.; Simeonová, J.; Stávková, J.; Petrovský, E. & Dostál, F. 1987. Cholesterol content in market hen eggs. Die Nahrung, 31(10): 933.

Instituto Adolfo Lutz. 1985. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3 ed. São Paulo, v. 1, pg. 57-59

Jiang, Z.; Cherian, G.; Robinson, F.E. & Sin, J.S. 1990. Effect of feeding cholesterol to laying hens and chicks on cholesterol metabolism in pre-and posthatch chicks. Poultry Science, 69: 1694.

Jiang, Z.; Fenton, M. & Sim, J.S. 1991. Comparison of four different methods for egg cholesterol determination. Poultry Science, 70: 1015.

Kaneda, T.; Nakajima, A.; Fujimoto, K.; Kobayashi, T. Kiriyaama, S.; Ebihara, K.; Innami, T.; Tsuji, K.; Tsuji, E.; Kinumaki, T.; Shimma, H. & Yoneyama, S. 1980. Quantitative analysis of cholesterol in foods by gas-liquid chromatography. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 26: 497.

- Karkalas, J.; Donald, A.E. & Clegg, K.M. 1982. Cholesterol content of poultry meat and cheese determined by enzymic and gas-liquid chromatography methods. Journal of Food Technology, 17: 281.
- Keys, A. 1970. Coronary heart disease in seven countries. Circulation, 41: (4-supplement I).
- Keys, A.; Anderson, J.T. & Grande, F. 1965. Serum cholesterol response to changes in the diet. IV Particular saturated fatty acids in the diet. Metabolism, 14:776.
- Kicha, M.A.M.; Osman, M.A.; Riad, S.A. & Kama, G.A.R. 1979. Relation between yolk cholesterol and some economic characters in chickens. Egyptian Journal of Animal Production, 19(1): 115.
- Kinley, L.J. & Krause, R.F. 1958. Serum cholesterol determinations an affected by vitamin A. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 99(1): 244.
- Kovacs, M.I.P. 1990. Determination of cholesterol in pasta products using gas-liquid chromatography. Journal of Cereal Science, 11: 291.
- Kris-Etherton, P.M.; Krummel, D.; Russell, M.E.; Dreon, D.; Mackey, S.; Borchers, J. & Wood, P.D. 1988. The effect of diet on plasma lipids, lipoproteins, and coronary heart disease. Journal of the American Dietetic Association, 88: 1373

- Kritchevsky, D. & Tepper, S.A. 1961. The free and ester sterol content of various foodstuffs. Journal Nutrition, 74: 441.
- Labrador, O.L. & Sangronis, E. 1987. Determinacion del contenido de colesterol de algunos alimentos de amplio consumo en Venezuela. Acta Científica Venezolana, 38(2): 262.
- Lillienberg, L. & Svanborg, A. 1976. Determination of plasma cholesterol: comparison of gas-liquid chromatographic, colorimetric and enzymatic analyses. Clinica Chimica Acta, 68: 223.
- Mann, G.V. 1961. A method for measurement of cholesterol in blood serum. Clinica Chemistry, 7(3): 275.
- Mattson, F.H.; Erickson, B.A & Kligman, A.M. 1972. Effect of dietary cholesterol on serum cholesterol in man. The American Journal of Clinical Nutrition, 25: 589.
- McNaughton, J.L. 1978. Effect of dietary fiber on egg yolk, liver, and plasma cholesterol concentrations of the laying hen. Journal Nutrition, 108: 1842.
- Metzler, D.E. 1977. Biochemistry - The chemical reactions of living cells. London. Academic Press. pg. 727-735

- Morgan, J.B.; Calkins, C.R. & Mandigo, R.W. 1988. Effect of trim level, cooking method, and chop type on lipid retention, caloric content, and cholesterol level in cooked pork. Journal of Food Science, 53(6): 1602.
- National Cholesterol Education Program. 1988. Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Archives of Internal Medicine, 148: 36.
- Oguntona, T. & Hughes, B.L. 1988. Cholesterol and fatty acid content of Guinea Fowl (Numida meleagris) egg. Food Chemistry, 30: 211.
- Pandey, N.K.; Panda, B.; Maitra, D.N. & Mahapatra, C.M. 1988. The influence of strain, age and season on cholesterol, vitamin A and fatty acid contents of egg. Journal Food Science and Technology, 26(3): 161.
- Pie, J.; Spahis, K. & Seillan, C. 1990. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38: 973.
- Prusa, K.J. & Hughes, K.V. 1986. Cholesterol and selected attributes of pork tenderloin steaks heated by conventional, convection and microwave ovens to two internal endpoint temperatures. Journal of Food Science, 51(5): 1139.

- Prusa, K.J. & Lonergan, M.M. 1987. Cholesterol content of broiler breast fillets heated with and without the skin in convection and conventional ovens. Poultry Science, 66: 990.
- Reiser, R. 1975. Fat has less cholesterol than lean. Journal Nutrition, 105: 15.
- Reiser, R. 1978. Oversimplification of diet:coronary heart disease relationships and exaggerated diet recommendations. The American Journal of Clinical Nutrition, 31: 865.
- Reitmeier, C.A. & Prusa, K.J. 1987. Cholesterol content and sensory analysis of ground pork as influenced by fat level and heating. Journal of Food Science, 52(4): 916.
- Rhee, K.S.; Dutson, T.R.; Smith, G.C., Hostetler, R.L. & Reiser, R. 1982a. Cholesterol content of raw and cooked beef longissimus muscles with different degrees of marbling. Journal of Food Science, 47: 716.
- Rhee, K.S.; Dutson, T.R. & Smith, G.C. 1982b. Effect of changes in intermuscular and subcutaneous fat levels on cholesterol content of raw and cooked beef steaks. Journal of Food Science, 47: 1638.
- Rhee, K.S.; Smith, G.C. & Dutson, T.R. 1988. Relationships of ether-extractable fat vs Folch fat and fat content vs cholesterol content for beef longissimus muscles. Journal of Food Science, 53(3): 969.

- Riad, S.A.; Kicka, M.A.M.; Osman, M.A. & Kamar, G.A.R. 1981. Yolk cholesterol in eggs from various avian species. Egyptian Journal of Animal Production, 2(1): 51.
- Schoenheimer, R. & Sperry, W.M. 1934. A micromethod for the determination of free and combined cholesterol. Journal Biological Chemistry, 106: 745.
- Searcy, R.L. & Bergquist, L.M. 1960. A new color reaction for the quantitation of serum cholesterol. Clinica Chimica Acta, 5: 192.
- Shen, C.J.; Chen, I.S. & Sheppard, A.J. 1982. Enzymatic determination of cholesterol in egg yolk. Journal of the Association Official Analytical Chemists, 65(5): 1222.
- Sim, J.S. & Bragg, D.B. 1977. Effect of dietary factors on serum and egg yolk cholesterol levels of laying hens. Poultry Science, 56: 1616.
- Slover, H.T.; Thompson Jr., R.H.; Merola, G.V. 1983. Determination of tocopherols and sterols by capillary gas chromatograph. Journal of the American Oil Chemists' Society, 60(8): 1524.
- Smolińska, T. & Trziszka, T. 1982. The vitelline membrane dynamics of cholesterol metabolism in hens' eggs. Food Chemistry, 8: 215.

- Sperry, W.M. & Brand, F.C. 1943. The colorimetric determination of cholesterol. Journal Biological Chemistry, 150: 315.
- Sperry, W.M. & Webb, M. 1950. A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. Journal Biological Chemistry, 187: 97.
- Stoy, D.B. 1989. Controlling cholesterol with diet. American Journal of Nursing, 89(12): 1625.
- Stromer, M.H.; Goll, D.E. & Roberts, J.H. 1966. Cholesterol in subcutaneous and intramuscular lipid depots from bovine carcasses of different maturity and fatness. Journal of Animal Science, 25: 1145.
- Sweeney, J.P. & Weihrauch, J.L. 1976. Summary of available data for cholesterol in foods and methods for its determination. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 8: 131.
- Teekell, R.A.; Breidenstein, C.P. & Watts, A.B. 1975. Cholesterol metabolism in the chicken. Poultry Science, 54: 1036.
- Tu, C.; Powrie, W.D. & Fennema, O. 1967. Free and esterified cholesterol content of animal muscles and meat products. Journal of Food Science, 32: 30.
- Weiss, J.F.; Naber, E.C. & Johnson, R.M. 1964. Effect of dietary fat and other factors on egg yolk cholesterol. Archives of Biochemistry and Biophysics, 105: 521.

Wheeler, T.L.; Davis, G.W.; Stoecker, B.J. & Harmon, C.J. 1987. Cholesterol concentration of longissimus muscle, subcutaneous fat and serum of two beef cattle breed types. Journal of Animal Science, 65: 1531.

Van Elswyk, M.E.; Schake, L.S. & Hargis, P.S. 1991. Research note: evaluation of two extraction methods for the determination of egg yolk cholesterol. Poultry Science, 70: 1258.

Zak, B. 1980. Cholesterol methodology for human studies. Lipids, 15(9): 698.

Zlatkis, A.; Zak, B. & Boyle, A.J. 1953. A new method for the direct determination of serum cholesterol. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 41: 486.