

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EM FARINHA DE CARNE E OSSOS
EM MISTURA DE ALIMENTOS PARA RUMINANTES UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA GASOSA**

CECÍLIA MULLER BANDEIRA

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2007

CECÍLIA MULLER BANDEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EM FARINHA DE CARNE E OSSOS
EM MISTURA DE ALIMENTOS PARA RUMINANTES UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA GASOSA**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre
em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de
Produtos de Origem Animal

Orientador: *Prof. Dr. José Maria Ferreira*
Co-orientadora: *Profa. Dra. Neura Bragagnolo*

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2007

B214d **Bandeira, Cecília Muller, 1978-**

Desenvolvimento e validação de um método para determinação de colesterol em farinha de carne e ossos em mistura de alimentos para ruminantes utilizando cromatografia gasosa/ Cecília Muller Bandeira. – 2007.

81 p. : il.

Orientador: José Maria Ferreira

Co-orientadora: Neura Bragagnolo

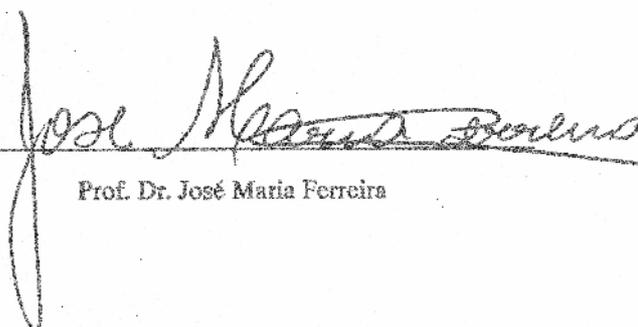
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

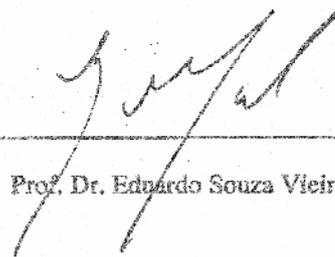
1. Ruminante – Alimentação e rações – Teses. 2. Farinha de carne e osso como ração – Teses. 3. Análise cromatográfica – Teses. 4. Espectrometria de massa – Teses. I. Ferreira, José Maria. II. Bragagnolo, Neura. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.208 5

Dissertação defendida e aprovada em 28/02/2007, pela Comissão Examinadora, constituída por:



Prof. Dr. José Maria Ferreira



Prof. Dr. Eduardo Souza Vieira Machado



Profa. Eloísa de Oliveira Simões Saliba

DEDICATÓRIA

Ao Júlio pelo amor, companheirismo e paciência em todos os momentos.

À minha família e amigos pelo apoio constante e por entenderem e aceitarem o tempo e a distância.

Em especial à minha mãe, irmãos e ao meu pai que de uma forma ou de outra, acredito que sempre esteve ao meu lado.

Enfim, à vocês que sempre me acompanharam e ajudaram a tornar-me uma pessoa melhor !!!

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Maria Ferreira, pela oportunidade, por confiar, apoiar e orientar este trabalho.

À professora Neura Bragagnolo, pela orientação, confiança, por sua imprescindível presença em toda a parte experimental, pela paciência nos ensinamentos da cromatografia e pelo empenho e disposição em iniciar um trabalho pioneiro.

Aos professores Eloísa Oliveira Simões Saliba e Eduardo Souza Vieira Machado pela participação na avaliação desta dissertação.

Aos fiscais federais agropecuários Ronaldo Linaris Sanches e Helena Queiroz Müller, amigos do Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO, pela sugestão do tema e apoio fundamental durante toda a pesquisa.

Ao professor Júlio César Cambraia Veado, pela orientação, ajuda, paciência e incentivo em todo o trabalho.

Aos alunos de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da UNICAMP, Gisela, Wellington, Veridiana, Adélia, Leila, Renata e Daniela; às funcionárias Liliâne, Rosemar e Karla e à Profa. Adriana Zerlotti Mercadante, meu muito obrigado pela receptividade e ajuda constante.

Às colegas Gislaine e Lílian, pós-graduandas da FEA, pela colaboração especial, ensinamentos, disponibilidade e grande paciência durante toda a parte experimental.

Aos meus amigos, alunos de graduação e também de pós-graduação da UFMG: Guilherme Domingos e Ricardo.

À Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

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

À CAPES, pela bolsa de estudo.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

Ao LANAGRO/Campinas pelas análises microscópicas e material cedido.

À toda equipe do Colegiado de Pós-Graduação e Biblioteca da Escola de Veterinária

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	10
	LISTA DE FIGURAS	12
	LISTA DE QUADROS	14
	RESUMO	15
	ABSTRACT	16
1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1.	Encefalopatia espongiiforme bovina.....	17
2.2.	Esteróis: colesterol e fitoesteróis	21
2.2.1.	Biosíntese de esteróis.....	21
2.2.2.	Colesterol em produtos de origem vegetal	23
2.3.	Saponificação e extração da matéria insaponificável	24
2.4.	Métodos utilizados para determinação de colesterol.....	24
2.4.1.	Cromatografia.....	25
2.4.1.1.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	25
2.4.1.2.	Cromatografia gasosa (CG).....	25
2.4.2.	Espectrometria de massas.....	27
2.5.	Validação de métodos analíticos.....	27
3.	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1.	Material e reagentes	28
3.2.	Métodos	29
3.3.	Preparo das amostras.....	29
3.3.1	Saponificação da amostra com aquecimento	29
3.3.2.	Extração dos lipídios por Folch seguida de saponificação com aquecimento.....	29
3.3.3.	Hidrólise ácida e extração dos lipídios em equipamento Soxhlet, seguida de saponificação com aquecimento	30
3.3.4.	Hidrólise enzimática e extração dos lipídios, seguida de saponificação com aquecimento.....	31
3.3.5.	Saponificação da amostra sem aquecimento	32
3.3.6.	Planejamento para otimização do preparo das amostras	34
3.3.6.1.	Planejamento (I)	34
3.3.6.2.	Planejamento (II)	35
3.4.	Equipamentos e condições cromatográficas	35
3.4.1.	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	36
3.4.1.1.	CLAE e detector UV-visível	36
3.4.1.2.	CLAE e detector por arranjo de díodos – Espectrômetro de massas.....	36
3.4.2.	Cromatografia gasosa.....	36
3.4.3.	Ensaio preliminares e determinação das condições cromatográficas ideais para cromatografia gasosa	37
3.5.	Validação do método	39
3.5.1.	Preparo de soluções padrão	39
3.5.2.	Quantificação do teor de colesterol.....	39
3.5.2.1.	Determinação da concentração de colesterol em amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos.....	40
3.5.2.2.	Determinação da concentração de colesterol em amostras de farinha de carne e ossos (35 %).....	40
3.5.2.3.	Determinação da concentração de colesterol em amostras de ração com adição de farinha de carne e ossos.....	40
3.5.2.4.	Determinação da concentração de colesterol em amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo	40
3.5.3.	Linearidade.....	40
3.5.4.	Seletividade e especificidade.....	40

3.5.5.	Limites de detecção e quantificação do equipamento	40
3.5.6.	Precisão	41
3.5.7.	Exatidão	41
3.5.8.	Robustez.....	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1.	Preparo da amostra	42
4.2.	Planejamento da otimização do preparo das amostras	49
4.3.	Equipamentos e condições cromatográficas	57
4.4.	Validação do método	58
4.4.1.	Quantificação do teor de colesterol.....	58
4.4.1.1.	Determinação da concentração de colesterol em amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos.....	59
4.4.1.2.	Determinação da concentração de colesterol em amostras farinha de carne e ossos (35 %)	60
4.4.1.3.	Determinação da concentração de colesterol em amostras de ração com adição de farinha de carne e ossos.....	61
4.4.1.4.	Determinação da concentração de colesterol em amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo	62
4.4.2.	Linearidade.....	63
4.4.3.	Seletividade e especificidade.....	64
4.4.4.	Limite de detecção e quantificação do equipamento.....	67
4.4.5.	Precisão.....	68
4.4.6.	Exatidão	68
4.4.7.	Robustez.....	69
4.5.	Considerações finais	72
5.	CONCLUSÕES	73
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de casos de EEB no Reino Unido de 1987 até 2006	19
Tabela 2	Número de casos de EEB no mundo, com exceção do Reino Unido, de 1989 até 2006.....	20
Tabela 3	Quantidades de amostras e reagentes utilizados na saponificação com aquecimento.....	29
Tabela 4	Quantidades de amostra e reagentes utilizados na hidrólise ácida.....	30
Tabela 5	Quantidade de reagentes utilizados na saponificação com aquecimento, de acordo com Saldanha et al. (2004), após hidrólise ácida.....	30
Tabela 6	Quantidades de amostra e reagentes utilizados na hidrólise enzimática	31
Tabela 7	Quantidade de reagentes utilizados na saponificação com aquecimento de acordo com Saldanha et al. (2004), após hidrólise enzimática	31
Tabela 8	Condições de centrifugação testadas para extração dos lipídios com hexano, após hidrólise enzimática.....	32
Tabela 9	Quantidades de amostra e reagentes utilizados no método de saponificação da amostra sem aquecimento (teste 1).....	32
Tabela 10	Quantidades de amostra e reagentes utilizados no método de saponificação da amostra sem aquecimento (teste 2).....	33
Tabela 11	Quantidades de amostra e reagentes utilizados no método de saponificação da amostra sem aquecimento (teste 3).....	33
Tabela 12	Quantidades de amostra e reagentes testados, utilizando saponificação das amostras sem aquecimento (teste 4).....	34
Tabela 13	Quantidades de reagentes utilizados na saponificação de 10 g de amostra, sem aquecimento (Teste 5)	34
Tabela 14	Variáveis independentes aplicadas no planejamento I (fatorial 2^{8-4}) para otimização da extração do colesterol	35
Tabela 15	Variáveis independentes aplicadas no planejamento II (fatorial completo 2^3) para otimização da extração do colesterol	35
Tabela 16	Condições do cromatógrafo gasoso utilizando coluna DB1701 [®]	38
Tabela 17	Condições testadas no cromatógrafo gasoso utilizando coluna VA-WAX [®] no modo de injeção splitless e temperatura do injetor de 300 ° C	39
Tabela 18	Resultado do planejamento I, fatorial 2^{8-4} e resposta dada pela área do pico de colesterol por unidade de peso (g), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência	49
Tabela 19	Efeitos das variáveis independentes no valor da área do pico de colesterol/g de amostra obtidas no CLAE, utilizando como parâmetro o erro puro	50
Tabela 20	Resultado do planejamento II, fatorial completo 2^3 e resposta dada pela área do pico de colesterol por unidade de peso (g), utilizando a cromatografia gasosa	51
Tabela 21	Coefficientes de regressão do modelo, utilizando como parâmetro o erro puro, no planejamento II	52
Tabela 22	Análise de variância	53
Tabela 23	Amostras preparadas de acordo com fluxograma para verificação do coeficiente de variação e validação do planejamento	57
Tabela 24	Concentrações de colesterol em amostras de ração de diferentes procedências	59
Tabela 25	Concentrações de colesterol obtidas de amostras de ração utilizadas para a validação	59
Tabela 26	Concentração de colesterol em amostras de farinha de carne e ossos (35 %PB).....	60
Tabela 27	Concentrações de colesterol nas amostras de ração adicionadas de farinha de carne e ossos nas proporções de 3, 4, 5, 6 e 7 %	61
Tabela 28	Exemplo da concentração final de colesterol em uma ração (com baixa concentração de colesterol) adicionada de 6 % farinha de carne e ossos	62
Tabela 29	Concentrações de colesterol em amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo	62
Tabela 30	Valores de y observado, y esperado e de resíduo do padrão de colesterol	63
Tabela 31	Valores de y observado, y esperado e de resíduo da matriz adicionada de padrão de colesterol.....	63

Tabela 32	Comparação entre concentrações de colesterol obtidas em amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos, analisadas neste experimento e em outro laboratório	67
Tabela 33	Concentrações de colesterol obtidas pela injeção de 0,001 mg/mL de padrão	68
Tabela 34	Valores de concentração obtidos na repetitividade em seis repetições das seis concentrações de colesterol analisadas e respectivos valores de coeficiente de variação	68
Tabela 35	Valores de recuperação obtidos no presente trabalho	69
Tabela 36	Valores de concentração obtidas nas análises de robustez, em 3 replicatas, com as respectivas médias, desvio padrão e coeficiente de variação	70
Tabela 37	Comparação dos valores de média, desvio padrão, desvio padrão do erro e intervalos entre amostras padrão e amostras que foram preparadas com hexano de marca diferente	70
Tabela 38	Comparação dos valores de média, desvio padrão, desvio padrão do erro e intervalos entre amostras padrão e amostras que foram deixadas maior tempo em contato com solvente	71
Tabela 39	Comparação dos valores de média, desvio padrão, desvio padrão do erro e intervalos entre amostras padrão e amostras que foram injetadas com seringa diferente	71
Tabela 40	Comparação dos valores de média, desvio padrão, desvio padrão do erro e intervalos entre amostras injetadas imediatamente antes e depois da limpeza do <i>insert</i>	72
Tabela 41	Comparação dos valores de média, desvio padrão, desvio padrão do erro e intervalos entre amostras padrão e amostras padrão e amostras armazenadas por 10 dias depois de preparadas	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica dos países que notificaram ao menos um caso confirmado de EEB, de 1986 a 2006.....	20
Figura 2	Biosíntese do colesterol.....	22
Figura 3	Cromatogramas de amostras de farinha de carne e ossos (A) e ração para ruminantes sem adição de farinha de carne e ossos (B), preparadas com 5 g, obtidas pelo método de Folch e injeção em CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol (85:15), coluna C ₁₈ , 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão de 2 mL/min. Pico (1): colesterol.....	43
Figura 4	Cromatograma de amostra de ração (com adição de 10 % de farinha de carne e ossos), preparada com 10 g, obtida por hidrólise ácida e injeção em CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol (98:02), coluna C ₁₈ , 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão de 2 mL/min. Área demarcada com círculo: colesterol.....	44
Figura 5	Cromatograma típico de amostra de ração para ruminantes (com adição de 10 % de farinha de carne e ossos), preparadas com 10 g, obtida por hidrólise enzimática e injeção em CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol (98:02), coluna C ₁₈ , 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão de 2 mL/min. Pico (1) colesterol.....	45
Figura 6	Cromatogramas de amostras de ração (com adição de 10 % de farinha de carne e ossos) preparadas com 2 g de amostra, obtidos pelo método de saponificação da amostra sem aquecimento e injeção em CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol: A (70:30); B (85:15); C (95:05); D (98:02); E (99:01); F (100 % acetonitrila), coluna C ₁₈ , 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão de 2 mL/min. Área circundada: colesterol. Pico (1) colesterol.....	47
Figura 7	Cromatograma de amostra de ração (com adição de 10 % de farinha de carne e ossos) preparadas com 10 g, obtida pelo método de saponificação da amostra sem aquecimento e injeção em CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol (98:02); coluna C ₁₈ , 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão de 2 mL/min. Área circundada: colesterol.....	48
Figura 8	Gráfico de Pareto.....	52
Figura 9	Valores experimentais x valores preditos pelo modelo.....	53
Figura 10	Superfície de resposta para a área relativa do colesterol em função do número de extrações e tempo de saponificação.....	54
Figura 11	Superfície de resposta para a área relativa do colesterol em função do número de extrações e volume de água para neutralização.....	54
Figura 12	Superfície de resposta para a área relativa do colesterol em função do volume de água para neutralização e tempo de saponificação.....	55
Figura 13	Fluxograma de preparo das amostras de ração por saponificação da amostra sem aquecimento.....	55
Figura 14	Imagens das etapas de preparo das amostras utilizando o método de saponificação da amostra sem aquecimento. (A) amostras após saponificação; (B) transferência de amostra para realização da etapa de extração; (C) Adição de hexano para extração dos insaponificáveis; (D e E) lavagem das amostras com água destilada para neutralização do KOH.....	56
Figura 15	Representação gráfica da curva de calibração dos padrões de colesterol, com a equação da reta e coeficiente de determinação (r ²).....	59
Figura 16	Cromatograma de amostra de ração, obtido por CG. Condições cromatográficas: Coluna polar (polietilenoglicol) fase móvel hidrogênio e detector de ionização em chamas. Área circundada: Pico central: colesterol.....	60
Figura 17	A) Curva da linearidade do padrão com a equação da reta e coeficiente de determinação (r ²). B) Gráfico de resíduos do padrão de colesterol.....	64

Figura 18	A) Curva da linearidade com matriz com a equação da reta e coeficiente de determinação (r^2). B) Gráfico de resíduos das amostras de ração adicionadas de padrão de colesterol	64
Figura 19	Cromatograma de amostra de ração, obtido por CG, no tempo de 25 a 50 minutos. Condições cromatográficas: Coluna polar de polietilenoglicol, fase móvel hidrogênio e detector de ionização em chamas. Picos: (1) colesterol; (2) campesterol; (3) estigmasterol; (4) β -sitosterol.....	65
Figura 20	Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência e detector por arranjo de diodos. A: padrão de colesterol. B: amostra de milho, farelo de soja e farelo de trigo. C: amostra de milho, farelo de soja e farelo de trigo fortificadas com padrão de colesterol. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol (98:02); coluna C_{18} , 100 x 4,6mm x 4 μ m (Chromolith, Merck), vazão de 1 mL/min.....	65
Figura 21	Cromatograma de amostra de milho (A), farelo de soja (B), farelo de trigo (C) e padrão de colesterol (D), obtidos por CG. Condições cromatográficas: coluna polar (polietilenoglicol), fase móvel hidrogênio e detector de ionização em chamas. Pico (1) Colesterol.....	66
Figura 22	Espectro de massa do colesterol (369) em amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo, obtido com fonte de ionização APCI em cromatógrafo líquido. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol (98:02); coluna C_{18} , 100 x 4,6mm x 4 μ m (Chromolith, Merck), vazão 1 mL/min. Condições do EM: analisador <i>ion-trap</i> , fonte APCI à 450°C, modo positivo, corona à 4000 nA, dry gas N_2 à 350°C, fluxo 5 L/min, nebulizador à 65 psi, energia de fragmentação do MS/MS 1,4 V, faixa de aquisição 100 a 700.....	67
Figura 23	Valores de dispersão da recuperação nas seis repetições das concentrações de colesterol	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Propriedades físico-químicas do colesterol.....	21
Quadro 2	Concentração máxima de gordura saturada (g/100 g) em produtos considerados isentos de colesterol, de acordo com Brasil (1998)	23
Quadro 3	Proporções de fase móvel testadas na cromatografia líquida	33
Quadro 4	Proporções de solvente acetonitrila:isopropanol testadas para solubilização da amostra	33
Quadro 5	Condições utilizadas na cromatografia gasosa	37

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método utilizando cromatografia para detecção de farinha de carne e ossos (FCO) em mistura de alimentos (ração) para ruminantes, pela determinação de colesterol, a fim de evitar a contaminação dos animais com a doença encefalopatia espongiiforme bovina. Foram testados cinco métodos para o preparo da amostra e destes, a saponificação da amostra sem aquecimento foi selecionado. As melhores condições para saponificação e extração da matéria insaponificável foram definidas por planejamentos experimentais, fatorial e completo, com pontos centrais. A técnica de cromatografia gasosa (CG) foi escolhida devido a sua maior sensibilidade e melhor separação do pico de colesterol, na presença de outros esteróis. Foi utilizada coluna capilar polar de polietilenoglicol 30mx0,25mmx0,25µm e detector por ionização em chamas (DIC). As condições do CG foram: injeção 1 µL, injetor à 260 °C, coluna à 100 °C/2 min e à 260 °C/48 min (15 °C/min), fluxo 1,68 mL/min, gás de arraste hidrogênio e DIC à 300 °C. A identificação do colesterol foi feita por comparação do tempo de retenção do padrão e da amostra e por co-cromatografia e a confirmação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas (EM). Parâmetros da CLAE: fase móvel acetonitrila:isopropanol (98:02); coluna C₁₈, 100x4,6mmx4µm (Chromolith), vazão 1 mL/min. Parâmetros do EM: analisador *ion-trap*, fonte APCI à 450 °C, modo positivo, corona à 4000 nA, *dry gas* N₂ à 350 °C, fluxo 5 L/min, nebulizador à 65 psi, energia de fragmentação MS/MS 1,4 V, faixa de aquisição 100 a 700 (m/z). O método foi validado por seletividade, especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez. O pico de colesterol apresentou excelente resolução e a CLAE-EM confirmou especificidade. Os coeficientes de determinação para avaliação da linearidade foram superiores a 0,9997. O LD e LQ foram 0,001 e 0,003 mg/g, respectivamente. A recuperação e coeficiente de variação (CV) nas amostras de ração fortificadas com padrão de colesterol (0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL) foram respectivamente de 84 a 86,7 % e de 2,9 a 4,0 %. As concentrações de colesterol obtidas na ração e na FCO foram, respectivamente 0,02 e 0,4 mg/g. O método proposto apresentou precisão, exatidão e a capacidade de detectar FCO na ração, pela determinação de colesterol, em concentrações superiores a 0,025 mg/g.

Palavras-chave: Encefalopatia espongiiforme bovina, ruminantes, ração, farinha de carne e ossos, colesterol, cromatografia, espectrometria de massas, validação.

ABSTRACT

This work aimed at developing and validating a chromatographic method for detection meat and bone meals (MBM) in ruminant feed by cholesterol determination, focusing to avoid the animal contamination with bovine spongiform encephalopathy. Five methods for sample preparation were tested and from these, sample saponification without heating was chosen. The best conditions for saponification and extraction of unsaponified matter were defined using factorial and complete designs with central points. Gas chromatography (GC) was chosen due its higher sensibility and better separation of peak cholesterol at presence of other sterols. Was used polar capillary column of polyeteneglycol 30mx0,25mmx0,25µm and flame ionization detector (FID). GC conditions were: injection 1 µL, insert 260 °C, column 100 °C/2min and 260 °C/48min (15 °C/min), flow 1,68 mL/min, drag gas hydrogen and FID 300 °C. Cholesterol was identified by comparison of retention times of the samples and standard and co-chromatography and confirmed by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). HPLC parameters: mobile phase acetonitrile:isopropanol (98:02); column C₁₈, 100x 4,6mmx4µm (Chromolith), flow 1 mL/min. MS-MS parameters: íon-trap analyzer, APCI ionization source: 450 °C, positive mode, corona: 4000 nA, dry gas N₂: 350°C, flow 5 L/min, nebulizer: 65 psi, MS/MS fragmentation energy 1,4 V, acquisition 100 to 700 (m/z). The method was validated by selectivity, specificity, linearity, detection limit (DL), quantification limit (QL), precision, trueness and robust. Cholesterol peak show excellent resolution and HPLC-MS confirmed specificity. Determination coefficient for linearity evaluation were higher than 0,9997. DL and QL were 0,001 and 0,003 mg/g, respectively. Recovery e variation coefficient (VC) at ruminant feed samples fortified with cholesterol standard (0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL) were respectively 84-86,7 % and 2,9-4,0 %. Cholesterol concentrations obtained from ruminant feed and MBM were, respectively 0,02 and 0,4 mg/g. The method show precision, trueness and capacity of detect MBM in ruminant feed by cholesterol determination in concentrations higher than 0,025 mg/g.

Keywords: Bovine spongiform encephalopathy, ruminants, feed, meat and bone meal, cholesterol, chromatography, mass spectrometry, validation.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país essencialmente agropecuário e possui o maior rebanho bovino do mundo, com aproximadamente 195,5 milhões de cabeças, em sua grande maioria criados em sistema extensivo. Tem como mercado importador da carne e produtos cárneos, países como Emirados Árabes, África, China, Japão, Rússia, União Européia e Estados Unidos da América (Rebanho, 2007).

Os países importadores exigem que a carne provenha de animais alimentados em pastagens e quando suplementados, que os ingredientes não contenham subprodutos de origem animal, a fim de evitar a contaminação do gado com a doença conhecida por encefalopatia espongiforme bovina.

A associação da encefalopatia espongiforme bovina à doença de Creutzfeldt-Jakob em humanos, resultou, entre outras providências, na criação de legislações que proíbem o uso de determinados subprodutos de origem animal na alimentação de ruminantes. O controle desta proibição, entretanto, é feito com dificuldade visto que poucas são as técnicas capazes de efetivá-lo.

A presença de alguns subprodutos de origem animal no suplemento (ração) para ruminantes pode ser detectada pela concentração de colesterol, que é um componente da gordura animal. Diversas técnicas cromatográficas vêm sendo utilizadas para a detecção do colesterol, identificando-o com precisão e exatidão em diversos substratos.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método para detecção de farinha de carne e ossos em suplemento (ração) para ruminantes utilizando cromatografia para determinação de colesterol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Encefalopatia espongiforme bovina

A encefalopatia espongiforme (EE) é uma doença que acomete tanto o homem quanto os animais, e dentre estes, acomete principalmente,

o gado ovino e bovino. Nos ovinos e caprinos a doença é chamada de *scrapie*. Nos bovinos é conhecida como "doença da vaca louca" (Prusiner, 1997; Infections, 1999; Rodrigues, 2005).

Nos bovinos, os primeiros relatos desta enfermidade ocorreram em 1986, no Reino Unido. O seu surgimento foi claramente relacionado às alterações no tempo e temperatura de processamento para obtenção de farinha de carne e ossos proveniente de ovinos e o fornecimento de rações para bovinos contendo esta farinha de carne e ossos (Bovine, 1996; Prusiner, 1997; Pituco e Stefano, 2005).

Segundo Butolo (2002), mesmo que a farinha de carne e ossos, que hoje é destinada à fabricação de ração de outras espécies animais, seja submetida a um cozimento sob pressão ao redor de 80 a 100 PSI, por um período de 1 a 2 horas e temperatura de até 120 °C, ainda oferece risco ao desenvolvimento da encefalopatia espongiforme bovina (EEB).

Portanto, acredita-se que as alterações no processamento da farinha de carne e ossos, permitiram que o agente infeccioso oriundo da *scrapie* sobrevivesse e contaminasse os bovinos (Bovine, 1996; Prusiner, 1997; Pituco e Stefano, 2005).

No homem a EE foi atribuída ao consumo de produtos cárneos contaminados com tecidos oriundos do sistema nervoso central de bovinos (Azevedo e Moraes, 2004; Pituco e Stefano, 2005). Este tecido é contaminado com um novo tipo de agente infeccioso denominado *prion*, que é um derivado mutante de uma proteína da membrana de células nervosas que quando modificada, interage com o material genético do hospedeiro (DNA) produzindo mais proteína, cujo acúmulo anormal provoca um quadro degenerativo crônico (Butolo, 2002; Azevedo e Moraes, 2004; Pituco e Stefano, 2005; Rodrigues, 2005). O prion está presente em vários tipos de células, incluindo linfócitos e músculos (Prusiner, 1997; Infections, 1999). De acordo com a Encephalopatias (2006) a quantidade infectante é de 0,001 g de proteína mutante

(*prion*), sendo que quantidades inferiores a 0,0001 g não causam a doença.

A EE é considerada uma das mais graves zoonoses existentes, pois não há tratamento e não é possível realizar o diagnóstico *in vivo* nos bovinos portadores (Azevedo e Moraes, 2004).

Visando preservar o patrimônio pecuário do país, as autoridades sanitárias brasileiras impuseram rigorosas medidas sanitárias, dentre as quais a rastreabilidade de animais importados visando a eliminação destes (Bellaver, 2005; Costa e Borges, 2000; Azevedo e Moraes, 2004; Pituco e Stefano, 2005).

Brasil (1997) declara o país livre de EE e em 2003, uma missão europeia avaliou o risco geográfico dos rebanhos brasileiros e considerou satisfatórias as garantias fornecidas pelo Governo a respeito dos bovinos importados. Tal garantia era devido ao fato de que os animais criados no Brasil eram alimentados em sistema extensivo e a suplementação alimentar, quando ocorria, utilizava exclusivamente fontes de proteína de origem vegetal (Azevedo e Moraes, 2004; Pituco e Stefano, 2005).

Brasil (2004a) proibiu em todo o território nacional a produção, a comercialização e a utilização de produtos destinados à alimentação de ruminantes que contenham em sua composição proteínas e gorduras de origem animal. Incluem-se nesta proibição a cama de aviário e os resíduos da criação de suínos. Proibiu também a produção, a comercialização e a utilização de produtos para uso veterinário, destinados a ruminantes, que contenham em sua formulação insumos oriundos de ruminantes. Excluem-se da proibição, o leite e os produtos lácteos e a farinha de ossos calcinados (sem proteínas e gorduras).

Brasil (2004b) exclui da proibição, o sêmen e embriões, sebo desproteinado (com impurezas insolúveis correspondendo no máximo a 0,15 % do peso) e produtos derivados do mesmo, assim como gelatina e colágeno preparados exclusivamente a partir de couros e peles.

Devido a proibição do uso de farinha de carne e ossos em rações destinadas a alimentação de ruminantes, o farelo de soja foi o ingrediente mais utilizado para o balanceamento de

proteínas, além de aminoácidos naturais e sintéticos (Butolo, 2002).

Apesar de o Brasil apresentar baixo risco para o aparecimento da EEB, o acompanhamento da qualidade e origem dos componentes da mistura de alimentos para ruminantes, constituem importante instrumento de vigilância desta doença (Butolo, 2002; Sanches et al., 2006).

Na literatura encontram-se alguns métodos para a detecção de subprodutos de origem animal no alimento para ruminantes. Ansfield et al. (2000a, b), Gizzi et al. (2003a, b) e Chen et al. (2004) verificaram a presença de proteína animal, pela técnica de imunoensaio. Bellagamba et al. (2001, 2003 e 2006), Kingombe et al. (2001), Krcmar e Rencova (2003 e 2005) e Fumiere et al. (2006) desenvolveram um método por PCR para a identificação de DNA específico. Niederer e Bollhalder (2001) desenvolveram um método baseado na detecção de esfingolipídios de tecido nervoso central por cromatografia gasosa e Baeten et al. (2005) desenvolveram um método por microscopia *near-infrared* (NIRM) para detecção de farinha de carne e ossos. Sanches et al. (2006) validaram um método de microscopia, baseado na observação da morfologia de fragmentos, em sua forma bruta, com auxílio de microscópio estereoscópico e avaliação da estrutura histológica de partículas finas com microscópio óptico. A microscopia é o método aprovado por Brasil (2003c) e pela União Europeia (Comissão, 2003) para detecção de subprodutos de origem animal nas misturas de alimentos (rações) para ruminantes.

Outros métodos de detecção foram propostos para determinação da presença de produtos originados de ruminantes em outros tipos de substratos, os quais foram baseados na distinção entre proteínas de diferentes espécies animais (Wintero et al., 1990; Jemmi e Schlosser, 1991; Ebbehøj e Thomsen, 1991; Jemmi e Schlosser, 1993; Ansfield, 1994; Meyer et al., 1994; Morales et al., 1994; Meyer et al., 1995; Hofmann, 1996; Hofmann, 1997; Hunt et al., 1997; Hsieh et al., 1998; Waiblinger et al., 1998; Matsunaga et al., 1999; Murray et al., 2001; Brodman e Moor, 2003).

Os prejuízos comerciais em países onde foram confirmados casos do mal da vaca louca (Tabelas 1, 2 e Figura 1) envolveram, não somente a

queda no consumo interno da carne bovina, mas também no comércio exterior devido às barreiras sanitárias impostas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (Pituco e Stefano, 2005).

Desta forma, é necessário salientar a seriedade com que o Brasil está tratando este assunto, pois, além de ampliar mercados, pode ser oferecido aos consumidores brasileiros um produto com alta confiabilidade (Azevedo e Moraes, 2004; Pituco e Stefano, 2005).

Tabela 1 - Número de casos de EEB no Reino Unido de 1987 até 2006.

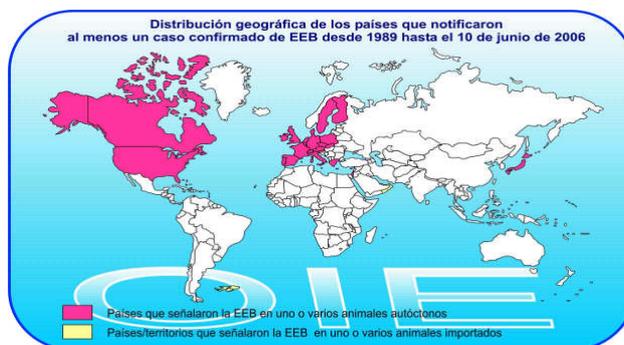
	Alderney	Gran Bretanha	Guernsey	Irlanda do Norte	Ilha de Man	Jersey	Total Reino Unido
1987 e antes	0	442	4	0	0	0	446
1988	0	2 469	34	4	6	1	2 514
1989	0	7 137	52	29	6	4	7 228
1990	0	14 181	83	113	22	8	14 407
1991	0	25 032	75	170	67	15	25 359
1992	0	36 682	92	374	109	23	37 280
1993	0	34 370	115	459	111	35	35 090
1994	2	23 945	69	345	55	22	24 438
1995	0	14 302	44	173	33	10	14 562
1996	0	8 016	36	74	11	12	8 149
1997	0	4 312	44	23	9	5	4 393
1998	0	3 179	25	18	5	8	3 235
1999	0	2 274	11	7	3	6	2 301
2000	0	1 355	13	75	0	0	1 443
2001	0	1.113	2	87	0	0	1 202
2002	0	1.044	1	98	0	1	1.144
2003	0	549	0	62	0	0	611
2004	0	309	0	34	0	0	343
2005	0	203	0	22	0	0	225
2006	0	104	0	10	0	0	114

Fonte: Información (2007).

Tabela 2 - Número de casos de EEB no Mundo, com exceção do Reino Unido, de 1989 até 2006.

País/Ano	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Alemanha	0	0	0	1	0	3	0	0	2	0	0	7	125	106	54	65	32	9
Áustria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2
Bélgica	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	3	9	46	38	15	11	2	
Canadá	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	5
República Checa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4	7	8	1
Dinamarca	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	6	3	2	1	1	
Eslováquia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	2	7	3	0
Eslovênia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	1
Espanha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	82	127	167	137	98	4
EUA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Finlândia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
França	0	0	5	0	1	4	3	12	6	18	31	161	274	239	137	54	31	
Grécia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Irlanda	15	14	17	18	16	19	16	73	80	83	91	149	246	333	183	126	69	39
Israel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Itália	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	48	38	29	7	8	2
Japão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	4	5	7	10
Liechtenstein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
Luxemburgo	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Países Baixos	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	20	24	19	6	3	
Polónia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	11	19	10
Portugal	0	1	1	1	3	12	15	31	30	127	159	149	110	86	133	92	46	
Suécia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Suíça	0	2	8	15	29	64	68	45	38	14	50	33	42	24	21	3	3	5
Total	15	17	31	34	50	104	102	161	160	252	336	513	1013	1035	778	535	336	90

Fonte: Adaptado de Información (2007).



Fonte: Información (2007).

Figura 1 – Distribuição geográfica dos países que notificaram ao menos um caso confirmado de EEB, de 1989 a 2006.

2.2. Esteróis: colesterol e fitoesteróis

Esteróides são compostos que possuem uma cadeia formada por 27 a 29 átomos de carbono, disposta em um núcleo esteróide e em uma cadeia lateral. Este núcleo é denominado ciclopentanoperidrofenantreno, sendo formado

pela fusão de quatro anéis de hidrocarbonetos (A, B, C, D). Três deles possuem 6 carbonos e um possui 5 carbonos. Devido a forma tetraédrica das ligações simples do carbono, os anéis não são planos, mas angulados e rígidos (Marinetti, 1990; Koolman e Röhm, 2005; Lehninger et al., 2006).

No grupo dos esteróides são encontrados, principalmente, os hormônios esteroidais, ácidos biliares, vitamina D e os esteróis. Esteróis são lipídios derivados (álcoois esteroidais), sendo, portanto, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Além disso, são estruturas de alto peso molecular e de caráter anfipático, de forma que, a cadeia lateral constituída de oito a dez carbonos na posição C-17 representa a parte apolar e o grupo hidroxila no C-3 representa a parte polar (Marinetti, 1990; Piironen et al., 2000; Koolman e Röhm, 2005; Lehninger et al., 2006).

Os esteróis diferem entre si pela presença e localização das duplas ligações nos anéis A e B e diferenças na cadeia lateral (Piironen et al., 2000; Volin, 2001; Lehninger et al., 2006). A cadeia lateral do núcleo esteróide pode estar localizada no plano do anel (equatorial) ou de forma aproximadamente vertical a ele (axial). Quando

estão na direção do observador são chamados de β -configuração e quando atravessam o plano da página são chamados de α -configuração (Koolman e Röhm, 2005).

Os esteróis compõem a membrana da maioria das células eucariotas, estando relacionados ao controle da permeabilidade e fluidez (Piironen et al., 2000; Berhman e Gopalan, 2005; Lehninger et al., 2006).

O colesterol é um sólido cristalino e está presente em todas as células animais, podendo ser encontrado também em células vegetais. Os fitoesteróis estão presentes em algumas células vegetais, sendo que os principais são: β -sitosterol, estigmasterol e campesterol (AI, 1997; Piironen et al., 2000; Volin, 2001; Berhman e Gopalan, 2005).

As propriedades físico-químicas do colesterol são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Propriedades físico-químicas do colesterol.

Fórmula química	$C_{27}H_{45}OH$
Peso molecular (g/mol)	386,87
Ponto fusão (°C)	148,5
Ponto ebulição (°C)	360*
Densidade (g/cm ³)	1,067

Fonte: Adaptado de Weast et al. (1965) e Ahmida et al. (2006).

* decomposição.

O colesterol é ligeiramente solúvel em água e álcool, solúvel em benzeno e muito solúvel em éter, dioxano e clorofórmio (Weast et al., 1965).

2.2.1. Biosíntese de esteróis

A síntese dos esteróis tem início no citoplasma das células, no qual é produzida a parte hidrofílica da molécula e depois é finalizada no retículo endoplasmático, onde é sintetizada a parte hidrofóbica (Marinetti, 1990).

A síntese bioquímica de todos os lipídios, tanto de origem animal quanto de origem vegetal é a mesma, ou seja, originam-se a partir do acetil-CoA (acetato ativado). Deste composto partem duas vias: uma principal para formação de ácidos graxos ativados e outra para a formação do isopreno ativo e posteriormente, os isoprenóides (Volin, 2001; Koolman e Röhm, 2005).

Após sucessivas reações, os isoprenóides (com 5 carbonos) dão origem aos esteróis. Esta síntese bioquímica pode ser dividida em quatro etapas. Na primeira, uma reação de condensação de três moléculas de acetil-CoA forma o mevalonato (6 carbonos). Uma das enzimas envolvidas nesta etapa é a hidroximetilglutaril-Coa redutase (HMG-CoA) que atua na regulação da formação do colesterol (Marinetti, 1990; Piironen et al., 2000; Koolman e Röhm, 2005; Lehninger et al., 2006), entretanto, esta enzima não parece ser reguladora da síntese de fitoesteróis (Piironen et al., 2000). Uma diminuição na síntese de fitoesteróis é associada com a supressão da atividade da esqualeno sintase, a qual é provavelmente um ponto crítico no controle do fluxo de carbono e ponto final da produção (Piironen et al., 2000).

Na segunda etapa o mevalonato é transformado em isopreno ativo. Na terceira, seis moléculas de

isopreno ativo são ligadas, formando o esqualeno-2,3-epóxido, que é uma estrutura linear. Finalmente, ocorre a ciclização do esqualeno, transformando-o em 4 anéis que

compõem o núcleo esteroidal (Marinetti, 1990; Koolman e Röhm, 2005; Lehninger et al., 2006).

A biosíntese do colesterol é representada na Figura 2.

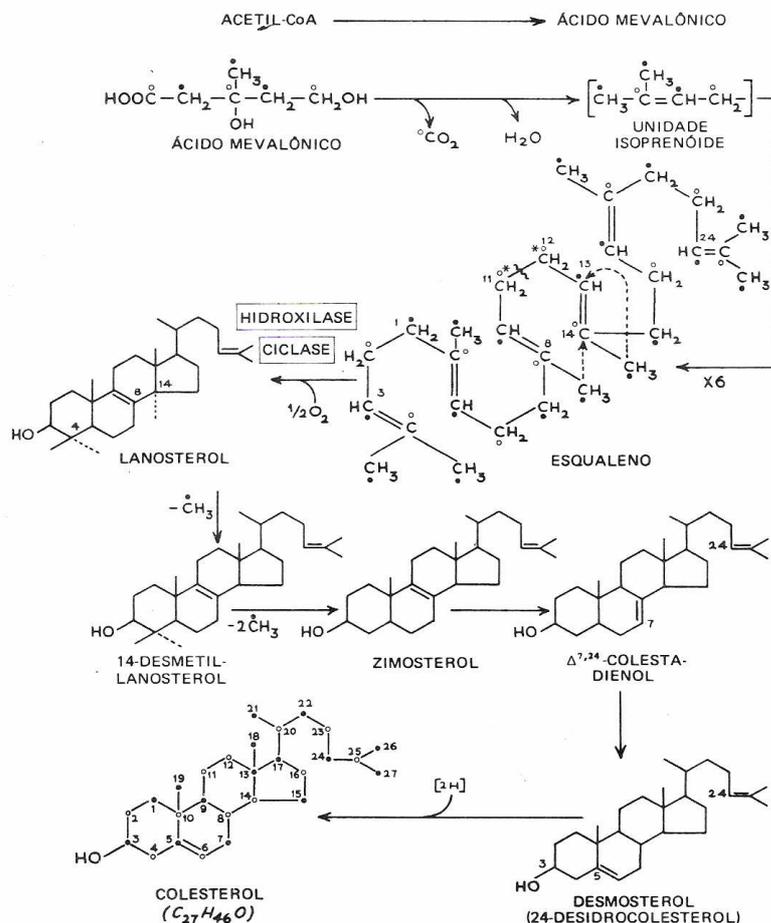


Figura 2 - Biosíntese do colesterol.

Fonte: Harper et al. (1982).

A síntese bioquímica de esteróis animais e vegetais é a mesma até a formação do esqualeno linear. Após esta etapa, em células animais ocorre a formação de uma molécula denominada lanosterol que após cerca de 20 reações (oxidações, perdas e migrações dos grupos metil) transforma-se em colesterol. Em células vegetais forma-se o cicloartenol que após várias reações transforma-se nos fitoesteróis (Piironen et al., 2000; Volin, 2001).

A capacidade de sintetizar isoprenóides é limitada às células animais e às células de alguns

vegetais, sendo por isso, que os fitoesteróis não são encontrados em todos os vegetais (Koolman e Röhm, 2005).

Além disso, os fitoesteróis estão em quantidades diferentes nas várias estruturas das plantas e estas quantidades variam ao longo do ciclo de vida deste vegetal (Goad, 1967; Ai, 1997; Berhman e Gopalan, 2005).

2.2.2. Colesterol em produtos de origem vegetal

Algumas plantas, em pequena quantidade, produzem colesterol (Piironen et al., 2000; Berhman e Gopalan, 2005). Berhman e Gopalan (2005) afirmaram que a presença do colesterol na membrana de células vegetais é conhecida há mais de 30 anos e em algumas espécies o colesterol é o mais abundante dos fitoesteróis.

O conceito de que produtos de origem vegetal não contêm colesterol, deve-se em parte, às pequenas concentrações encontradas e também aos métodos analíticos de detecção, que não foram bem desenvolvidos até recentemente (Behrman e Gopalan, 2005).

Além disso, muitas vezes, eles são encontrados com a seguinte informação no rótulo: “Produto isento de colesterol”, apesar da pequena quantidade que possa estar presente (Berhman e Gopalan, 2005). Alguns órgãos governamentais permitem esta informação desde que os produtos contenham concentrações consideradas, por eles, insignificantes.

Brasil (1998) declara como produto isento de colesterol os que contenham concentrações máximas como apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Concentração máxima de gordura saturada (g/100 g) em produtos considerados isentos de colesterol, de acordo com Brasil (1998).

Sólidos	Máximo de 1,5 g de gordura saturada/100 g
Líquidos	Máximo de 0,75 g de gordura saturada/100 mL
Energia fornecida por gorduras saturadas deve ser no máximo 10 % do valor energético total	

Fonte: Brasil (1998).

O órgão responsável pela fiscalização de alimentos e drogas nos Estados Unidos (Guide, 2007) permite esta informação no rótulo para produtos com quantidade inferior a 2 mg de colesterol e 2 g de gordura saturada por porção.

Segundo Fats (1995) para quantificação de gordura animal em óleos vegetais pela determinação de colesterol, a fração insaponificável de alguns óleos vegetais pode conter pequena quantidade de colesterol.

Stedman (1968) afirma que o colesterol é um dos quatro fitoesteróis mais abundantes do tabaco.

Ballesteros et al. (1996) determinaram o colesterol em óleos vegetais, utilizando cromatografia gasosa e detector de ionização em chamas, e encontraram as seguintes concentrações 0,082, 0,046 e 0,058 mg/g, respectivamente, nos óleos de germe de trigo, semente de uva e amêndoas doces.

Toivo et al. (1998) encontraram concentrações de colesterol no óleo de canola iguais a 0,05

mg/g, utilizando cromatografia gasosa e detector de ionização em chamas.

Phillips et al. (2002) determinando a concentração de esteróis livres e esterificados em gorduras e óleos alimentícios de origem vegetal, encontraram, em todos os óleos analisados, quantidades de colesterol inferiores a 0,03 mg/g, utilizando extração em fase sólida e cromatografia gasosa.

Cunha et al. (2006) determinando a concentração de esteróis livres e esterificados em nove amostras de azeite de oliva, utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas, verificaram a presença de colesterol em concentrações que variaram de 0,004 a 0,009 mg/g.

2.3. Saponificação e extração da matéria insaponificável

A fração lipídica nas rações corresponde a porcentagem de extrato etéreo. O extrato etéreo é toda substância lipídica da amostra e contém os

triglicérides, fosfatídeos e esteróis, além dos óleos voláteis, resinas, clorofilas, pigmentos, etc (Silva, 1990).

A saponificação é a reação dos triacilgliceróis com álcalis promovendo o rompimento das ligações ésteres na matriz lipoprotéica. Prefere-se a utilização do hidróxido de potássio (KOH) por produzir sabão mole, o que determina a não-solidificação dos extratos obtidos à temperatura ambiente (Perkins, 1993).

É um processo pelo qual são invertidas as relações de solubilidade. Quando se saponifica um tecido de origem animal contendo colesterol, grande parte dos fosfolipídios, gorduras e proteínas são convertidos em produtos solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos. Desta forma a extração dos insaponificáveis separa o colesterol solúvel em solvente orgânico dos triacilgliceróis e ácidos graxos, que permanecem na fase aquosa ou alcoólica. Da extração com solvente orgânico obtém-se a fração de lipídios não saponificável (Ferreira, 2000).

Os esteróis constituem o componente principal da fração insaponificável, podendo ser encontrado tanto no estado livre quanto esterificado com ácidos graxos de alto peso molecular (esteárico, oléico e palmítico) (Fenton, 1992; Perkins, 1993; Ferreira, 2000). Na massa muscular esquelética predomina a forma livre (Moura e Tenuta-Filho, 2002; Phillips et. al., 2002). Nos tecidos vegetais, podem ainda, estar na forma glicosídica, ligado a um carboidrato (Ai, 1997; Piironen et al., 2000; Volin, 2001; Koolman e Röhm, 2005).

Para a quantificação total, torna-se necessária a conversão dos ésteres de esterol em esterol livre, sendo a saponificação o método mais freqüentemente utilizado (Perkins, 1993; Moura e Tenuta-Filho, 2002; Phillips et. al., 2002).

O método de saponificação da amostra (ao invés da saponificação dos lipídios) não é adequado para quantificação de esteróis glicosídios, porque a ligação entre o esterol e o carboidrato não pode ser hidrolisada em condições alcalinas (Toivo et al., 2001; Lagarda et al., 2006). Entretanto, este método é muito utilizado para a determinação de colesterol, pois este não está na forma glicosídica. Além disso, seu emprego é

necessário quando o solvente utilizado para extração da fração lipídica não extrai completamente o colesterol esterificado (Toivo et al., 2001).

Dionisi et al. (1998) e Toivo et al. (2001) compararam os métodos de saponificação da amostra e os de extração dos lipídios com posterior saponificação e verificaram que a saponificação da amostra apresentou melhores resultados para determinação de colesterol em alimentos de origem animal.

Fenton e Sim (1991), Fenton (1992), Alonso et al. (1995), Maraschiello et al. (1996), Ferreira (2000) e Saldanha et. al. (2004) sugeriram a saponificação direta da amostra de alimentos de origem animal, devido a sua maior praticidade.

Kovacs (1990) e Jekel e Vaessen (1998) utilizaram o método de saponificação da amostra para determinação de colesterol em alimentos de origem vegetal utilizando cromatografia gasosa e detector por ionização em chamas.

Ferreira (2000) que avaliou o coeficiente de partição do colesterol entre as fases aquosa e com solvente, sugeriu que a saponificação seja realizada com hidróxido de potássio e álcool etílico e a extração da matéria insaponificável com hexano ou ciclohexano.

2.4. Métodos utilizados para determinação de colesterol

Os principais métodos encontrados na literatura para determinação de colesterol são colorimétricos, enzimáticos e cromatográficos (Ferreira, 2000; Bragnolo 2001).

Os métodos colorimétricos tendem a superestimar os teores de colesterol quando na presença de interferentes como: fitoesteróis, ácidos graxos insaturados, vitamina A e proteínas (Rodriguez-Amaya, 1996).

Os métodos enzimáticos, envolvendo a enzima colesterol oxidase, também tendem a superestimar os teores de colesterol, pois compostos contendo o grupo 3 β -OH, incluindo os fitoesteróis, também reagem com esta enzima (Ulberth e Reich, 1992; Rodriguez-Amaya,

1996).

Para alimentos de origem vegetal contendo fitoesteróis, os métodos cromatográficos são mais específicos, pois, com eles, é possível a separação dos diferentes tipos de esteróis (Rodríguez-Amaya, 1996; Ferreira, 2000).

2.4.1. Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico que tem a capacidade de separar componentes de uma amostra, realizada pela distribuição destes componentes entre duas fases. Uma das fases está fixa, enquanto a outra passa através dela. A amostra é introduzida no equipamento e conduzida pela fase móvel (líquida ou gasosa). Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária (líquida ou sólida), os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que, cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em uma migração diferencial que promove a separação (Pecsok e Shields, 1968; Edwards, 1970; Collins, 1988; James, 1995; Collins et al., 2006).

2.4.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE recebe este nome devido ao fato da fase móvel utilizada ser um líquido e este ser impulsionado através da coluna (empacotada) com auxílio de bomba para produzir pressão (Collins, 1988; Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006).

Os principais componentes de um cromatógrafo líquido são: bomba, sistema de injeção de amostras, coluna cromatográfica, detector e registrador (Collins, 1988; Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006).

Neste tipo de cromatografia o mecanismo de separação dos esteróis se faz pela cromatografia líquido-sólido ou por adsorção, na qual ocorre competição entre as moléculas da amostra e da fase móvel, para ocupar os sítios ativos na superfície da fase estacionária (Collins et al., 2006).

À CLAE podem ser acoplados equipamentos ou detectores que permitam a determinação de vários compostos. O detector UV-visível mede a

quantidade de luz absorvida durante a passagem do eluente por uma pequena célula de fluxo colocada no caminho óptico do feixe de radiação. Desta forma, este detector é específico para compostos que absorvem luz no ultravioleta (Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006).

A técnica de CLAE com detector UV tem aplicação restrita na análise de lipídios devido a falta de absorção de luz no ultravioleta de alguns compostos. Entretanto, a presença de insaturações e de grupos polares nas moléculas dos lipídios, tornam possível a absorção e detecção com UV no comprimento de onda de 190 a 210nm, sendo o colesterol detectado à 210nm (Hoving, 1995; Choudhari et al., 1996).

Choudhari et al. (1996) realizaram a análise de colesterol de diferentes formulações liofilizadas utilizando CLAE. Bragagnolo e Rodríguez-Amaya (2002), Moura e Tenuta-Filho (2002), Baggio e Bragagnolo (2004), Bragagnolo e Rodríguez-Amaya (2004), Saldanha et al. (2004) utilizaram CLAE para determinação de colesterol, em amostras de carne suína, camarão processado, produtos cárneos processados e camarão rosa, respectivamente. Nestes trabalhos, as identificações dos picos de colesterol foram feitas por comparação dos tempos de retenção do padrão e o da amostra e por co-cromatografia. As purezas dos picos foram verificadas por espectros de absorbância obtidos no início, ápice e término dos mesmos.

Breinhölder et al. (2002) fizeram a determinação de fitoesteróis livres e conjugados, de diferentes vegetais, utilizando sistema de CLAE com coluna RP18.

2.4.1.2. Cromatografia Gasosa (CG)

A cromatografia gasosa recebe este nome devido ao fato da fase móvel (também chamada de gás de arraste) utilizada ser um gás (Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006).

Os principais componentes de um cromatógrafo gasoso são: sistema de gases, sistema de injeção da amostra, coluna cromatográfica, detector e registrador (Skoog et al., 2002; Soares, 2006).

Na CG o mecanismo de separação dos esteróis se faz pela cromatografia gás-líquido ou por partição, a qual baseia-se nas diferentes

solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária (Edwards, 1970; Ciola, 1973; Collins et al., 2006; Soares, 2006).

A CG é uma técnica utilizada na separação de substâncias gasosas ou volatilizáveis. A volatilidade dos compostos pode ser conseguida aumentando-se a temperatura no local de injeção da amostra e na coluna, ou derivando-se os compostos em outros, mais termicamente estáveis e apolares (Edwards, 1970; Ciola, 1973; Collins, 1988; Collins et al., 2006; Soares, 2006).

A derivação é particularmente utilizada na CG para a determinação de substâncias de alta massa molecular e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares, a fim de evitar sua decomposição. Neste procedimento, ocorre a transformação da substância de interesse, em um derivado com características adequadas para ser analisada, ou ainda, introduz grupos específicos aumentando a detectabilidade da substância (Edwards, 1970; Ciola, 1973; Collins, 1988; Ai, 1997; Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006; Soares, 2006).

O colesterol não derivado, quando introduzido em uma coluna empacotada, adsorve no suporte sólido, resultando em picos com cauda e encurtando a vida útil da coluna. O uso de coluna capilar minimiza este problema (Rodríguez-Amaya, 1996).

Para analisar esteróis livres por CG sem fazer derivação, Fenton e Sim (1991), Ulberth e Reich (1992), Al-Hasani et al. (1993) e Ballesteros et al. (1996) utilizaram coluna capilar e observaram que nas amostras sem derivação não houve alteração na forma dos picos. Hwang et al. (2003) e Keller e Jahreis (2004) fizeram a determinação de colesterol não derivado, utilizando coluna capilar e conseguiram picos com boa resolução. Ai (1997) utilizou coluna capilar de comprimento reduzido (10m) para diminuir o tempo de retenção dos esteróis e conseqüentemente sua decomposição.

De acordo com Al-Hasani et al. (1993) a derivação não somente é demorada, mas também contribui para o aumento do ruído e decréscimo da linearidade devido aos depósitos sobre o detector de ionização em chamas.

De acordo com Hoving (1995) para a

determinação de esteróis podem ser utilizadas colunas com fases estacionárias apolares, de polaridade intermediária ou polares. As colunas com fases estacionárias apolares são as mais empregadas e nestas, a separação dos esteróis faz-se pela diferença entre as massas moleculares e graus de insaturação. Entretanto, em algumas colunas apolares, pode ocorrer a coeluição do colesterol com outro composto, porém esta separação é realizada facilmente empregando-se colunas polares.

Frega et al. (1992) compararam uma coluna polar com outra apolar para determinação de esteróis em azeite de oliva, utilizando o sistema de cromatografia líquida e gasosa. Rodríguez-Estrada et al. (2002) também compararam a utilização de coluna apolar e coluna polar com boa estabilidade térmica para separação da matéria insaponificável de extratos lipídicos. Os autores verificaram uma boa separação dos esteróis, utilizando coluna polar, principalmente aqueles com baixa resolução.

Dutta e Normém (1998) e Phillips et al. (1999) utilizaram coluna capilar de polaridade intermediária para determinação de esteróis, no soro sanguíneo e na aveia, respectivamente.

Njinkoué et al. (2002) utilizaram coluna polar (polietilenoglicol) e espectrometria de massas para determinação de esteróis e ácidos graxos em diferentes tecidos de espécies marinhas.

Ahmida et al. (2006) utilizaram cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS) e coluna capilar composta de 100 % de dimetilpolisiloxano (apolar) para detecção de fitoesteróis e colesterol plasmáticos. Como não houve boa resolução na separação de alguns esteróis, estes autores optaram pela coluna de polaridade intermediária Rtx[®] - 1701 (14 % de cianopropilfenil e 86 % de dimetilpolisiloxano), obtendo boa resolução dos compostos desejados.

Meier et al. (2006) utilizaram coluna polar (polietilenoglicol) e detector de ionização em chamas para determinação de ácidos graxos e colesterol em tecidos marinhos.

À CG podem ser acoplados equipamentos ou detectores que permitam a determinação de vários compostos. Para a determinação do

colesterol é utilizado o detector por ionização em chama. Neste caso, ocorre a queima dos componentes da amostra, promovendo a formação de íons que são capturados por um eletrodo. A corrente gerada é convertida em voltagem, amplificada e captada pelo registrador (Collins, 1988; Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006; Soares, 2006).

Para a separação de esteróis, a cromatografia gasosa (CG) é melhor que a cromatografia líquida, porque separa com melhor precisão compostos isômeros como sitosterol, campesterol, estigmasterol, dentre outros (Abidi, 2001; Lagarda et al., 2006).

2.4.2. Espectrometria de massas

O espectrômetro de massas é um equipamento que pode ser acoplado ao cromatógrafo líquido ou gasoso possibilitando análises de alta especificidade em amostras complexas (Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006).

Os principais componentes de um espectrômetro de massas são: bomba de vácuo, fonte de ionização, analisador de massa, sistema de detecção de íons (transdutor) e processador de sinais (Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006). Os três primeiros componentes ficam dentro do sistema de vácuo para manter a pressão baixa (Skoog et al., 2002).

O propósito do sistema de injeção é introduzir uma micro quantidade de amostra que será transformada em vapor. Dentro da fonte de ionização, a amostra vaporizada irá colidir com íons positivos, convertendo-se em íons moleculares (devido a perda de um elétron) com a mesma massa molecular que a molécula (Skoog et al., 2002).

Os íons formados são atraídos por uma fenda (produzindo aceleração) para dentro do analisador de massa, onde ocorre então a separação de íons (em movimento) de acordo com a razão massa-carga (m/z), onde m é a massa do íon em unidades de massa atômica e z é a sua carga. Como a maioria dos íons formados é de carga unitária, m/z é normalmente a massa do íon. As colisões entre elétrons energéticos e moléculas de analito, normalmente, fornecem energia às moléculas para deixá-las em estado excitado. O relaxamento, geralmente, ocorre por

fragmentação produzindo íons positivos de massas menores (Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006).

Ainda de acordo com Skoog et al. (2002), as colisões entre as moléculas da amostra e os íons são altamente reativas e, no caso do colesterol, envolvem a transferência de próton. Desta forma, ocorre a formação da molécula protonada do colesterol representada por $[M+H]^+$.

A última etapa é a de contagem do número de íons de cada tipo ou medida da corrente iônica produzida por um transdutor adequado. O transdutor irá converter o feixe de íons formados para um sinal elétrico que pode ser processado e registrado (Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006).

O espectro de massas obtido depende do método utilizado para formação destes íons. Para a ionização dos esteróis é utilizada fonte APCI-MS (*atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*) que, como o nome, promove ionização química à pressão atmosférica, ocorrendo em fase gasosa (Skoog et al., 2002; Collins et al., 2006).

2.5. Validação de métodos analíticos

Quando há o desenvolvimento de um novo método analítico para uma determinada finalidade deve ser feita a sua validação (The Fitness, 1998; Thompson et al., 2002; Orientações, 2003). A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando-lhe confiabilidade e, desta forma, é necessário que os equipamentos e vidraria estejam calibrados (Leite, 1996; Brasil, 2003a, b).

Para se realizar o processo de validação são utilizadas características de desempenho tais como: a linearidade, a especificidade, a seletividade, a precisão, a exatidão, o limite de detecção e de quantificação e a robustez (The Fitness, 1998; Thompson et al., 2002; Brasil, 2003a, b).

O analito é o composto químico a ser mensurado na amostra e a matriz é a amostra em questão. A substância padrão, que é uma amostra certificada do analito a ser avaliado é de fundamental

importância nas análises, por propiciar a comparação entre as espécies analisadas, sendo o principal parâmetro de exatidão. A substância padrão deve possuir estabilidade e natureza confiáveis para uma determinada análise (Leite, 1996; Brasil, 2003a; Orientações, 2003).

A linearidade é a capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais à quantidade do analito presente na amostra, em um intervalo especificado (Leite, 1996; Thompson et al., 2002).

A especificidade/seletividade relaciona-se à capacidade que o método possui de identificar o composto em pesquisa mesmo na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Significa que o valor medido provém somente do analito, assegurando que não há interferentes (Leite, 1996; The Fitness, 1998; Thompson et al., 2002; Orientações, 2003). Em uma análise de produto de origem vegetal, por exemplo, a presença de vários fitoesteróis pode dificultar a determinação isolada de cada composto (Piironen et al., 2000).

A precisão é a proximidade dos resultados obtidos em várias medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e pode ser expressa em Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV) (Leite, 1996; Thompson et al., 2002; Brasil, 2003a, b; Orientações, 2003).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos em relação ao verdadeiro valor contido na amostra, exprimindo a compatibilidade do valor aceito com o valor de referência (The Fitness, 1998; Thompson et al., 2002; Brasil, 2003a, b; Orientações, 2003).

O limite de detecção é a mínima quantidade do analito que pode ser detectada pelo método analítico, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis pelo método analítico (Leite, 1996; The Fitness, 1998; Thompson et al., 2002; Brasil, 2003a, b; Orientações, 2003).

A robustez é a medida da capacidade do método

analítico em resistir a certas variações dos parâmetros analíticos como equipamento, operador, reagentes, etc (Leite, 1996; Brasil, 2003a, b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material e reagentes

A parte experimental deste trabalho foi realizada no Laboratório de Química de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, no Estado de São Paulo, sob orientação da Profa. Neura Bragagnolo, no período de março a novembro de 2006.

Para a otimização do preparo das amostras e validação do método foram utilizadas dez misturas de alimentos (rações) para ruminantes de diferentes procedências e uma amostra de farinha de carne e ossos (35 % de proteína bruta). As amostras foram adquiridas tanto no comércio quanto em fazendas da região de Campinas. Foram homogeneizadas, quarteadas manualmente e moídas em multiprocessador *Master Walita*.

A concentração de colesterol foi analisada nas amostras de ração e em amostras de seus ingredientes mais utilizados: milho, farelo de soja e farelo de trigo; nas amostras de farinha de carne e ossos e nas amostras de ração adicionadas de farinha de carne e ossos (à ração foram adicionados 10 % de farinha de carne e ossos) para que fosse melhor visualizado o pico de colesterol nos cromatogramas destas.

Os padrões de colesterol (C-8667), ergosterol, vitamina D, β -sitosterol e campesterol (S-5753) e estigmasterol (S-6126) foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA).

Todos os solventes utilizados para o preparo das amostras foram grau P.A. e para a análise por cromatografia líquida foram grau cromatográfico, os quais foram filtrados em filtro orgânico 0,45 μ m *Millipore* (Cork, Irlanda), em sistema de vácuo, antes do uso.

Para a análise por cromatografia gasosa, os gases utilizados foram de alta pureza (5.0) e o solvente (hexano) foi grau cromatográfico.

3.2. Métodos

Antes da validação, as amostras de suplemento (ração) para ruminantes foram analisada no Laboratório Nacional Agropecuário LANAGRO-MAPA/Campinas, empregando a microscopia como método de ensaio (Brasil, 2003c). Neste laboratório o limite de detecção para farinha de carne e ossos na ração é de 0,025 %.

As determinações de lipídios totais na ração e na farinha de carne e ossos foram efetuadas segundo Folch et al. (1957).

Devido as poucas informações encontradas na literatura a respeito da determinação de colesterol em amostras de produtos de origem vegetal, vários métodos foram testados até a adequação do melhor método de extração.

Para a otimização da quantificação do teor de colesterol em amostras de ração destinadas à alimentação de ruminantes foram então testados cinco métodos: 1) saponificação da amostra com aquecimento; 2) extração de lipídios (método Folch) seguida de saponificação com aquecimento; 3) hidrólise ácida e extração dos lipídios com éter etílico (Soxhlet) seguida de saponificação com aquecimento; 4) hidrólise enzimática e extração dos lipídios com hexano seguida de saponificação com aquecimento e 5) saponificação da amostra sem aquecimento.

3.3. Preparo das amostras

3.3.1. Saponificação da amostra com aquecimento

Às amostras de ração e de farinha de carne e ossos (FCO) foram adicionados álcool etílico e solução de KOH a 50 % em diferentes proporções, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Quantidades de amostras e reagentes utilizados na saponificação com aquecimento.

Amostra	Ração sem FCO* (g)	KOH (g)	Álcool etílico (mL)
1	2	4	6
2	2	20	30
Fco* (g)			
3	2	4	6
4	2	20	30

*FCO: farinha de carne e ossos.

As amostras foram saponificadas em tubos de ensaios, em banho de água à 40 °C, com agitação magnética durante 20 minutos e à 60 °C durante 10 minutos, segundo metodologia de Saldanha et al. (2004) modificada.

3.3.2. Extração dos lipídios de acordo com Folch seguida de saponificação com aquecimento

Os lipídios foram extraídos de acordo com Folch et al. (1957). Foram pesados 5 g de ração sem farinha de carne e ossos e 5 g de farinha de carne e ossos e a cada amostra foram acrescentados, consecutivamente, 100, 50 e 25 mL de solução clorofórmio-metanol 2:1 (v,v). Para cada volume de adição de solução clorofórmio-metanol foram feitas três homogeneizações em blender, cada

uma por 2 minutos e as amostras foram filtradas em funil de separação de 500 mL.

Ao filtrado foram acrescentados 40 mL de KCl 0,74 %, promovendo a separação de fases. A fase aquosa (superior) foi descartada e o filtrado foi novamente lavado com 25 mL de KCl 0,74 %. Após a segunda separação de fases o filtrado foi transferido para balão volumétrico de 200 mL e o volume foi completado com clorofórmio.

A saponificação foi realizada de acordo com Bohac et al. (1988) utilizando uma alíquota de 10 mL do extrato lipídico (obtido por Folch), em tubo de ensaio e seca sob fluxo de nitrogênio com banho de água à 55 °C. Foram adicionados 20 mL de KOH 12 % em álcool etílico 90 %, agitado em vórtex e deixado em agitação por 15 minutos à 80 °C. Foram adicionados 10 mL de

água (para extração) e novamente agitado em vórtex. Após o resfriamento foram feitas 3 extrações da fração insaponificável, com 10 mL de hexano cada uma.

O extrato hexânico foi evaporado em fluxo de nitrogênio e dissolvido em 1 mL de fase móvel composta de 85 % de acetonitrila e 15 % de isopropanol. Antes da injeção em cromatógrafo líquido as amostras foram filtradas em membrana *Millipore* (0,45 µm).

Tabela 4 - Quantidades de amostra e reagentes utilizados na hidrólise ácida.

Variáveis	Quantidades
Ração com 10 % de FCO* (g)	10
Água para hidrólise (mL)	200
Ácido clorídrico (mL)	120
Água para neutralização (L)	4,5

*FCO: farinha de carne e ossos.

As amostras adicionadas de ácido clorídrico e água destilada foram colocadas sob aquecimento e assim mantidas, após atingir ebulição, por mais 30 minutos. Foram então, filtradas à quente em papel de filtro triplo e lavadas com água destilada até neutralização.

Após a hidrólise ácida, os papéis de filtro contendo a amostra, foram colocados em estufa à 100 °C por 50 minutos e então colocados em dessecador. Para a extração dos lipídios, os papéis de filtro foram fechados em forma de cartuchos, para serem inseridos no interior do extrator de Soxhlet, onde permaneceram em refluxo com éter etílico, durante 6 horas. Os balões contendo a fração lipídica foram

3.3.3. Hidrólise ácida e extração dos lipídios em equipamento Soxhlet, seguida de saponificação com aquecimento

Foi feita a hidrólise ácida de amostras de ração com adição de 10 % de farinha de carne e ossos baseada na metodologia de Diemair (1963). Foram preparadas 3 amostras, cada uma com 10 g. Foram utilizados ácido clorídrico e água, de acordo com a Tabela 4.

colocados em banho de água à 35 °C para evaporação parcial do solvente. Ao final, as amostras foram transferidas para tubo de ensaio e o solvente foi evaporado completamente.

A seguir foi feita a saponificação das amostras de acordo com Saldanha et al. (2004) (Tabela 5). Aos tubos de ensaio foram adicionados solução aquosa de KOH 50 % e álcool etílico, deixando-se em banho de água à 40 °C com agitação magnética, por 20 minutos e mais 10 minutos à 60 °C. Foi acrescentada água destilada (para extração) e deixado até esfriar. Foram feitas, a seguir, 4 extrações da fração insaponificável utilizando hexano.

Tabela 5 - Quantidade de reagentes utilizados na saponificação com aquecimento, de acordo com Saldanha et al. (2004), após hidrólise ácida.

Variáveis	Quantidades
Solução de KOH 50 % (mL)	4
Álcool etílico (mL)	6
Água para extração (mL)	5
Volume hexano para extração (mL)	10

O extrato hexânico foi evaporado em fluxo de nitrogênio e dissolvido em 1 mL de fase móvel composta de 85 % de acetonitrila e 15 % de isopropanol. Antes da injeção em cromatógrafo líquido as amostras foram filtradas em membrana *Millipore* (0,45 µm).

3.3.4. Hidrólise enzimática e extração dos lipídios, seguida de saponificação com aquecimento

Foi realizada hidrólise enzimática de amostras de ração com adição de 10 % de farinha de carne e ossos, segundo metodologia de Rios e Mercadante (2004) modificada.

As amostras foram pesadas em Erlenmeyer e foram adicionados tampão fosfato, água destilada, solução alcoólica de hidroquinona (0,2 %) e enzima alfa-amilase, permanecendo em agitação em mesa agitadora por 2 horas (Tabela 6).

Tabela 6 - Quantidades de amostra e reagentes utilizados na hidrólise enzimática.

Variáveis	Quantidades			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Ração com 10 % de FCO* (g)	5	10	10	5
Tampão fosfato (mL)	25	50	25	25
Água destilada (mL)	100	200	100	100
Sol. alcoólica hidroquinona 0,2 % (mL)	10	20	10	10
Enzima alfa-amilase (µL)	400	400	400	200

*FCO: farinha de carne e ossos.

A taxa de hidrólise enzimática foi monitorada separando-se alíquotas de 1 mL e acrescentando-se iodo. A solução de hidroquinona foi utilizada como antioxidante.

Após a hidrólise enzimática, a extração dos lipídios foi realizada adicionando-se hexano (3 extrações, 20 mL cada). O extrato hexânico foi transferido para balão de fundo redondo e evaporado parcialmente em evaporador rotatório, com banho de água à 30 °C.

O extrato hexânico concentrado foi transferido para tubo de ensaio e seco completamente em fluxo de nitrogênio. Foi então realizada saponificação com solução de KOH 50 % e álcool etílico, segundo metodologia de Saldanha et al. (2004) (Tabela 7). Após a saponificação e extração dos insaponificáveis, as amostras foram dissolvidas em 1 mL de fase móvel composta de 85 % de acetonitrila e 15 % de isopropanol. Antes da injeção em cromatógrafo líquido as amostras foram filtradas em membrana *Millipore* (0,45 µm).

Tabela 7 - Quantidade de reagentes utilizados na saponificação com aquecimento de acordo com Saldanha et al. (2004) após hidrólise enzimática.

Variáveis	Quantidades
Solução de KOH 50 % (mL)	8
Álcool etílico (mL)	12
Água para extração (mL)	10
Volume hexano para extração (mL)	10

Para melhorar a extração dos lipídios após a hidrólise enzimática, foram testados outros solventes além do hexano e também foi realizada a centrifugação após a adição do solvente.

Os solventes testados foram o éter etílico e o ciclohexano e para extração utilizando

centrifugação, as amostras e reagentes foram colocados em tubos de centrifuga de aproximadamente 400 mL. Na Tabela 8 são apresentadas as condições de centrifugação testadas, utilizando-se hexano como solvente.

Tabela 8 - Condições de centrifugação testadas para extração dos lipídios com hexano, após hidrólise enzimática.

Velocidade (rpm)	Tempo (min)
700	10
3000	30
3000	10

As amostras dos testes para melhorar a extração da fração lipídica foram preparadas de acordo com o processo de hidrólise enzimática utilizado na amostra 2 da Tabela 6 e o processo de transferência da fração lipídica e evaporação do solvente foi o mesmo descrito para as amostras preparadas também de acordo com a Tabela 6.

A saponificação foi realizada de acordo com Saldanha et al. (2004) (Tabela 7). Após a saponificação, o extrato hexânico foi evaporado em fluxo de nitrogênio e dissolvido em 1 mL de fase móvel composta de 85 % de acetonitrila e 15 % de isopropanol. Antes da injeção em cromatógrafo líquido as amostras foram filtradas em membrana *Millipore* (0,45 µm).

3.3.5. Saponificação da amostra sem aquecimento

Foram realizados testes para verificação do resultado obtido após a saponificação de amostras de ração com adição de 10 % de farinha de carne e ossos. Inicialmente foi pesado 1 g de amostra em balão de fundo redondo, ao qual se adicionou 20 mL de solução de KOH 50 % e 30 mL de álcool etílico. Entretanto, devido a formação de solução viscosa após decorridas 20 horas de saponificação, optou-se pela adição de KOH em pastilhas, o que apresentou um bom resultado, após agitação em mesa agitadora.

Foram preparadas quatro amostras utilizando-se duas quantidades de KOH e álcool etílico, como apresentado na Tabela 9 (teste 1).

Tabela 9 - Quantidades de amostras e reagentes utilizados no método de saponificação da amostra sem aquecimento (teste 1).

Amostra	Ração com 10 % de FCO* (g)	KOH (g)	Álcool etílico (mL)	Água para extração (mL)
1	1	3,5	30	10
2	1	7	60	20
Fco* (g)				
3	1	3,5	30	10
4	1	7	60	20

*FCO: farinha de carne e ossos.

As amostras foram pesadas em balão de fundo redondo de 200 mL aos quais foram acrescentados os reagentes pra saponificação. As amostras permaneceram em mesa agitadora por 22 horas. Após a saponificação, as amostras foram transferidas para tubo de ensaio e foi acrescentada água destilada para extração dos insaponificáveis, sendo realizadas 4 extrações com hexano.

O extrato hexânico foi transferido para funil de separação de 500 mL, onde foram feitas lavagens com água destilada para retirada do KOH, em

um total de 2 L para cada amostra. Após este procedimento foi medido o pH.

Após as lavagens, o extrato hexânico foi transferido para balão de fundo redondo e evaporado em evaporador rotatório (mantido à 35 °C) até que restasse aproximadamente 1 mL, sendo então, transferido para tubo de ensaio, onde terminou de ser evaporado em fluxo de nitrogênio. No momento das injeções no cromatógrafo líquido, o conteúdo dos tubos foi dissolvido em 1 mL de fase móvel composta de 85 % de acetonitrila e 15 % de isopropanol e filtrado em membrana *Millipore* (0,45 µm).

Foram realizados outros testes alterando-se as quantidades de amostra, hidróxido de potássio, álcool etílico, tempo de saponificação e água

para extração dos insaponificáveis. As variáveis dos testes 2 e 3 são apresentadas respectivamente nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Quantidades de amostra e reagentes utilizados no método de saponificação da amostra sem aquecimento (teste 2).

Amostra	Ração com 10 % de FCO* (g)	KOH (g)	Álcool etílico (mL)	Água para extração (mL)
1	1	3,0	20	5
2	1	3,5	20	5
3	2	3,0	30	10
4	2	3,5	30	10

*FCO: farinha de carne e ossos.

Tabela 11 - Quantidades de amostra e reagentes utilizados no método de saponificação da amostra sem aquecimento (teste 3).

Amostra	Ração com 10 % de FCO* (g)	KOH (g)	Álcool etílico (mL)	Água para extração (mL)
1	1	3,0	20	10
2	1	3,5	20	10
3	2	3,0	30	20
4	2	3,5	30	20

*FCO: farinha de carne e ossos.

Para os testes 2 e 3 o material utilizado e os procedimentos de saponificação, extração dos insaponificáveis, neutralização do KOH, secagem e diluição em fase móvel foram os mesmos já descritos no teste 1. Entretanto, no teste 2 as amostras 1 e 3, 2 e 4 foram colocadas para saponificar em mesa agitadora por respectivamente 16 e 22 horas. Após a agitação, nas amostras 1 e 2, foram acrescentados 5 mL de água para extração e nas amostras 3 e 4 foram acrescentados 10 mL. Nas amostras 3 e 4 foram feitas 4 extrações com hexano (10 mL cada). As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido.

No teste 3 foram mantidas as quantidades de amostra e reagentes do teste 2 e todas as amostras tiveram tempo de saponificação de 22 horas. Entretanto, após a saponificação, nas amostras 1 e 2 foram acrescentados 10 mL de água destilada e nas amostras 3 e 4 foram acrescentados 20 mL. Nas amostras 1 e 2 foram feitas 4 extrações com hexano (10 mL cada). Antes da injeção em cromatógrafo líquido as amostras foram filtradas em membrana *Millipore* (0,45 µm).

Foram testadas diferentes proporções de fase móvel e fluxo de fase móvel na coluna variando de 1 ou 2 mL/min, assim como diferentes proporções de solvente acetonitrila:isopropanol para diluição das amostras (Quadros 3 e 4).

Quadro 3 - Proporções de fase móvel testadas na cromatografia líquida.

Fase móvel (%) (Acetonitrila:isopropanol)
85:15
70:30
99:01
98:02
97:03
95:05
100 % acetonitrila

Quadro 4 - Proporções de solvente acetonitrila:isopropanol testadas para solubilização da amostra.

Acetonitrila:isopropanol (%)
100 % acetonitrila
100 % isopropanol
50:50
70:30

Após os testes com fase móvel e solvente, apesar dos picos nos cromatogramas apresentarem-se mais separados, o pico de colesterol ainda não apresentava um valor de área satisfatório. Por isso, optou-se por preparar as amostras com quantidades maiores de ração como 4, 6 e 8 g (Tabela 12) e 10 g (Tabela 13).

Para os testes 4 e 5 o material utilizado e os procedimentos de saponificação, extração dos insaponificáveis, neutralização do KOH e secagem foram os mesmos já descritos no teste 1, entretanto as amostras foram dissolvidas em 1 mL de solvente (50 % de acetonitrila e 50 % isopropanol). Antes da injeção em cromatógrafo líquido as amostras foram filtradas em membrana *Millipore* (0,45 µm).

Tabela 12 - Quantidades de amostra e reagentes testados, utilizando saponificação das amostras sem aquecimento (teste 4).

Variáveis	Quantidades		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Ração com 10 % de FCO* (g)	4	6	8
Álcool etílico (mL)	60	90	120
KOH (g)	8	12	16
Água para extração (mL)	30	40	60
Número de extrações	5	5	5
Água para neutralização (L)	2,0	2,5	3,0

*FCO: farinha de carne e ossos.

Tabela 13 - Quantidade de reagentes utilizados na saponificação de 10 g de amostra, sem aquecimento (Teste 5).

Variáveis	Quantidades		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Ração com 10 % de FCO* (g)	10	10	10
Álcool etílico (mL)	20	70	70
KOH (g)	20	30	40
Água para extração (mL)	40	30	30
Número de extrações	4	4	4
Água para neutralização (L)	2	3	3

*FCO: farinha de carne e ossos

Após estes testes foram realizados planejamentos experimentais seqüenciais: um planejamento fatorial 2^{8-4} (planejamento I) e um planejamento fatorial completo 2^3 (planejamento II) para otimização do procedimento de saponificação e extração do colesterol.

A escolha da ordem de realização dos ensaios foi feita por sorteio e a análise dos resultados foi feita pela verificação dos parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,10$) obtidos pela avaliação da área dos picos de colesterol por grama de amostra, com a utilização do *software Statistica for Windows 5.5. (Statsoft 2000)*.

3.3.6. Planejamento para otimização da extração do colesterol

3.3.6.1. Planejamento I

Foi realizado planejamento fatorial 2^{8-4} com 16 ensaios e 3 pontos centrais, totalizando 19 ensaios. As variáveis independentes foram: peso da amostra, massa de KOH para saponificação, volume de álcool etílico para saponificação, tempo de saponificação, volume de água para extração após a saponificação, número de extrações da matéria insaponificável, volume de água para neutralização do KOH e proporção de solvente para diluição das amostras. Os níveis utilizados para estas variáveis estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Variáveis independentes aplicadas no planejamento I (fatorial 2^{8-4}) para otimização da extração do colesterol.

Variáveis	Quantidades (níveis)		
	-1	0	1
Ração com 10 % de FCO* (g)	1	1,5	2,0
KOH (g)	3,0	3,5	4,0
Álcool etílico (mL)	20	25	30
Tempo de saponificação (h)	20	22	24
Água para extração (mL)	10	12	14
Nº de extrações	3	4	5
Água para neutralização (L)	2,0	2,5	3,0
Solvente para diluição*	40-60 (A)	50-50 (B)	60-40 (C)

*FCO: farinha de carne e ossos.

A=40 % acetonitrila, 60 % isopropanol; B=50 % acetonitrila, 50 % isopropanol; C=60 % acetonitrila, 40 % isopropanol.

Antes da injeção em cromatógrafo líquido as amostras foram filtradas em membrana *Millipore* (0,45 μ m).

3.3.6.2. Planejamento II

De acordo com os resultados obtidos no planejamento I foi então realizado o

planejamento II, 2^3 fatorial completo com quatro pontos centrais, totalizando 12 ensaios. As variáveis aplicadas a este planejamento foram as estatisticamente significativas definidas no planejamento I, sendo elas tempo de saponificação, número de extrações com hexano e água para neutralização das amostras (Tabela 15).

Tabela 15 - Variáveis independentes aplicadas no planejamento II (fatorial completo 2^3) para otimização da extração do colesterol.

Variáveis	Quantidades (níveis)		
	- 1	0	1
Tempo de saponificação (h)	23	25	27
Número de extrações	2	3	4
Água para neutralização (L)	1	1,5	2

As amostras foram dissolvidas em 1 mL de solvente (hexano), filtradas em membrana *Millipore* (0,45 μ m) e analisadas por cromatografia gasosa, estabelecendo-se o fluxograma de preparo.

Foram preparadas mais 4 amostras, de acordo com o fluxograma e estas foram analisadas por cromatografia gasosa, para verificação do coeficiente de variação e validação do planejamento.

3.4. Equipamentos e condições cromatográficas

Para a determinação de colesterol, inicialmente o experimento foi conduzido utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-visível sendo substituída pela cromatografia gasosa devido a sua maior sensibilidade e melhor resolução dos picos de esteróis.

3.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

3.4.1.1. CLAE e detector UV-visível

Para a cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com sistema ternário de solventes (LC-10 AD_{vp}), degaseificador (DGU 20A), detector UV-visível (SPD-10 AV_{vp}) e *software* (CLASS-VP10) para o processamento dos dados. Foi utilizada coluna de guarda RP-18e, Chromolith, Merck (Darmstadt, Alemanha), 4,6mm. A coluna analítica utilizada foi a C₁₈ (fase reversa), 100mmx4,6mmx4µm (Chromolith, Merck), mantida a 32 °C em forno com temperatura controlada. As amostras foram introduzidas no equipamento com alça de injeção de 20 µL. A fase-móvel utilizada foi composta de 98 % de acetonitrila e 2 % de isopropanol em fluxo de 2 mL por minuto, sendo o tempo de análise de 15 minutos. Os cromatogramas foram processados no comprimento de onda de 210 nm. A identificação do colesterol foi feita por comparação do tempo de retenção das amostras com o do padrão e por adição de padrão às amostras.

3.4.1.2. CLAE com detector por arranjo de diodos e espectrômetro de massas

O espectro de massas foi utilizado para confirmação da pureza do pico de colesterol. Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo Prominace, equipado com bomba quaternária (LC-20AD), degaseificador (DGU 20A₅), válvula de injeção de 20 µL (Rheodyne LCC, Rohnert park, CA) e *software* (LC Solution) para o processamento dos dados. O equipamento incluía, conectados em série, detector por arranjo de diodos (SPD-M20A) e espectrômetro de massas (EM) com analisador íon-trap e fonte de ionização APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) da Bruker Daltonics modelo Squire 4000 (Bremem,

Alemanha). A coluna e a fase móvel foram as mesmas utilizadas com o detector UV-visível. O fluxo foi de 1 mL por minuto sendo o tempo de análise de 30 minutos.

Os espectros UV-visível foram obtidos entre 190 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 210 nm. Os parâmetros utilizados no MS foram: temperatura da fonte APCI de 450 °C, sendo os dados adquiridos no modo positivo, tensão da corona de 4000 nA, temperatura do dry gas N₂ de 350 °C, fluxo de 5 L/min, pressão do nebulizador de 65 psi, energia de fragmentação do MS/MS de 1,4 V. A faixa de aquisição dos espectros de massa (m/z) foi de 100 a 700. A identificação do colesterol foi feita por comparação do tempo de retenção das amostras com o do padrão, por adição de padrão às amostras e pela comparação dos espectros de massas obtidos com os da literatura (Saldanha et al., 2006; Mazalli et al., 2006).

3.4.2. Cromatografia gasosa

Para a realização da técnica de cromatografia gasosa foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu GC-2010, com detector por ionização em chamas (DIC) e *software* (GC Solution) para o processamento dos dados. A coluna utilizada foi a VA-WAX[®] (Varian) com 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e 0,25 µm de fase estacionária de polietilenoglicol (polar).

Como gás de arraste foi utilizado o hidrogênio e como gás de *make up* foi utilizado o nitrogênio. O ar sintético foi utilizado como comburente. A proporção dos gases nitrogênio, hidrogênio e ar sintético foram respectivamente: 30:40:400 mL/min. As condições cromatográficas utilizadas estão apresentadas no Quadro 5.

Quadro 5 - Condições utilizadas na cromatografia gasosa.

Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Temperatura do injetor	260 °C
Volume de injeção	1 µL
Fluxo na coluna	1,68 mL/min
Velocidade linear	51,8 cm/sec
Temperatura do detector	300 °C
Temperatura do forno: Inicial	100 °C por 2 minutos
Final	260 °C por 48 minutos
Taxa de aumento da temperatura	15 °C por minuto
Tempo total de corrida	60,67 minutos

3.4.3. Ensaios preliminares e determinação das condições cromatográficas ideais para cromatografia gasosa

Perfis de cromatogramas do padrão de colesterol, de amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos, de ração com adição de farinha de carne e ossos e amostras de farinha de carne e ossos foram avaliados, para determinação das condições cromatográficas ideais para análise em cromatógrafo gasoso. Em cada amostra foram verificados a resolução e o tempo de retenção do colesterol na presença dos outros esteróis.

A identificação do colesterol foi feita por comparação do tempo de retenção das amostras com o do padrão e por adição de padrão às amostras.

As condições cromatográficas foram definidas pelo volume de injeção, fluxo, área e resolução do pico de colesterol, tempo de análise e temperaturas na coluna e detector.

Foram testados dois tipos de coluna cromatográfica, uma do tipo polar (VA-WAX[®]) e outra de polaridade intermediária (DB 1701[®], de fase estacionária composta de 14 % de cianopropilfenil e 86 % de dimetilpolisiloxano com 0,25 µm; 15 m de comprimento; 0,32 mm de diâmetro interno).

As condições testadas com a coluna DB1701[®] e com a coluna VA-WAX[®] são apresentadas nas Tabelas 16 e 17, respectivamente:

Tabela 16 - Condições testadas no cromatógrafo gasoso utilizando coluna DB1701®.

Injetor			Coluna					Detector
T (°C)	Razão split	Fluxo (mL/min)	Programação de temperatura					T (°C)
			T. inicial (°C)	Tempo ¹ (min)	T. final (°C)	Tempo ² (min)	Taxa ³ (°C/min)	
250	9	2	150	1	150 – 265 265	55	10	280
250	9	2	150	1	150 – 280 280	10	10	280
250	50	2	150	1	150 – 280 280	10	10	280
250	9	2	150	1	150 – 265 265	10	10	280
280	9	2	265	55				280
250	9	2	100	1	100 – 300 300	10	10	300
280	9	1,5	210	1	210 – 300 300	10	10	300
250	-	2	150	0	150 - 264 264 – 290 290	2	2 5	290
250	-	2	150	1	150 – 280 280	10	10	280
250	-	2	100	1	100 – 265 265	10	10	280
250	-	1	100	1	100 – 265 265	10	10	280
250	-	2	50	1	50 – 265 265	10	10	300
180	-	2	160	1	160 – 300 300	10	10	300
180	-	2	150	1	150 – 280 280	10	10	300
250	-	1	50	1	50 – 265 265	10	10	300
250	-	2	50	1	50 – 265 265	10	10	300
250	-	2	50	1	50 – 100 100 – 265 265	10	10 10	300

*T: temperatura.

Tempo¹ – Tempo em que permaneceu na temperatura inicial.

Tempo² – Tempo em que permaneceu na temperatura final.

Taxa³ – Variação da elevação da temperatura por minuto.

Tabela 17 - Condições testadas no cromatógrafo gasoso utilizando coluna VA-WAX® no modo de injeção *splitless* e temperatura do injetor de 300 °C.

Injetor		Coluna				
T (°C)	Fluxo (mL/min)	Programação de temperatura				
		T. inicial (°C)	Tempo ¹ (min)	T. final (°C)	Tempo ² (min)	Taxa ³ (°C/min)
260	1,92	40	5	40 – 260 260	50	25
250	0,68	100	2	260	10	
250	1,52	50	1	50 – 260 260	30	15
250	1,36	100	1	100 – 260 260	39	15
250	1,50	100	2	100 – 260 260	108	15
270	0,97	100	2	100 - 260 260	108	15
260	1,62	210	2	210 – 260 260	20	15
240	1,41	100	2	100 - 260 260	62	10
260	1,68	100	2	100 – 260 260	48	15

*T: temperatura.

Tempo¹ – Tempo em que permaneceu na temperatura inicial.

Tempo² – Tempo em que permaneceu na temperatura final.

Taxa³ – Variação da elevação da temperatura por minuto.

3.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

3.5.1. Preparo de soluções padrão

Todas as soluções padrão preparadas foram de concentração 0,1 mg/mL.

A solução estoque de padrão de colesterol foi preparada pesando-se 0,01 g de padrão de colesterol e o volume foi completado com hexano em balão volumétrico de 100 mL. Para o preparo dos outros padrões foram pesados, individualmente, 0,0025 g de padrão ergosterol, estigmasterol, β -sitosterol (60 %) e campesterol e vitamina D e o volume de cada solução padrão foi completado com hexano em balão volumétrico de 25 mL.

3.5.2. Quantificação do teor de colesterol

A quantificação do teor de colesterol foi feita com curva de calibração externa, injetando-se padrão de colesterol nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 mg/mL, em 3 replicatas. As concentrações intermediárias foram preparadas a partir da solução padrão estoque de colesterol (0,1 mg/mL), separadamente, de forma que, para cada concentração, foram preparadas três amostras. Foram determinados, por regressão linear, a equação e o coeficiente de determinação.

Como padrão interno foram testados: colestano, 19-hidroxicolesterol e 7-pregnenolona. Todos foram diluídos em hexano na concentração de 0,1 mg/mL.

3.5.2.1 Determinação da concentração de colesterol em amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos

Para estabelecer a concentração de colesterol em amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos foram analisadas 10 amostras de diferentes procedências e foram analisadas mais cinco amostras da ração escolhida para a validação do método.

3.5.2.2. Determinação da concentração de colesterol em amostras de farinha de carne e ossos (35 %)

Para estabelecer a concentração de colesterol em amostras de farinha de carne e ossos foram analisadas 6 amostras, seguindo o mesmo fluxograma de preparo de amostras de ração.

3.5.2.3. Determinação da concentração de colesterol na ração com adição de farinha de carne e ossos

Para se calcular a concentração de colesterol em amostras de ração adicionadas de farinha de carne e ossos foram feitas adições desta à ração, nas proporções de 3, 4, 5, 6 e 7 %, em 3 replicatas. Na proporção de 4 % foram preparadas mais 7 amostras.

3.5.2.4. Determinação da concentração de colesterol em amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo

Para se calcular a concentração de colesterol em amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo foram preparadas amostras, em 3 replicatas, seguindo o mesmo fluxograma de preparo das amostras de ração.

3.5.3. Linearidade

Para avaliação da linearidade do padrão foram analisadas soluções padrão de colesterol, nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1 e 0,5 mg/mL, em 3 replicatas. Para a avaliação da linearidade da matriz (ração) foram analisadas amostras de ração adicionadas de padrão de colesterol nas concentrações de: 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL, em 3 replicatas. Foram determinados, por regressão linear, a equação e o coeficiente de determinação e

construído o gráfico de resíduos, para cada um deles.

3.5.4. Seletividade e especificidade

A seletividade foi avaliada pela comparação dos tempos de retenção dos padrões de outros esteróides com o tempo de retenção do colesterol nas amostras de ração. Foi também realizada uma mistura dos padrões β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, ergosterol e vitamina D para verificar a interferência destes compostos com o pico de colesterol. A confirmação do pico de colesterol nas amostras de ração foi feita pela adição de padrão de colesterol às amostras e comparação com o tempo de retenção do padrão.

Ainda como avaliação da seletividade, duas amostras analisadas neste experimento, foram analisadas em outro laboratório, utilizando outro equipamento de cromatografia gasosa e outro tipo de coluna cromatográfica (apolar, composta de 5 % difenil e 95 % dimetil polisiloxano), igual as colunas utilizadas na maioria dos trabalhos para determinação de colesterol e fitoesteróis.

A especificidade foi avaliada para a confirmação da presença de colesterol nas amostras de ração. Foram preparadas amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo (ingredientes mais utilizados nas rações) e estas foram analisadas tanto em cromatógrafo gasoso com detector por ionização em chamas, quanto em cromatógrafo líquido acoplado aos detectores por arranjo de diodos e espectrômetro de massas. Em ambas as técnicas foram feitas adições de padrão de colesterol às amostras para confirmação do pico de colesterol.

No cromatógrafo gasoso foram analisadas, individualmente, cada uma das amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo.

No cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas, as amostras foram misturadas para aumentar a concentração e garantir a presença do pico de colesterol.

3.5.5. Limites de detecção e quantificação do equipamento

Para estabelecer o limite de detecção (LD) do equipamento foram analisadas seis concentrações de padrão de colesterol (0,5; 0,1; 0,05; 0,01;

0,005 e 0,001 mg/mL), em 3 replicatas. Na menor concentração injetada, na qual a altura do pico foi correspondente a 3 vezes o ruído foi considerado o limite de detecção do equipamento e, nesta concentração foram feitas mais quatro injeções. Foram avaliados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação entre as amostras.

Para a determinação do limite de quantificação, foi considerado um valor correspondente a 3 vezes o LD.

3.5.6. Precisão

Foram analisadas amostras de ração adicionadas de padrão de colesterol nas seguintes concentrações: 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL, em 6 replicatas para cada concentração. O padrão de colesterol foi adicionado à ração, após a pesagem, antes de iniciar a saponificação. Após serem colocados os reagentes para saponificação as amostras foram colocadas em ultra-som por um minuto.

A precisão das análises foi avaliada pela determinação do coeficiente de variação (CV) das seis repetições, de uma mesma concentração, para todas as concentrações.

Os coeficientes de variação obtidos foram comparados ao valor de CV obtido pela equação de Horwitz (1982). A equação é a seguinte:

$CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$, em que C é a fração mássica expressa sob a forma de uma potência de 10.

No caso desse experimento foi usado mg/g, portanto $C = 10^{-3}$, segundo Comissão (2002), para reprodutibilidade intralaboratorial.

3.5.7. Exatidão

Foram analisadas amostras de ração adicionadas de padrão de colesterol nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL, em 3 replicatas. A solução padrão de colesterol foi adicionada à ração, após a pesagem, antes de ser iniciada a saponificação. Após serem colocados os reagentes para saponificação, as amostras foram colocadas em ultra-som por um minuto. Foram também analisadas amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos em seis repetições. Foi calculada a recuperação obtida de

cada concentração utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{obtida}} \times 100}{C_{\text{esperada}}}$$

Na qual:

C_{obtida} = Concentração determinada pela análise na amostra adicionada

C_{esperada} = Concentração real adicionada na matriz

Depois de determinadas as recuperações nas diferentes concentrações estudadas, estas foram comparadas ao intervalo de variação aceitável na faixa de concentração recomendada (Comissão, 2002). Os valores de recuperação preconizados são de 80 a 110 % quando $c \geq 1,0 \times 10^{-8}$, na qual c = fração de massa. Neste experimento, c foi igual a 10^{-3} , pois foi utilizada mg/g como unidade para colesterol.

3.5.8. Robustez

Para avaliação da robustez foram utilizados os seguintes parâmetros:

- 1) Extração de insaponificáveis utilizando hexano de marca diferente da utilizada durante os procedimentos da validação;
- 2) Maior tempo de contato do solvente (hexano) com a amostra durante a extração dos insaponificáveis;
- 3) Injeção no cromatógrafo com seringa de modelo diferente da utilizada durante os procedimentos da validação; porém da mesma marca e volume;
- 4) Injeção das amostras antes da limpeza do *insert* (imediatamente antes de exceder o número máximo de injeções por *insert*);
- 5) Injeção das amostras depois da limpeza do *insert* (imediatamente após a limpeza com solventes apropriados);
- 6) Injeção das amostras no cromatógrafo após 10 dias de armazenamento em refrigerador. As amostras foram armazenadas secas por 10 dias e no dia das análises foram diluídas no solvente para injeção e foram colocadas no ultra-som por 1 minuto.

Para a avaliação dos parâmetros 1, 2 e 6 foram preparadas amostras distintas em 3 replicatas. Para a avaliação dos parâmetros 3, 4 e 5 foi preparada uma mesma amostra, em 3 replicatas.

O modelo estatístico utilizado para análise dos dados foi o de comparação de pares e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste T de student, sendo o grau de confiança de 95 %, segundo Sampaio (2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparo das amostras

Inicialmente foi realizada a determinação de lipídios totais na ração e na farinha de carne e ossos verificando-se concentrações de 36,8 e 60 mg/g, respectivamente.

Não foi encontrado nenhum trabalho apresentando a concentração de lipídios totais em amostras de ração para ruminantes, entretanto, Belitz e Grosch (1997) apresentaram o teor de lipídios em amostras de milho iguais a 4,5 %.

Após a determinação de lipídios totais foram realizadas as análises cromatográficas, entretanto, inicialmente utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência, sendo, posteriormente, substituída pela cromatografia gasosa devido a sua maior sensibilidade e melhor separação do pico de colesterol na presença de picos de outros esteróis. A validação do método foi realizada utilizando-se apenas a cromatografia gasosa.

Nos primeiros testes para determinação do melhor método de preparo das amostras, inicialmente, utilizou-se amostras de ração e amostras de farinha de carne e ossos para que fossem verificados o perfil dos cromatogramas e o pico de colesterol.

O primeiro método testado foi a saponificação da amostra com aquecimento. Foi utilizado o álcool

etílico como reagente, pois de acordo com o trabalho de Ferreira (2000), testando diferentes solventes para saponificação, o álcool etílico apresentou melhores resultados. Ahmida et al. (2006) fizeram a saponificação da amostra com aquecimento para determinação de fitoesteróis no plasma sanguíneo. Eles utilizaram como reagentes o hidróxido de potássio e o álcool etílico, porém, deixaram as amostras sob aquecimento à 70 °C por 1 hora.

Quando foi testado este método, apesar de serem utilizadas diferentes quantidades de amostras e reagentes, após a aplicação de calor, houve a formação de uma solução viscosa e densa nas amostras de ração, inviabilizando sua continuidade. Além disso, não houve solubilização total das amostras de ração e nas amostras de farinha de carne e ossos restaram estruturas que sugeriam ser ossos.

No segundo método testado foi feita a extração de lipídios de acordo com o método de Folch et al. (1957) seguida de saponificação dos lipídios de acordo com Bohac et al. (1988) em amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos. A extração dos insaponificáveis foi realizada com hexano, pois o resultado do trabalho de Ferreira (2000) testando diferentes solventes para extração, apontou o hexano como o mais eficiente, além de indicar que devem ser realizadas no mínimo 3 extrações.

Após evaporação do hexano e diluição em fase móvel, na análise por cromatografia líquida (Figura 3) verificou-se que nos cromatogramas das amostras de farinha de carne e ossos havia o pico de colesterol e nos cromatogramas das amostras de ração não havia o pico de colesterol, mas havia a presença de vários picos interferentes.

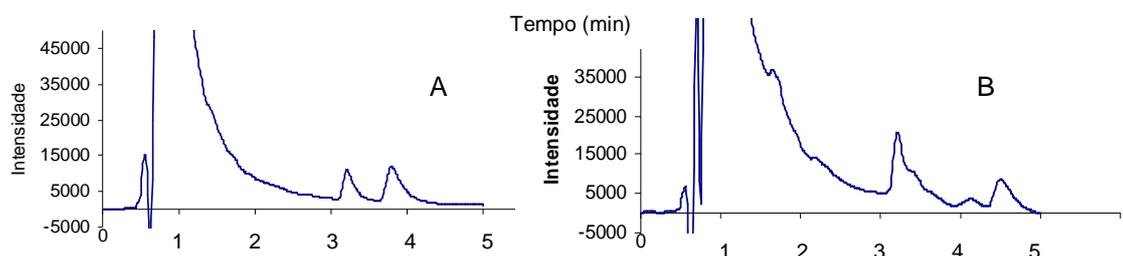


Figura 3 - Cromatogramas de amostras de farinha de carne e ossos (A) e ração para ruminantes sem adição de farinha de carne e ossos (B), preparadas com 5 g, obtidas pelo método de Folch e injeção em CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol (85:15), coluna C₁₈, 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão de 2 mL/min. Pico (1): colesterol.

O método de extração de lipídios por Folch e posterior saponificação dos lipídios apresentou-se insatisfatório, porque não se observou pico de colesterol nas amostras de ração, além disso, utilizou grande quantidade de solventes, possui várias etapas em sua execução, sendo, portanto, muito laborioso e demorado. Em adição, utilizou como solventes o clorofórmio e o metanol, os quais têm-se evitado para preservação do meio ambiente e da saúde humana.

Dionisi et al. (1998), Ferreira (2000) e Toivo et al. (2001) compararam os métodos de extração do colesterol por saponificação da amostra e por saponificação dos lipídios e observaram melhores resultados com a saponificação da amostra. Além disso, Toivo et al. (2001) verificaram que a saponificação da amostra evitou a formação de artefatos e produtos da oxidação.

Da mesma forma, Kovacs (1990), Fenton e Sim (1991), Fenton (1992), Alonso et al. (1995), Maraschiello et al. (1996), Jekel e Vaessen (1998), Ferreira (2000) e Saldanha et al. (2004) também sugeriram a saponificação da amostra de

alimentos, porque, além deste método reduzir tempo e mão-de-obra também utiliza menor volume de solvente, diminuindo o custo da análise e o problema do descarte de substâncias tóxicas.

Como não foi observado o pico de colesterol nas amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos, foram adicionados 10 % desta à ração com intuito de melhorar a visualização do pico de colesterol no cromatograma.

Desta forma, no terceiro método testado foi utilizada ração com adição de 10 % de farinha de carne e ossos. Foi realizada hidrólise ácida e extração dos lipídios por Soxhlet, seguida de saponificação com aquecimento com intuito de reduzir a presença de picos interferentes. Entretanto, as amostras não se diluíram bem na fase móvel (acetonitrila:isopropanol) para cromatografia líquida, restando muita fração insaponificável aderida ao tubo de ensaio e, além disso os cromatogramas apresentaram o pico de colesterol saindo em tempo de retenção muito próximo ao dos picos interferentes (Figura 4). Além de ser um método bastante laborioso por apresentar várias etapas em sua execução.

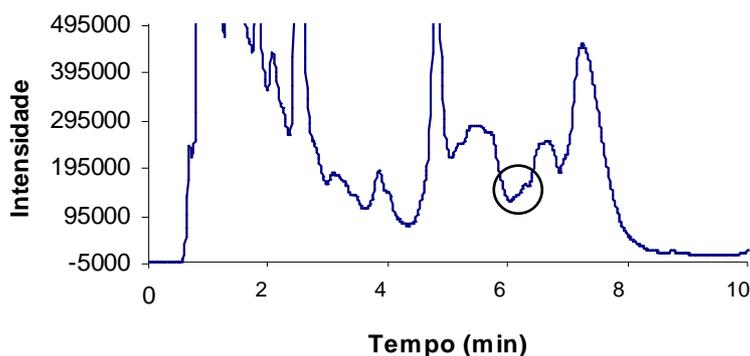


Figura 4 - Cromatograma de amostra de ração (com adição de 10 % de farinha de carne e ossos), preparada com 10 g, obtida por hidrólise ácida e injeção em CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol (98:02), coluna C₁₈, 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão de 2 mL/min. Área demarcada com círculo: colesterol.

Toivo et al. (2001) compararam o método de saponificação da amostra com o de hidrólise ácida seguida de saponificação dos lipídios, para extração da fração insaponificável de farinha de trigo. A hidrólise ácida foi realizada para liberação de esteróis glicosídicos, pois os autores observaram que em condições alcalinas não ocorre quebra das ligações dos lipídios com carboidratos. Entretanto, no presente trabalho, como o objetivo foi extrair o colesterol proveniente apenas da farinha de carne e ossos quando presente na ração, a etapa de hidrólise ácida pode ser omitida.

A hidrólise enzimática foi o quarto método testado e foi feita ainda no intuito de eliminar os picos interferentes e também obter solubilização total das amostras de ração com adição de 10 % de farinha de carne e ossos. Entretanto, observou-se que após este procedimento, ainda restou amostra de ração sem solubilizar. Ao final da hidrólise enzimática, a fim de melhorar a separação entre as partes sólida (ração) e líquida (reagentes para hidrólise enzimática) foi feita filtração a vácuo, mas, ainda assim, não houve separação satisfatória, além de ocorrer muita perda de amostra.

Nos primeiros testes realizados não foi possível uma boa extração dos lipídios, pois não ocorreu separação adequada da fase hexânica, devido a formação de emulsão. Tentou-se quebrar a emulsão acrescentando-se solução supersaturada de NaCl e refrigerando a amostra, entretanto estes procedimentos não tiveram êxito.

Ferreira (2000) relata que o sal modifica o equilíbrio de fases do sistema, aumentando o coeficiente de distribuição para o álcool etílico e a seletividade do solvente, de forma que o álcool etílico torna-se mais solúvel na fase orgânica. Entretanto, como desvantagem, a presença de eletrólitos aumenta a solubilização do colesterol na fase aquosa, havendo redução da concentração na amostra, não sendo, portanto, indicado para análises quantitativas.

A fim de evitar a formação de emulsão no momento da extração da fração lipídica, foram testados outros dois solventes: o éter etílico e o ciclohexano. Novamente não houve boa separação das fases e os cromatogramas obtidos por cromatógrafo líquido das amostras de ração não apresentaram melhores resultados em relação ao uso de hexano.

Para melhorar a separação da fração lipídica foi testada a centrifugação das amostras à 3500 rpm por 10 minutos à 20 °C, de acordo com Ahmida et al. (2006). Após a centrifugação verificou-se boa separação da fase hexânica, entretanto, na análise por cromatografia líquida observou-se que a área do pico de colesterol apresentava-se pequena em relação as áreas dos picos dos interferentes. Em compensação, apresentou aumento da área do colesterol em relação as áreas das amostras obtidas pelos métodos anteriormente testados e analisados por cromatografia líquida (Figura 5).

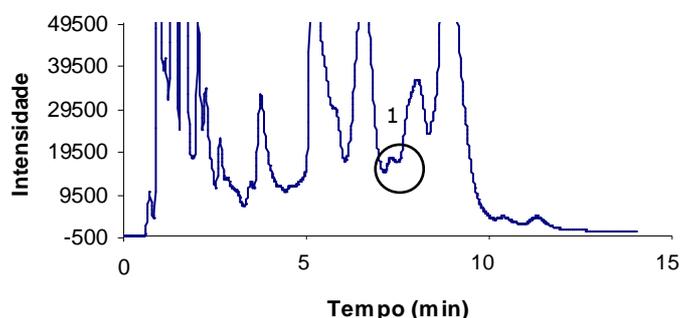


Figura 5 - Cromatograma de amostra de ração para ruminantes (com adição de 10 % de farinha de carne e ossos), preparada com 10 g, obtida por hidrólise enzimática e injeção em CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel acetoneitrila:isopropanol (98:02), coluna C₁₈, 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão de 2 mL/min. Pico (1) colesterol.

Este aumento da concentração de colesterol nas amostras obtidas por hidrólise enzimática pode ter ocorrido em função da liberação de óleo da parede celular de células vegetais. Ferrari e Santos (2005) propuseram um método de hidrólise enzimática para extração de lipídios totais da soja, utilizando diversas enzimas e menor quantidade de solventes para extração do óleo da parede celular, uma vez que este óleo, muitas vezes, não é adequadamente extraído com solventes.

Como o método de hidrólise enzimática é bastante laborioso e também não promoveu solubilização total das amostras de ração e após a análise dos cromatogramas obtidos em cromatógrafo líquido verificou-se que não houve diminuição dos picos interferentes, foi testado o quinto método, que foi a saponificação das amostras sem aquecimento.

Inicialmente foram preparadas amostras de 1 g (teste 1) de farinha de carne e ossos e amostra de ração com adição de 10 % de farinha de carne e ossos, com o método de saponificação das amostras sem aquecimento. Verificou-se que após a saponificação também não houve solubilização total das amostras de ração, mas houve solubilização das amostras de farinha de carne e ossos, como verificado no preparo empregando-se outros métodos anteriormente testados, entretanto, como o objetivo deste trabalho foi detectar o colesterol proveniente da farinha de carne e ossos, a não solubilização total da ração foi considerada irrelevante.

Durante o preparo das amostras 1 e 3 do teste 2, no qual utilizou-se o tempo de 16 horas para saponificação, verificou-se que não ocorreu solubilização total das pastilhas de KOH e nas amostras 1 e 2 do mesmo teste, nas quais foram adicionados 5 mL de água para extração da matéria insaponificável, não ocorreu separação das fases (hexânica e aquosa), mesmo as amostras tendo sido deixadas por 12 horas em geladeira e após adição de NaCl, o que impossibilitou a continuidade do procedimento. Nas amostras 3 e 4 do mesmo teste, onde foram acrescentados 10 mL, ocorreu separação das fases.

Como não houve separação das fases hexânica e aquosa quando foram acrescentados 5 mL de água, foram então alteradas as proporções de água para extração (teste 3). Foram adicionados 10 e 20 mL de água para extração. Novamente ocorreu separação das fases quando foram acrescentados 10 mL, entretanto, não ocorreu onde foram acrescentados 20 mL.

Após a adição de hexano para extração, a não separação das fases quando foram adicionados 5 e 20 mL de água, pode ter ocorrido em função da solubilidade limitada do solvente (hexano) no sistema álcool etílico-água, devido as poucas quebras de ligações entre as moléculas de álcool etílico e água como também foi observado por Ferreira (2000).

Devido ao pH alcalino (9) medido nas amostras verificou-se a importância de realizar lavagem com água destilada, para retirada do KOH após a saponificação, pois a amostra alcalina pode danificar a fase estacionária da coluna cromatográfica, que deve operar entre o pH de 2 a 8.

Observando-se os cromatogramas obtidos em cromatógrafo líquido de amostras de ração pesando 1 e 2 g, com adição de 10 % de farinha de carne e ossos, verificou-se que o pico de colesterol era muito pequeno e estava próximo de outros picos interferentes, dificultando sua separação e resolução. A adição de menores percentuais de farinha de carne provavelmente não seria detectada.

A separação do pico de colesterol nas amostras de ração é complicada pela presença de picos interferentes, ou seja, picos de outros esteróis. Além disso, a concentração de colesterol nas amostras de ração é muito pequena. Na tentativa de melhorar esta separação foram realizados três procedimentos: a alteração da proporção da fase móvel, a velocidade do fluxo da coluna e o aumento da quantidade de amostra.

Concomitantes a estes testes foram promovidas alterações no solvente para diluição das amostras de ração, pois, com a fase móvel (acetonitrila:isopropanol, 85:15) não ocorreu solubilização total, restando fração insaponificável aderida à parede do tubo de

ensaio. Verificou-se que as amostras foram melhor dissolvidas em fase móvel acetonitrila:isopropanol 50:50.

Os cromatogramas apresentando o teste com diferentes fases móveis mostram a separação do colesterol em função do aumento da polaridade da fase móvel (Figura 6).

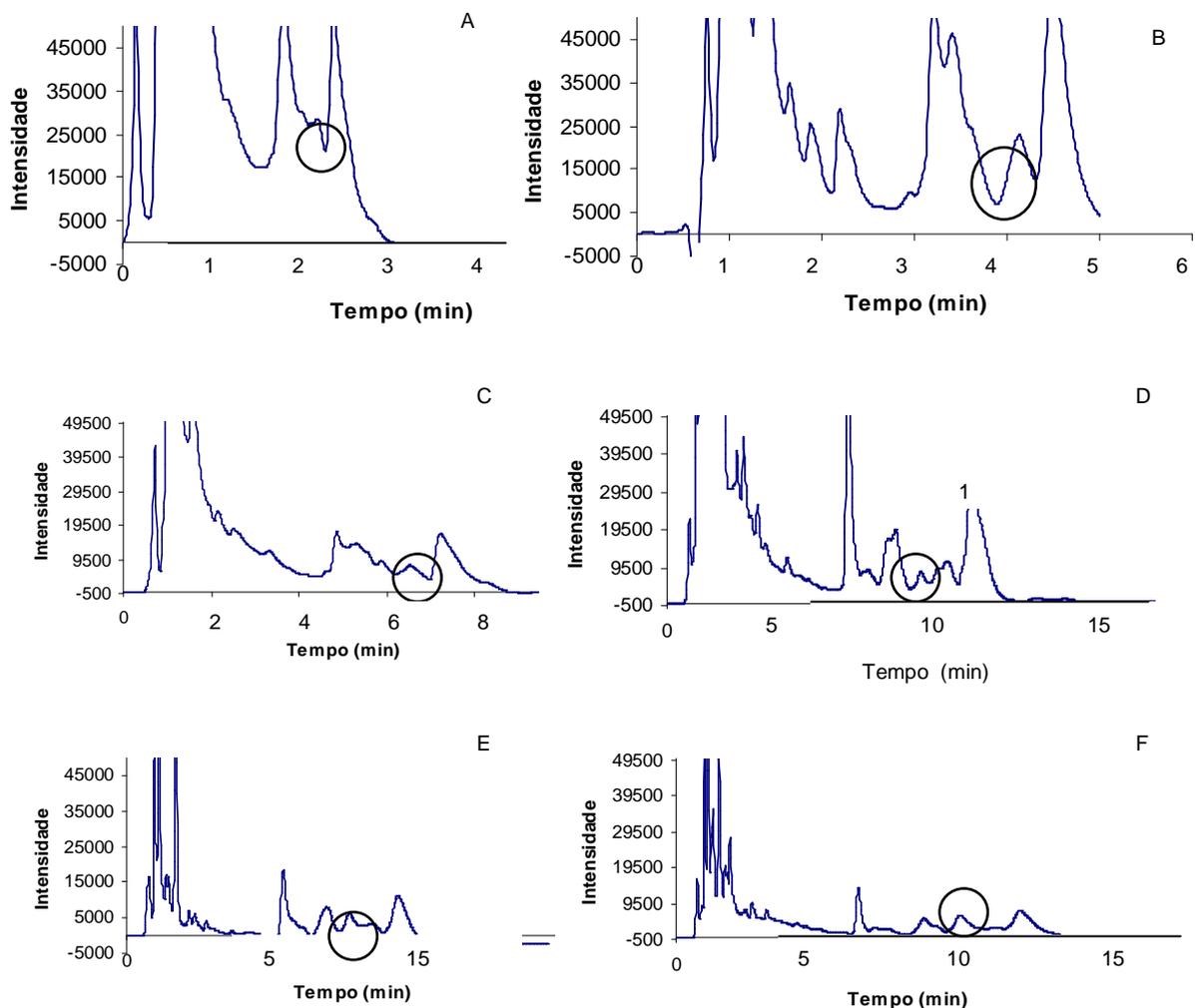


Figura 6 - Cromatogramas de amostras de ração (com 10 % de farinha de carne e ossos) preparadas com 2 g, obtidos pelo método de saponificação da amostra sem aquecimento e injeção em CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol: A (70:30); B (85:15); C (95:05); D (98:02); E (99:01); F (100 % acetonitrila), coluna C₁₈, 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão de 2 mL/min. Área circundada: colesterol. Pico (1) colesterol.

Após os testes realizados com diferentes proporções de fase móvel, notou-se que houve melhor separação do colesterol em relação aos outros esteróis, utilizando-se a proporção de 98 % de acetonitrila e 2 % de isopropanol. Observou-se que o aumento da proporção de acetonitrila, entre as concentrações de 70:30 a 98:02, melhorou a separação dos picos, pois houve aumento da polaridade da fase móvel, ocorrendo maior retenção dos compostos à coluna e aumento do tempo de análise.

Observa-se também que nas proporções de 99:01 e 100 % acetonitrila houve maior separação dos picos, entretanto, a separação do colesterol ficou prejudicada.

Mesmo que a alteração da fase móvel tenha promovido melhora na separação do colesterol, o pico apresentava-se pequeno e, por isso, foram preparadas amostras com maiores quantidades de ração, a fim de verificar se promoveria aumento da área do pico de colesterol e melhor separação

em relação aos picos de interferentes com tempos de retenção próximos.

Entretanto, os cromatogramas das amostras pesando 4, 6 e 8 g não apresentaram uma área significativamente maior no pico de colesterol em relação ao de picos interferentes e por isso tentou-se aumentar para 10 g.

Da mesma forma, ao analisar os cromatogramas das amostras preparadas com 10 g (Figura 7) por cromatografia líquida de alta eficiência, verificou-se que além do pico de colesterol não ter aumentado, ele não estava presente. Devido a este fato, foram preparadas mais duas amostras com este peso, aumentando-se a quantidade de reagente, com intuito de melhorar a saponificação. As alterações de reagentes foram de 20 mL de álcool etílico para 70 mL e de 20 g

de hidróxido de potássio para 30 e 40 g, respectivamente nas amostras 2 e 3.

Na amostra 3 (Tabela 13) que utilizou 40 g de hidróxido de potássio, não houve solubilização total das pastilhas de KOH e em ambas (amostras 2 e 3 da Tabela 13) houve formação de uma solução densa e viscosa, inviabilizando as extrações e, além disso, o volume total era grande, o que dificultou a escolha de vidraria.

A ausência do pico de colesterol nas amostras preparadas com 10 g pode estar relacionada ao maior aumento dos picos interferentes, com tempos de retenção próximos. Desta forma, verificou-se que ao aumentar a quantidade de amostra, aumentam as áreas dos picos interferentes com maior intensidade que a área do pico de colesterol e, por isso, este não se separa.

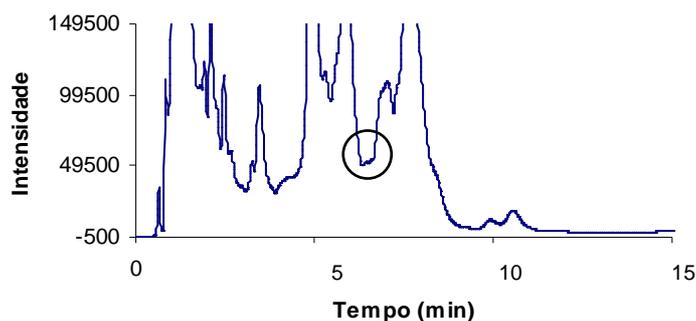


Figura 7 - Cromatograma de amostra de ração (com adição de 10 % de farinha de carne e ossos) preparadas com 10 g, obtida pelo método de saponificação da amostra sem aquecimento e injeção em CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol (98:02); coluna C₁₈, 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão de 2 mL/min. Área circundada: tempo de retenção do colesterol.

Os cromatogramas obtidos por cromatógrafo líquido das amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos, obtidas pelo método de Folch foram comparados com os cromatogramas obtidos por saponificação direta das amostras sem aquecimento. Foi constatado que este último era melhor porque apresentou um melhor perfil dos picos e maior área do pico de colesterol nas amostras de farinha de carne e ossos. Além disso, o método utilizou menor quantidade de solventes e foi de mais fácil execução, entretanto, o pico de colesterol nas amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos, quando obtida por

cromatografia líquida, não apresentou separação satisfatória.

Comparando-se o perfil dos cromatogramas obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, de amostras de ração com adição de farinha de carne e ossos, preparadas com o método de hidrólise enzimática, observou-se que eram semelhantes aos obtidos por saponificação das amostras sem aquecimento, entretanto, a saponificação da amostra sem aquecimento é um método mais rápido por apresentar menor número de etapas em sua execução.

Ao se comparar os cromatogramas, obtidos por cromatografia líquida, de amostras de ração verificou-se que os melhores resultados foram os obtidos com o método de saponificação das amostras sem aquecimento, preparadas com 1 g. Devido também ao menor número de etapas no preparo e menor uso de reagentes, foi decidido, preparar as amostras por este método.

Para otimização da extração do colesterol foi realizado planejamento experimental e a seguir este método foi validado.

4.2. Planejamento para otimização da extração do colesterol

Diante dos resultados obtidos nos testes foram determinadas as variáveis para a execução do planejamento experimental, utilizando-se o método de saponificação das amostras sem aquecimento.

A otimização do método foi realizada em 2 fases através de planejamentos experimentais sequenciais. Na primeira fase foram verificados os parâmetros de análise estatisticamente significativos. Os resultados do planejamento I são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultado do planejamento I, fatorial 2^{8-4} e resposta dada pela área do pico de colesterol por unidade de peso (g), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

Ensaio	OR*	p*	EtOH*	KOH*	T*	Água* Extraç.	n*	Água neut.	Solvente*	Colesterol Área/ g
1	5	1	20	3,0	20	10	3	2,0	A	5430
2	6	2	20	3,0	20	10	5	3,0	C	6227
3	7	1	20	4,0	24	10	3	3,0	C	6102
4	3	2	20	4,0	24	10	5	2,0	A	9982
5	17	1	30	3,0	24	10	5	3,0	A	4339
6	15	2	30	3,0	24	10	3	2,0	C	4792
7	4	1	30	4,0	20	10	5	2,0	C	7478
8	14	2	30	4,0	20	10	3	3,0	A	4307
9	11	1	20	3,0	24	14	5	2,0	C	5315
10	10	2	20	3,0	24	14	3	3,0	A	3921
11	18	1	20	4,0	20	14	5	3,0	A	5409
12	1	2	20	4,0	20	14	3	2,0	C	7401
13	19	1	30	3,0	20	14	3	3,0	C	8614
14	12	2	30	3,0	20	14	5	2,0	A	10629
15	9	1	30	4,0	24	14	3	2,0	A	4339
16	2	2	30	4,0	24	14	5	3,0	C	6878
17	16	1,5	25	3,5	22	12	4	2,5	B	6325
18	13	1,5	25	3,5	22	12	4	2,5	B	5757
19	8	1,5	25	3,5	22	12	4	2,5	B	5089

* OR = ordem de realização; p = peso da amostra (g); EtOH = álcool etílico; KOH = hidróxido de potássio; T = tempo de saponificação; Água extraç = volume de água para extração após a saponificação; n = número de extrações; Água neut. = volume de água para neutralização do KOH; solvente = A=40 % acetonitrila, 60 % isopropanol; B=50 % acetonitrila; 50 % isopropanol; C=60 % acetonitrila; 40 % isopropanol.

A Tabela 19 apresenta os efeitos das variáveis sobre a resposta considerando o erro puro, pois desta forma, é possível observar o desvio-padrão entre os pontos centrais, que refletem a repetibilidade do método. A análise dos efeitos

ao nível de confiança de 90 % ($p < 0,10$) apresentou como variáveis estatisticamente significativas o tempo de saponificação, número de extrações com hexano e volume de água para neutralização.

Tabela 19 - Efeitos das variáveis independentes no valor da área do pico de colesterol/g de amostra obtidas no CLAE, utilizando como parâmetro o erro puro.

Fator	Efeito	Desvio Padrão	t(10)	p
Média	6294	143	44,01	0,001
Peso amostra (g)	733	312	2,35	0,143
Massa de KOH (g)	173	312	0,55	0,635
Vol. álcool etílico (mL)	43	312	0,14	0,903
Tempo de saponificação (h)	325	312	1,04	0,407
Vol. água extração (mL)	-1246	330	-3,77	0,064
Número de extrações	1263	312	4,05	0,056
Vol. água neutralização (L)	-1352	312	-4,33	0,049
Solvente	401	312	1,28	0,328

Os valores em negrito apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,10$)

Após a verificação das variáveis estatisticamente significativas do planejamento I, verificou-se que o peso da amostra, a massa de KOH e o volume de álcool etílico não afetaram a eficiência da saponificação, assim como não houve diferença de solubilidade da amostra entre as proporções de solvente analisadas. Desta forma, estes valores foram fixados em 1 g de amostra; 3 g de KOH e 20 mL de álcool etílico, diminuindo, assim, a quantidade de reagentes. A proporção de solvente foi fixada em 50:50 devido a maior facilidade no preparo.

O sinal negativo do efeito, verificado em duas variáveis, indicou que houve uma diminuição no valor da área do pico quando foi utilizado o nível maior (+1). Desta forma, o volume maior de água para neutralização do KOH e o maior número de extrações da matéria insaponificável, diminuíram a eficiência para extração do colesterol, assim como menores tempos de saponificação apresentaram a tendência de serem insuficientes.

O volume de água para neutralização do KOH pode ter sido excessivo, causando a retirada do colesterol do solvente contendo a matéria insaponificável. O colesterol pode ser dissolvido na fase aquosa, mesmo que em baixas concentrações, devido a parte polar de sua molécula, representada pelo grupo hidroxila no carbono 3 e a dupla ligação no carbono 5. Entretanto, com maior número de extrações da matéria insaponificável, uma quantidade maior de interferentes pode ter sido extraída juntamente com o colesterol, interferindo desta forma na

eluição dos compostos da coluna, e acarretando na diminuição da sua concentração nas amostras.

Foram iniciados os testes com a cromatografia gasosa e algumas das amostras de ração e de farinha de carne e ossos foram analisadas com esta técnica. Após a comparação dos cromatogramas verificou-se uma melhor resolução do pico de colesterol, mesmo na presença dos interferentes, pela cromatografia gasosa. Por este fato optou-se por utilizá-la também devido a sua maior sensibilidade. Os cromatogramas apresentados daqui em diante serão aqueles obtidos por cromatografia gasosa.

Abidi (2001) comparando diferentes técnicas cromatográficas para determinação de esteróis em alimentos e óleos vegetais, relatou que a cromatografia gasosa foi melhor que a líquida porque selecionou melhor os diferentes esteróis.

Lagarda et al. (2006) publicaram um trabalho de revisão sobre análise de fitoesteróis em alimentos, apresentando diversas técnicas cromatográficas. Os autores concluíram que para a análise de esteróis, a CG-DIC deve ser preferida em relação à CLAE e à cromatografia por fluido supercrítico devido a sua maior sensibilidade e precisão.

Após a verificação das variáveis estatisticamente significativas do planejamento I foi realizado o planejamento II. As variáveis utilizadas foram a água para neutralização do KOH, o tempo de saponificação e o número de extrações.

Foram acrescentadas as etapas de adição de sulfato de sódio anidro (3 g) e lavagem deste com hexano (10 mL). O sulfato de sódio anidro foi introduzido ao método devido à sobra de água no fundo dos tubos de ensaio, após a secagem do extrato hexânico em fluxo de nitrogênio. A

lavagem com hexano foi necessária para retirada de toda amostra que poderia ter ficado retida.

Os resultados do planejamento II e a análise de variância são apresentados respectivamente nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20 - Resultado do planejamento II, fatorial completo 2^3 e resposta dada pela área do pico de colesterol por unidade de peso (g), utilizando a cromatografia gasosa.

Ensaio	Ordem de realização	Água para neutralização do KOH (L)	Tempo de saponificação (h)	Nº extrações	Colesterol Área/g
1	12	1	23	2	251163
2	11	1	23	4	281007
3	6	1	27	2	262569
4	2	1	27	4	186864
5	4	2	23	2	280797
6	10	2	23	4	309315
7	5	2	27	2	284282
8	1	2	27	4	290130
9	3	1,5	25	3	221409
10	9	1,5	25	3	253480
11	7	1,5	25	3	237820
12	8	1,5	25	3	226127

Por se tratar de um planejamento fatorial completo os coeficientes de regressão foram analisados diretamente ao invés de se realizar a análise dos efeitos. A equação polinomial de segunda ordem expressa a seguir foi empregada para correlacionar a concentração de colesterol obtida através do CG com as variáveis de extração.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_i x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k b_{ij} x_i x_j$$

(i=1-3, j=1-3)

A equação polinomial de segunda ordem foi ajustada aos dados experimentais, ou seja, as variáveis não significativas a 95 % de confiança foram consideradas resíduos (falta de ajuste). Os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 22. O coeficiente de regressão do modelo estatisticamente significativo ao nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$) foi apenas o número de extrações. Estes resultados podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 8).

Tabela 21 – Coeficientes de regressão do modelo, utilizando como parâmetro o erro puro, no planejamento II.

Fator	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	t(3)	p
Média	257080	4125	62,3	0,000
Número de extrações (n)	22865	5052	4,5	0,020
Tempo de saponificação (h)	-12305	5052	-2,4	0,093
Vol. água neutralização (L)	-1437	5052	-0,3	0,795
n x h	8380	5052	1,7	0,196
n x L	10028	5052	2,0	0,141
h x L	-16027	5052	-3,2	0,050

Os valores em negrito apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

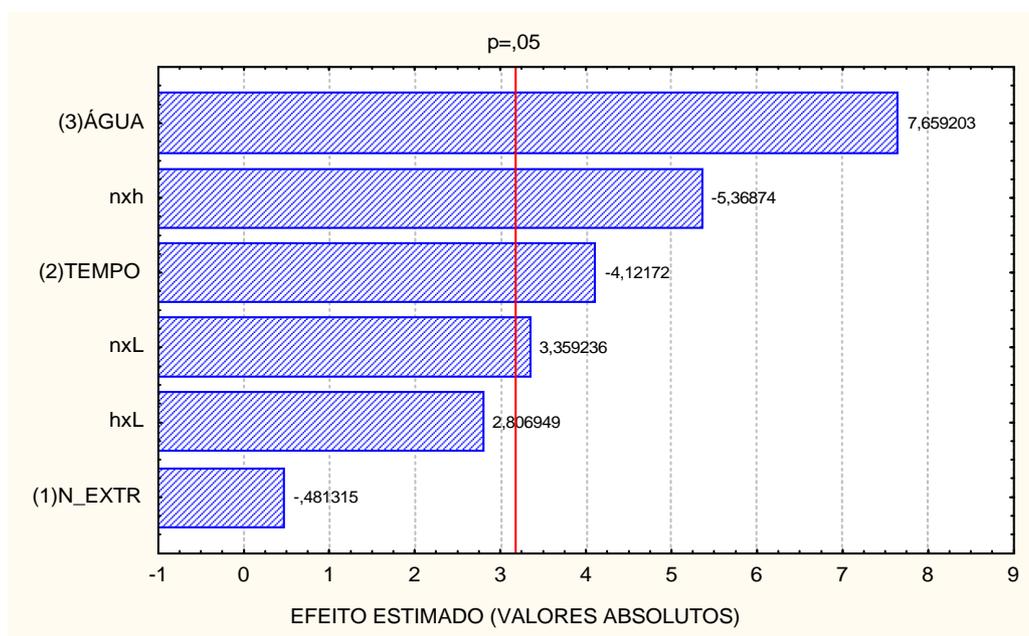


Figura 8 - Gráfico de Pareto.

A Figura 9 apresenta os valores experimentais em relação aos valores preditos pelos modelos codificados.

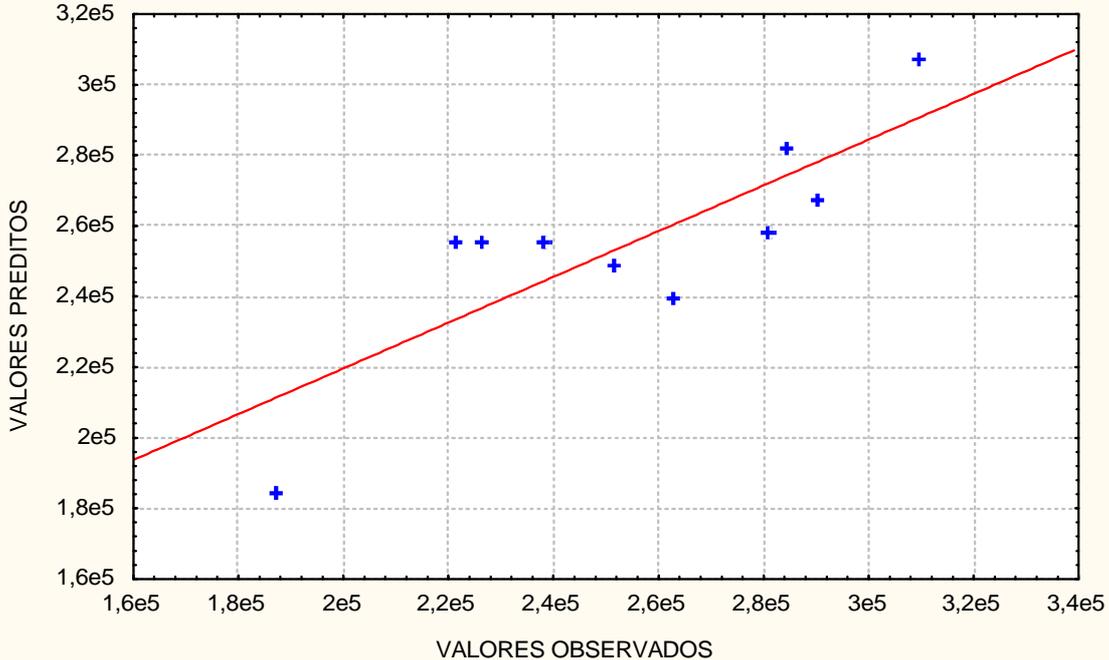


Figura 9 - Valores experimentais x valores preditos pelo modelo.

De acordo com a análise de variância (Tabela 22) realizada para os resultados obtidos o valor calculado de F foi maior que o F tabelado indicando que o modelo é preditivo. O modelo foi mantido com todas as variáveis, incluindo as não estatisticamente significativas para a construção das superfícies de resposta.

O nível ótimo para cada variável foi obtido através da observação das superfícies de respostas e das respectivas curvas de contorno (Figuras 10, 11 e 12).

Tabela 22 - Análise de variância.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Fcalculado
Regressão	0,1511	6	0,0252	2,5316
Resíduos	0,0596	6	0,0099	
Total	0,2108	12	0,0175	

$r^2: 0,67$

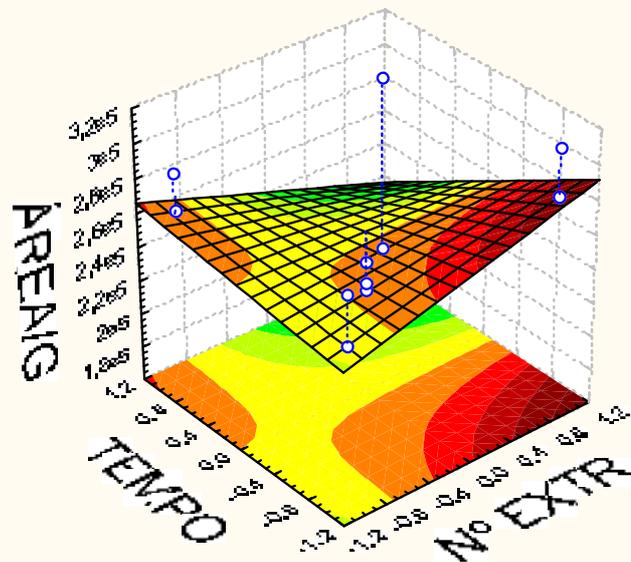


Figura 10 - Superfície de resposta para a área relativa do colesterol em função do número de extrações e tempo de saponificação.

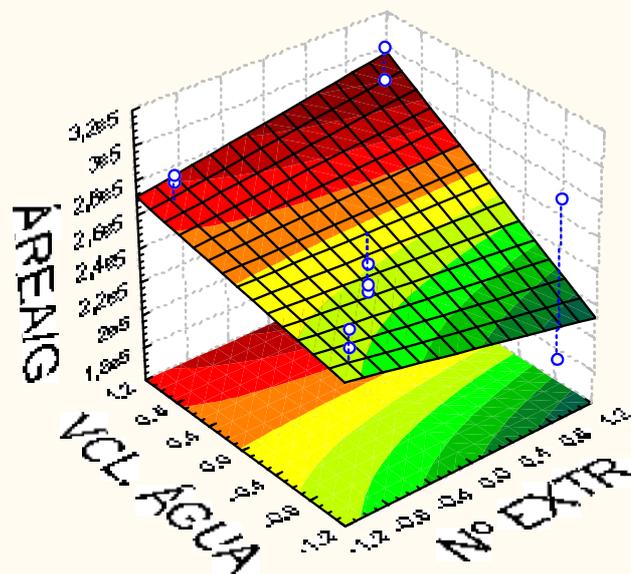


Figura 11 - Superfície de resposta para a área relativa do colesterol em função do número de extrações e volume de água para neutralização.

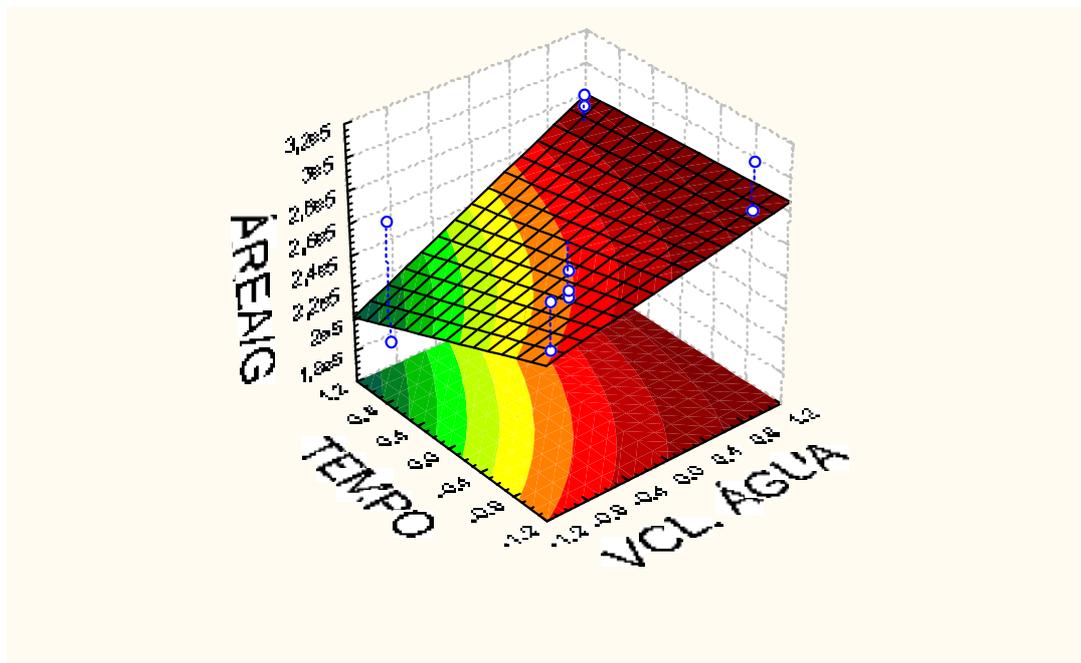


Figura 12 - Superfície de resposta para a área relativa do colesterol em função do volume de água para neutralização e tempo de saponificação.

Após a verificação dos resultados obtidos no planejamento experimental foram determinadas

as melhores condições de preparo das amostras, como apresentado no fluxograma da Figura 13.

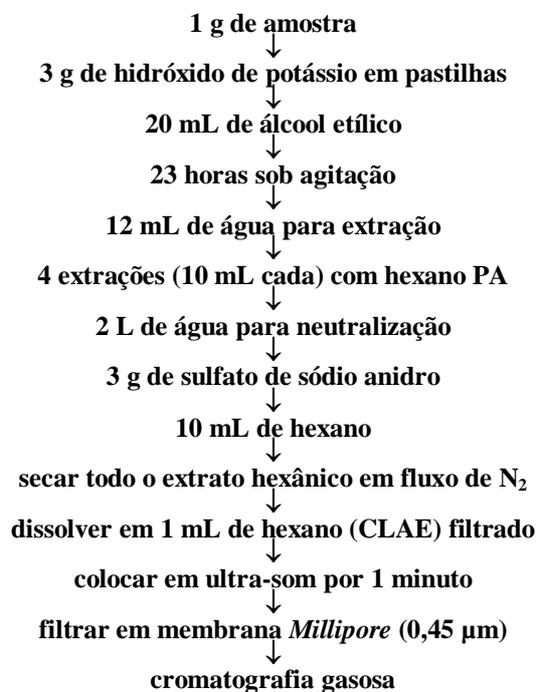


Figura 13 - Fluxograma de preparo das amostras de ração por saponificação da amostra sem aquecimento.

Algumas das etapas de preparo das amostras estão representadas na Figura 14.

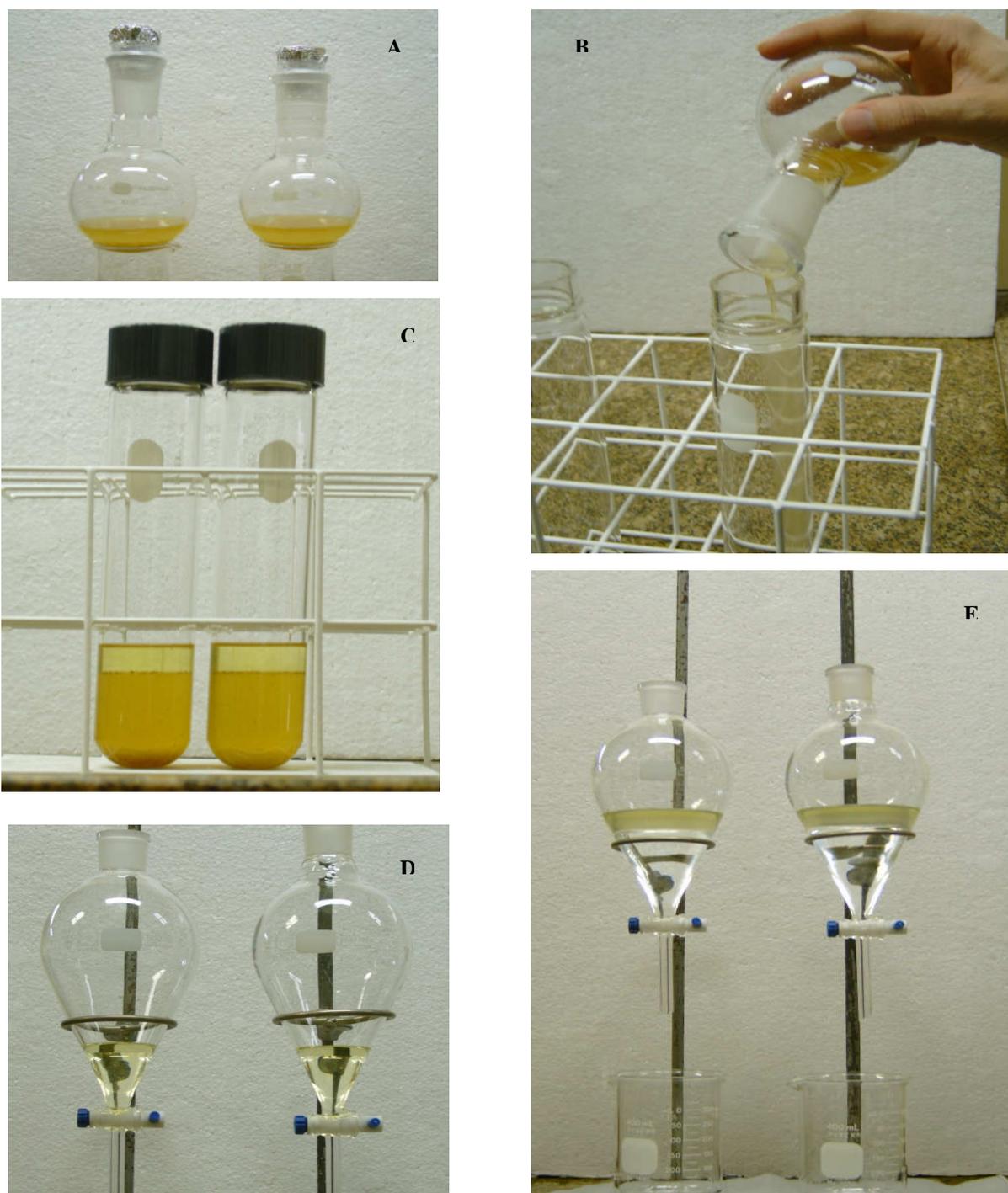


Figura 14 – Imagens das etapas de preparo das amostras utilizando o método de saponificação das amostras sem aquecimento. (A) amostras após saponificação; (B) transferência de amostra para realização da etapa de extração; (C) adição de hexano para extração dos insaponificáveis; (D e E) lavagem das amostras com água destilada para neutralização do KOH.

Na imagem D da Figura 14, observa-se a separação das fases hexânica e aquosa.

O resultado das áreas do pico de colesterol, nas amostras preparadas de acordo com o fluxograma, para validação do planejamento é

apresentado na Tabela 23. Observou-se que o valor do coeficiente de variação foi baixo e, desta forma, o método apresentou repetibilidade, podendo ser utilizado para o preparo das amostras.

Tabela 23 - Amostras preparadas de acordo com fluxograma para verificação do coeficiente de variação e validação do planejamento

Amostra	Área
1	311898
2	301425
3	296654
4	281002
Média	297745
Desvio padrão	12850
CV (%)	4,3

Ferreira (2000) avaliando o coeficiente de partição do colesterol entre a fase aquosa e a fase com solventes, teve como resultado que a melhor proporção para determinação de colesterol é: 10 mL de álcool etílico, 5 mL de água e 10 mL de hexano para extração dos insaponificáveis. Desta forma, a proporção de água e álcool proposta no presente trabalho apresentou-se equivalente às preconizadas pelo autor, enquanto a proporção de solvente apresentou-se inferior.

Não foi encontrado nenhum trabalho utilizando cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia gasosa para determinação de colesterol em rações destinadas à alimentação de ruminantes. Entretanto, foram encontrados trabalhos utilizando ambas as técnicas para determinação de colesterol em outros substratos.

Após a saponificação de amostras de plasma sanguíneo com aquecimento, Ahmida et al. (2006) adicionaram 1 mL de água e foram feitas duas extrações para separação dos insaponificáveis com solução de 2 mL de hexano, álcool etílico e hidroxitolueno. Observou-se que apesar da amostra utilizada ter sido diferente, os autores utilizaram reagentes semelhantes para determinação de esteróis, entretanto, diferente do que foi observado neste trabalho, Ahmida et al. (2006) utilizaram menores quantidades de água para extração, assim como, verificaram extração total dos

insaponificáveis realizando-se apenas duas extrações com solvente.

4.3. Equipamentos e condições cromatográficas

Na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência não foi observado pico de colesterol nas amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos. Já na técnica de cromatografia gasosa foi observado o pico de colesterol devido a maior seletividade, sensibilidade e melhor resolução dos picos de esteróis em relação à CLAE.

Para a realização deste trabalho havia duas colunas capilares disponíveis para utilização em cromatógrafo gasoso. Uma das colunas era do tipo polar e a outra era de polaridade intermediária. Como a maioria dos trabalhos encontrados utilizava coluna com fase estacionária apolar (5 % difenil e 95 % dimetilpolisiloxano) optou-se, inicialmente por utilizar a coluna de polaridade intermediária (DB 1701[®], com fase estacionária composta de 14 % cianopropilfenil e 86 % dimetilpolisiloxano e 10m de comprimento, marca Varian).

Entretanto, ao serem analisadas amostras de ração com este tipo de coluna observou-se que o pico de colesterol apresentou um valor de área semelhante, tanto para as amostras de ração com adição de farinha de carne e ossos, quanto para

amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos.

Isso indicava que algum outro componente, possivelmente outro esterol, estava coelindo com o colesterol. Mesmo alterando-se outros parâmetros como temperatura do forno e do detector, assim como, testando diferentes programações de temperatura, velocidades de fluxo, etc, não foi possível separar o pico de colesterol utilizando-se este tipo de coluna. Ahmida et al. (2006) relataram este mesmo problema na separação entre colesterol e colestanol.

Ahmida et al. (2006) fizeram determinação de fitoesteróis de plasma sanguíneo e inicialmente utilizaram coluna apolar, entretanto, não conseguiram boa separação dos fitoesteróis de interesse e, por isso, utilizaram coluna de polaridade intermediária, Rtx[®] 1701 (14 % cianopropilfenil e 86 % dimetilpolisiloxano), semelhante a utilizada nos testes deste experimento, entretanto, mais longa (60 metros de comprimento) e conseguiram a separação dos fitoesteróis.

Da mesma forma, Dutta e Normém (1998) e Phillips et al. (1999) também utilizaram coluna de polaridade intermediária (14 % cianopropilfenil e 86 % dimetilpolisiloxano) para determinação de esteróis. Os primeiros autores realizaram a determinação de fitoesteróis saturados em aveia, obtendo excelente separação dos picos. Phillips et al. (1999) realizaram a determinação de fitoesteróis, esteróis e metabólitos do colesterol no soro sanguíneo e também obtiveram boa separação destes esteróides. Entretanto, nestes dois trabalhos não foi realizada a determinação de colesterol.

Foram encontrados poucos trabalhos utilizando colunas polares ou de polaridade intermediária para determinação de esteróis, entretanto, nenhum deles utilizou coluna polar com o mesmo tipo de fase móvel (polietilenoglicol) para determinação de colesterol. Alguns autores recomendam coluna polar para separação de alguns picos de esteróis, com pouca resolução quando utilizada coluna apolar.

Testou-se então, a coluna polar VA-WAX[®] (polietilenoglicol) e conseguiu-se a separação

total do colesterol nos cromatogramas de ração obtidos por cromatografia gasosa.

Frega et al. (1992) compararam a separação de fitoesteróis em azeite de oliva utilizando coluna polar e apolar e constataram que a primeira foi mais eficiente porque melhorou a resolução dos picos de esteróis, além de apresentar picos não detectados com a coluna apolar. Rodríguez-Estrada et al. (2002) que compararam a utilização de coluna polar e apolar, verificaram uma melhor separação da matéria insaponificável de extratos lipídicos, utilizando coluna polar.

Lagarda et al. (2006) apresentaram um trabalho de revisão sobre análise de esteróis em alimentos, comparando diversas colunas cromatográficas. Os autores concluíram que para a análise de colesterol é preferível utilizar coluna apolar composta de 5 % difenil e 95 % dimetilpolisiloxano (60m x 0.1m x 0.25mm), enquanto que para outros esteróis, outras fases estacionárias, de polaridade intermediária, também são apropriadas, como, por exemplo, a de 14 % cianopropilfenil e 86 % dimetilpolisiloxano (também utilizada neste trabalho). Entretanto, os autores não informaram qual a melhor coluna para separar, em uma mesma amostra, o colesterol dos outros esteróis.

4.4. Validação do método

A adequação do método proposto neste trabalho foi avaliada pelos resultados de linearidade, seletividade, especificidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

Para todo o procedimento de validação do método foi utilizada a mesma amostra de ração. A análise de amostras de diferentes procedências foram utilizadas apenas para verificação da concentração de colesterol.

4.4.1. Quantificação do teor de colesterol

A quantificação da concentração de colesterol foi feita pela curva de calibração externa (Figura 15). Os testes com padrão interno (19-hidroxicolesterol, colestano e 7-pregnenolona) não apresentaram bons resultados, pois os tempos de retenção de cada um coincidiam com outros picos.

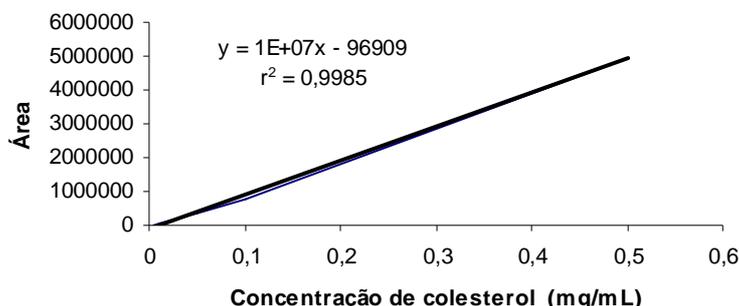


Figura 15 - Representação gráfica da curva de calibração dos padrões de colesterol, com a equação da reta e coeficiente de determinação (r^2).

O valor do coeficiente de determinação (r^2) de 0,9985 apresentou-se de acordo com o preconizado por Sampaio (2002) ($> 0,98$), conferindo linearidade ao teste.

4.4.1.1. Determinação da concentração de colesterol em amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos

Para verificação do teor de colesterol em amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos foram analisadas 10 rações de procedências diferentes e cinco amostras da ração utilizada para a validação.

O coeficiente de variação entre as amostras de ração de diferentes procedências foi alto (24,1 %) (Tabela 24). Este valor deve-se, provavelmente, às variações inerentes das concentrações de colesterol no milho, soja e trigo, que de acordo com Piironen et al. (2000) e Phillips et al. (2002) podem sofrer alterações em função da safra utilizada, ou ainda dos diferentes ingredientes de composição. A amostra 6 da Tabela 24 foi a mesma utilizada para a validação do método.

Entretanto, o coeficiente de variação entre a mesma amostra foi baixo e igual a 4,9 % (Tabela 25).

Phillips et al. (2002) também encontraram diferenças nas concentrações de colesterol, avaliadas em 31 tipos de óleos alimentícios de origem vegetal, de diferentes procedências. O método utilizado foi a extração em fase sólida, saponificação, derivação e cromatografia gasosa.

As concentrações variaram de 0,015 a 0,019 mg/g nos óleos de milho e de 0,006 a 0,012 mg/g nos óleos de soja.

Tabela 24 - Concentrações de colesterol em amostras de ração de diferentes procedências.

Amostra	Colesterol (mg/g)
1	0,0181
2	0,0133
3	0,0110
4	0,0192
5	0,0143
6	0,0222
7	0,0144
8	0,0182
9	0,0239
10	0,0216
Média	0,0176
Desvio padrão	0,0042
CV (%)	24,1

Tabela 25 - Concentrações de colesterol obtidas de amostras de ração utilizadas para a validação.

Amostra	Colesterol (mg/g)
1	0,0203
2	0,0192
3	0,0208
4	0,0216
5	0,0212
6	0,0222
Média	0,0209
Desvio padrão	0,0010
CV (%)	4,9

Observando-se os resultados das concentrações de colesterol em amostras de ração de diferentes procedências verifica-se que, a maior concentração de colesterol, que pode ser encontrada em uma ração destinada à alimentação de ruminantes, é de 0,022 mg/g. Desta forma, foi estabelecido que concentrações superiores a 0,025 mg/g podem ser consideradas resultado de adição de colesterol. Este valor apresenta uma margem de segurança de 13 %.

Neste trabalho sabe-se que foi feita adição de farinha de carne e ossos, entretanto, em uma amostra desconhecida concentrações elevadas de

colesterol (>0,025 mg/g) poderão ser provenientes de qualquer composto, como por exemplo, gordura animal, farinha de peixe ou mesmo um óleo vegetal. Desta forma, para a identificação do composto, a combinação da microscopia com a cromatografia gasosa seria muito importante. Entretanto, a microscopia não detecta gordura animal e óleo vegetal.

A Figura 16 apresenta o cromatograma de uma amostra de ração (amostra 6). Observa-se que a área do pico de colesterol é muito menor que a área dos picos dos outros esteróis.

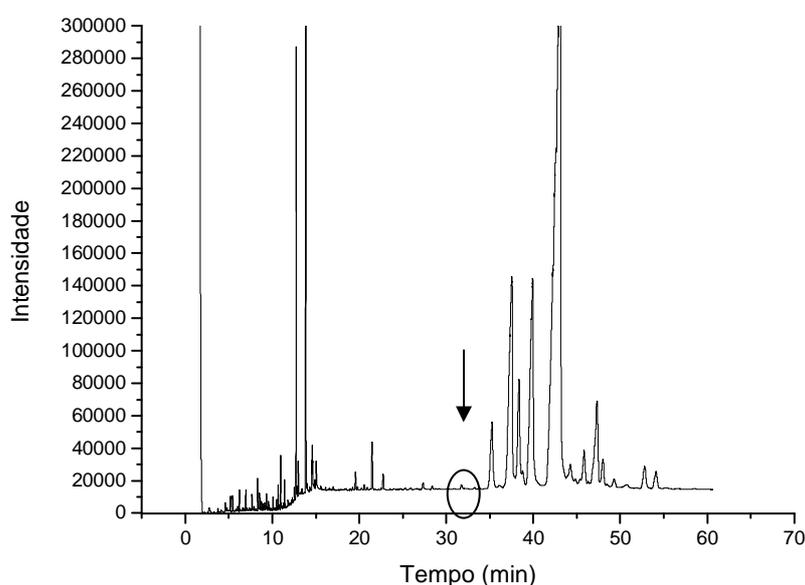


Figura 16 - Cromatograma de amostra de ração (sem adição de farinha de carne e ossos) obtido por CG. Condições cromatográficas: Coluna polar (polietilenoglicol), fase móvel hidrogênio e detector por ionização em chamas. Área circundada: Pico central: colesterol.

4.4.1.2. Determinação da concentração de colesterol em amostras de farinha de carne e ossos (35 %)

A concentração média de colesterol encontrada na farinha de carne e ossos (35 % PB) foi de 0,40 mg/g (Tabela 26). Observa-se que a variação entre as amostras foi menor, apresentando, assim, maior homogeneidade.

Tabela 26 - Concentração de colesterol em amostras de farinha de carne e ossos (35 % PB).

Amostra	Colesterol (mg/g)
1	0,4161
2	0,3838
3	0,3948
4	0,4038
5	0,4074
6	0,3991
Média	0,4008
Desvio padrão	0,0111
CV (%)	2,8

4.4.1.3. Determinação da concentração de colesterol na ração com adição de farinha de carne e ossos

Na Tabela 27 são apresentados os resultados das

concentrações de colesterol nas amostras de ração adicionadas de farinha de carne e ossos nas proporções de 3, 4, 5, 6 e 7 %, estabelecendo-se, assim, o limite de detecção do método.

Tabela 27 - Concentrações de colesterol nas amostras de ração adicionadas de farinha de carne e ossos nas proporções de 3, 4, 5, 6 e 7 %.

Amostra	Colesterol (mg/g)	Média	Desvio padrão	CV %
3 % de FCO na ração				
1	0,0214	0,0214	0,0008	3,5
2	0,0221			
3	0,0206			
4 % de FCO na ração				
1	0,0260	0,0265	0,0010	3,7
2	0,0259			
3	0,0261			
4	0,0252			
5	0,0258			
6	0,0278			
7	0,0275			
8	0,0277			
9	0,0276			
10	0,0258			
5 % de FCO na ração				
1	0,0280	0,0288	0,0010	3,4
2	0,0299			
3	0,0284			
6 % de FCO na ração				
1	0,0316	0,0329	0,0013	3,9
2	0,0330			
3	0,0341			
7 % de FCO na ração				
1	0,0376	0,0371	0,0005	1,3
2	0,0367			
3	0,0370			

Observando-se a Tabela 27, verifica-se que o limite de detecção da presença de farinha de carne e ossos à ração, nas condições experimentadas, é de 4 %, pois neste nível foi encontrada concentração de colesterol igual a 0,0265 mg/g, sendo, portanto, superior ao limite estabelecido (>0,025 mg/g). Nota-se também que o coeficiente de variação observado entre estas amostras foi baixo (3,7 %).

Observa-se também que no nível de 3 %, a concentração obtida (0,0214 mg/g) foi abaixo da

concentração estabelecida, não sendo possível a confirmação da presença de colesterol proveniente de farinha de carne e ossos.

Entretanto, a amostra utilizada para a validação do método e verificação deste limite de detecção foi aquela com concentração média de 0,02 mg/g, que apresentou um coeficiente de variação baixo (4,9 %).

Por outro lado, considerando-se qualquer amostra de ração, inclusive aquela com

concentração mais baixa de colesterol, a detecção de farinha de carne e ossos pode ser feita, apenas, a partir de 6 %, devido ao alto coeficiente de variação (24,1 %) verificado entre amostras de ração de diferentes procedências.

Pois, hipoteticamente, neste caso, para a determinação do limite de detecção foi considerada a concentração de colesterol encontrada na ração somada à concentração encontrada na farinha de carne e ossos, proporcionalmente e, considerou-se também o

valor de recuperação. Logo, a concentração mínima de colesterol obtida de 1 g de ração (sem adição de farinha de carne e ossos) é de 0,01 mg (valor mínimo apresentado na Tabela 24) e a concentração de colesterol obtida de 1 g de farinha de carne e ossos é de 0,4 mg.

Na Tabela 28 é apresentado um exemplo de contaminação de uma ração com baixa concentração de colesterol adicionada de 6 % de farinha de carne e ossos.

Tabela 28 - Exemplo da concentração final de colesterol em uma ração (com baixa concentração de colesterol) adicionada de 6 % farinha de carne e ossos.

Ração		Farinha de carne e ossos	
Quantidade (g)	Colesterol (mg/g)	Quantidade (g)	Colesterol (mg/g)
1	0,011	1	0,40
0,94	0,0094	0,06	0,024
Concentração final: 0,0334 mg/g			
Concentração final após subtração do valor de recuperação: 0,0253 mg/g			

Observando-se a Tabela 28, verifica-se que em 1 g de ração (com baixa concentração de colesterol) adicionada de 6 % de farinha de carne e ossos, são encontrados 0,0334 mg de colesterol (0,0094 mg + 0,024 mg).

Devido a baixa porcentagem de recuperação obtida neste trabalho, apesar da concentração de uma amostra de ração com baixa concentração de colesterol adicionada de 6 % de farinha de carne e ossos apresentar, teoricamente, o valor de 0,0334 mg/g de colesterol, na prática, o valor final obtido é de aproximadamente 0,0253 mg/g.

Com base nos resultados apresentados verifica-se que pode ser realizada a detecção de farinha de carne e ossos à qualquer amostra de ração, entretanto, não é possível realizar a quantificação devido às diferentes concentrações de colesterol encontradas nas diferentes amostras de ração.

No trabalho de Sanches et al. (2006) que validou o método de microscopia, o limite de detecção de farinha de carne e ossos na ração foi de 0,05 %. Além do limite de detecção ser menor, a microscopia é uma técnica mais rápida e de baixo custo quando comparada à cromatografia. Já o limite de detecção descrito por Brodman e Moor (2003) foi de 1 %, utilizando PCR.

Entretanto, esta é uma técnica que promove a desnaturação e a degradação de proteínas, o que pode causar alteração nos resultados finais.

4.4.1.4. Determinação da concentração de colesterol em amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo

As concentrações de colesterol em amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo podem ser observadas na Tabela 29.

Tabela 29 - Concentrações de colesterol em amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo.

Amostra	Colesterol (mg/g)
Milho	0,0101
Farelo de soja	0,0101
Farelo de trigo	0,0111

Na literatura não foi encontrado nenhum trabalho que tenha determinado colesterol em amostra de ração destinada à alimentação de ruminantes, entretanto, foram encontrados resultados em amostras de óleos vegetais.

Nos óleos de soja e de milho, Belitz e Grosch (1997) encontraram concentrações de colesterol

de 0,0005 mg/g, enquanto, Rossell (1991) e Phillips et al. (2002) obtiveram concentrações de, respectivamente, 0,006 a 0,012 mg/g e 0,029 mg/g, no óleo de soja.

Da mesma forma, Piironen et al. (2000) relataram que a concentração de colesterol na maioria das plantas é de 0,001 a 0,005 mg/g, mas no milho, na canola e no grão de arroz as concentrações são maiores, entretanto, não apresentaram os valores. Já Berhman e Gopalan (2005) relataram que o colesterol é encontrado no reino vegetal em quantidades médias de 0,050 mg/g de lipídios totais.

4.4.2. Linearidade

As linearidades do padrão de colesterol e da matriz (ração) foram verificadas pelos coeficientes de determinação (r^2) e pela avaliação

dos gráficos de resíduos de padrão de colesterol e de padrão de colesterol adicionado à matriz, respectivamente.

Os valores de resíduo foram calculados obtendo-se os valores médios das concentrações e calculando-se a diferença entre y observado e y esperado. Observou-se que os pontos de maior dispersão para o padrão de colesterol foram os de concentração 0,05 e 0,5 mg/g, apresentando valores de 0,002798 e menos (-) 0,00002359, respectivamente e os de maior dispersão da matriz foram os de concentração 0,1 e 0,5 mg/g, apresentando valores de 0,004824 e 0,002463, respectivamente.

Os valores de y esperado e observado e valores de resíduo do padrão e da matriz são apresentados nas Tabelas 30 e 31, respectivamente.

Tabela 30 - Valores de y observado, y esperado e de resíduo do padrão de colesterol.

Concentração do padrão (mg/mL)	Valores de y observado	Valores de y esperado	Resíduo
0,01	0,0101	0,0109	-0,0007689
0,02	0,0201	0,0203	-0,0002271
0,03	0,0289	0,0298	-0,0008854
0,05	0,0515	0,0487	0,0027980
0,1	0,0951	0,0960	-0,0008932
0,5	0,4743	0,4740	-2,359x10 ⁻⁵

Tabela 31 - Valores de y observado, y esperado e de resíduo da matriz adicionada de padrão de colesterol.

Concentração do padrão adicionado à matriz (mg/mL)	Valores de y observado	Valores de y esperado	Resíduo
0,01	0,0300	0,0270	-0,0013160
0,025	0,0450	0,0397	-0,0015570
0,05	0,0700	0,0607	-0,0005257
0,1	0,1200	0,1030	0,0010370
0,25	0,2700	0,2290	0,0048240
0,5	0,5200	0,4400	-0,0024630

Nas Figuras 17 e 18 são apresentadas as curvas padrão (A) e gráfico de resíduo (B) do padrão

de colesterol e da matriz adicionada de padrão de colesterol, respectivamente.

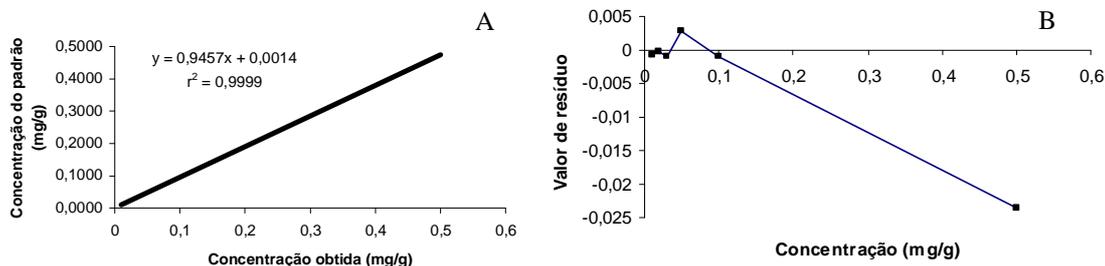


Figura 17 - A) Curva da linearidade do padrão com a equação da reta e coeficiente de determinação (r^2). B) Gráfico de resíduos do padrão de colesterol.

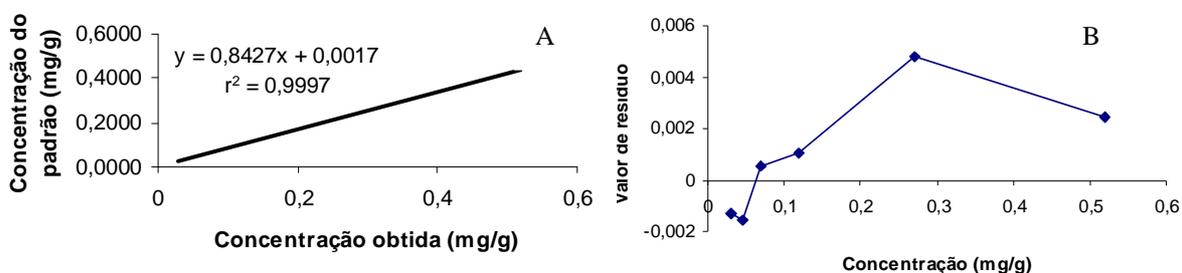


Figura 18 - A) Curva da linearidade com matriz com a equação da reta e coeficiente de determinação (r^2). B) Gráfico de resíduos das amostras de ração adicionadas de padrão de colesterol.

Observou-se que o método possui excelente linearidade, nas concentrações entre 0,01 e 0,5 mg/mL, representada por altos valores de coeficiente de determinação e valores de resíduos próximos a zero. De acordo com Sampaio (2002) os valores de resíduos correspondem à subtração do valor de y observado (concentração observada) por y esperado e devem ser iguais a zero.

Valores semelhantes de coeficientes de determinação (superiores a 0,999) foram obtidos por Meier et al. (2006) utilizando CG-DIC e coluna polar, semelhante a utilizada neste

trabalho. No entanto, estes autores não apresentaram os valores de resíduo.

4.4.3. Seletividade e especificidade

O teste com adição de padrões de outros esteróides à ração confirmou a seletividade do método e demonstrou não haver interferência destes com o pico de colesterol, pois todos apresentaram tempos de retenção diferentes do colesterol e puderam ser identificados (Figura 19). Apenas o ergosterol e a vitamina D não foram detectados nas amostras de ração.

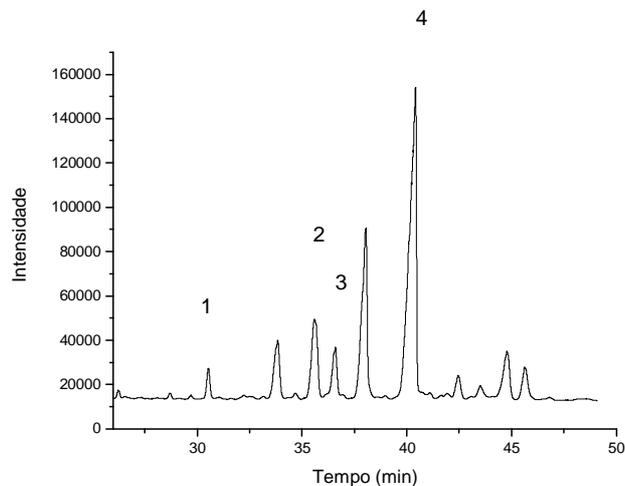


Figura 19 - Cromatograma de amostra de ração, obtido por CG, no tempo de 25 a 50 minutos. Condições cromatográficas: Coluna polar de polietilenoglicol, fase móvel hidrogênio e detector de ionização em chamas. Picos: (1) colesterol; (2) campesterol; (3) estigmasterol; (4) β -sitosterol.

A presença de fitoesteróis na ração era esperada uma vez que a mesma é constituída de milho, soja e trigo, entretanto, apenas o colesterol foi quantificado, enquanto os outros esteróis foram apenas identificados.

Os resultados obtidos estão de acordo com AI (1997), Toivo et al. (1998), Piironen et al. (2000), Toivo et al. (2001), Volin (2001), Piironen et al. (2003), Berhman e Gopalan (2005), Cunha et al. (2006) e Lagarda et al.

(2006) que também encontraram concentrações de β -sitosterol maiores que a de outros esteróis nas diversas amostras de produtos de origem vegetal analisadas.

Os cromatogramas obtidos em cromatógrafo líquido e detector por arranjo de diodos são apresentados nas Figuras 20 e 21. A adição de padrão de colesterol às amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo confirmou a identificação do pico de colesterol.

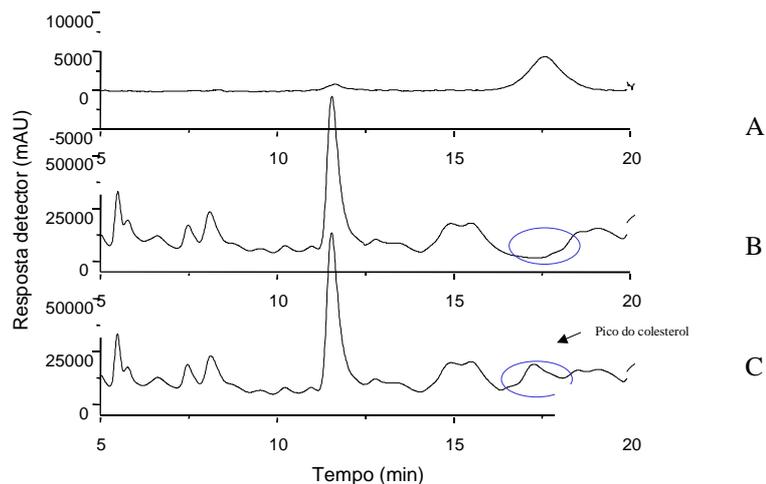


Figura 20 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência e detector por arranjo de diodos. A: padrão de colesterol. B: amostra de milho, farelo de soja e farelo de trigo. C: amostra de milho, farelo de farelo de soja e farelo de trigo fortificadas com padrão de colesterol. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:isopropanol (98:02); coluna C_{18} , 100 x 4,6mm x 4 μ m (Chromolith, Merck), vazão de 1 mL/min.

Os cromatogramas obtidos em cromatógrafo gasoso de amostras de milho, farelo de soja, farelo de trigo e padrão de colesterol são apresentados na Figura 21. A verificação do pico de colesterol nestas amostras e a comparação

com o tempo de retenção do pico de colesterol do padrão confirmaram a especificidade do método, entretanto, estas mesmas amostras foram analisadas também no cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas.

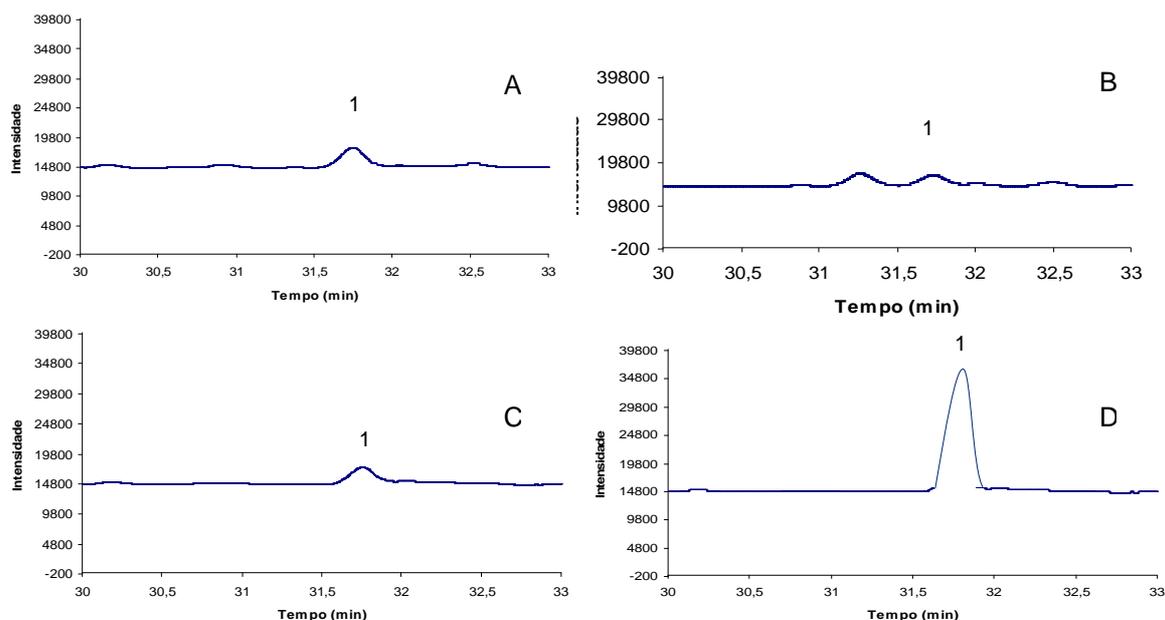


Figura 21 - Cromatograma de amostra de milho (A), farelo de soja (B), farelo de trigo (C) e padrão de colesterol (D), obtidos por CG. Condições cromatográficas: coluna polar (polietilenoglicol), fase móvel hidrogênio e detector de ionização em chamas. Pico (1) Colesterol.

A especificidade do método foi confirmada após a análise em espectrômetro de massas, pois foi possível a identificação do colesterol nas amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo (Figura 22). A presença de colesterol foi

confirmada através do íon de maior intensidade m/z 369 que corresponde a perda de uma hidroxila a partir da massa molecular protonada do colesterol (Saldanha et al., 2006 e Mazalli et al., 2006).

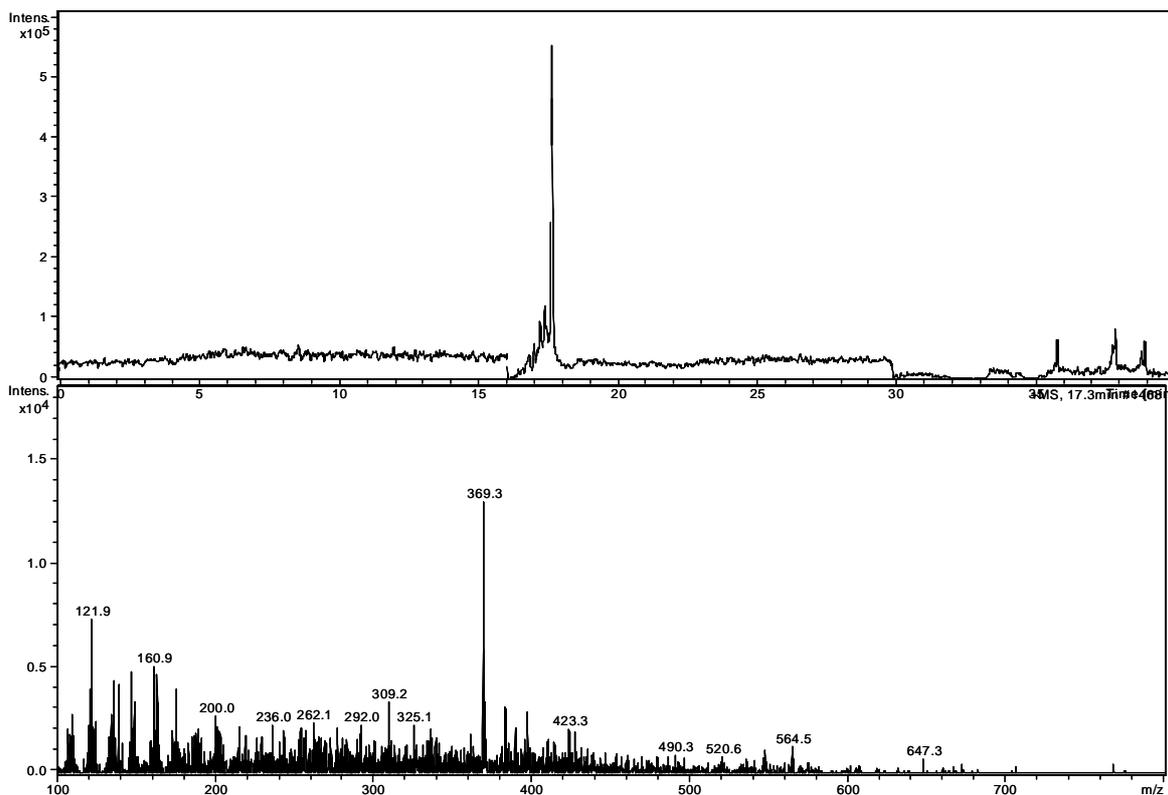


Figura 22 - Espectro de massas do colesterol (369) em amostras de milho, farelo de soja e farelo de trigo, obtido com fonte de ionização APCI em cromatógrafo líquido. Condições cromatográficas: fase móvel acetoneitrila:isopropanol (98:02); coluna C₁₈, 100 x 4,6mm x 4µm (Chromolith, Merck), vazão 1 mL/min. Condições do EM: analisador *ion-trap*, fonte APCI à 450 °C, modo positivo, corona à 4000 nA, *dry gas* N₂ à 350 °C, fluxo 5 L/min, nebulizador à 65 psi, energia de fragmentação do MS/MS 1,4 V, faixa de aquisição 100 a 700 m/z.

Os resultados obtidos em outro laboratório (de duas amostras analisadas) apresentaram as mesmas concentrações de colesterol na ração

sem adição de farinha de carne e ossos, confirmando assim, as concentrações verificadas neste trabalho (Tabela 32).

Tabela 32 - Comparação entre concentrações de colesterol obtidas em amostras de ração sem adição de farinha de carne e ossos, analisadas neste experimento e em outro laboratório.

Amostra	A*	B*
1	0,0181	0,0174
2	0,0222	0,0230

A: Concentração de colesterol (mg/g) obtida neste experimento;

B: Concentração de colesterol (mg/g) obtida em outro laboratório.

O teste de seletividade e especificidade foi importante para avaliar os resultados obtidos, pois além de confirmar a presença de colesterol em amostras de produtos de origem vegetal, também confirmou as concentrações de colesterol obtidas, concluindo que nenhum outro composto coeluiu com o colesterol.

4.4.4. Limite de detecção e quantificação do equipamento

Para a determinação do limite de detecção, a menor concentração injetada, na qual pode ser observado um pico de colesterol, com altura igual a 3 vezes o ruído, no cromatograma, foi a

de 0,001 mg/g. Entretanto, nesta concentração o coeficiente de variação foi 40,8 % (Tabela 33). Este valor apresenta-se acima do permitido por Comissão (2002), que deve ser de até 5,7 % quando se utiliza unidade de mg/g.

Tabela 33 - Concentrações de colesterol obtidas pela injeção de 0,001 mg/mL de padrão.

Amostra	Colesterol(mg/g)
1	0,0079
2	0,0039
3	0,0042
4	0,0065
5	0,0048
6	0,0030
7	0,0025
Média	0,0047
Desvio padrão	0,0019
CV (%)	40,8

Para a determinação do limite de quantificação, foi atribuído um valor igual a três vezes o limite de detecção, sendo, portanto, igual a 0,003 mg/g.

4.4.5. Precisão

Os resultados encontrados de repetitividade das análises, expressos em porcentagem de coeficiente de variação estão demonstrados na Tabela 34 e variaram de 2,9 a 4,0. Os coeficientes de variação entre as seis repetições independentes do mesmo nível de concentração de colesterol ficaram dentro dos padrões estabelecidos por Comissão (2002), no qual, aplicando-se a equação de Horwitz ($CV = 2^{(1-0.5 \log C)}$, onde o $C=10^{-3}$) para verificação do coeficiente de variação nas análises de colesterol, obtém-se um valor igual a 5,7 %. Os resultados obtidos neste experimento demonstram boa precisão uma vez que todos os valores foram menores que 5,7 %.

Tabela 34 - Valores de concentração obtidos na repetitividade em seis repetições das seis concentrações de colesterol analisadas e respectivos valores de coeficiente de variação.

Concentração (mg/mL)	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 4	Matriz 5	Matriz 6	CV (%)
0,01	0,025	0,027	0,027	0,025	0,026	0,026	3,5
0,025	0,040	0,037	0,038	0,039	0,037	0,038	2,9
0,05	0,063	0,059	0,059	0,063	0,059	0,058	3,9
0,1	0,101	0,104	0,106	0,101	0,107	0,104	2,4
0,25	0,229	0,247	0,226	0,228	0,246	0,230	4,0
0,5	0,436	0,454	0,420	0,440	0,452	0,421	3,3

4.4.6. Exatidão

Os valores de recuperação obtidos no presente método estão apresentados na Tabela 35 os quais variaram de 84 a 86,7 % e encontram-se dentro do intervalo de variação aceitável na faixa de concentração recomendada (Comissão, 2002). Os

valores de recuperação preconizados são de 80 a 110 % quando $c \geq 1,0 \times 10^{-8}$, na qual c = fração de massa. Neste experimento, c foi igual a 10^{-3} , pois foi utilizada mg/g como unidade para colesterol.

Tabela 35 - Valores de recuperação obtidos no presente trabalho.

Concentração inicial de colesterol (mg/g)	Quantidade adicionada de padrão colesterol (mg/mL)	Concentração média de colesterol obtida (mg/g)	Recuperação (%)	Média de recuperação (%)
0,02	0,01	0,026	82,14 – 88,63	85,8
0,02	0,025	0,038	82 a 88,22	84,6
0,02	0,05	0,060	83,74 a 90,34	86
0,02	0,1	0,104	84,03 a 89,04	86,6
0,02	0,25	0,234	81,04 a 91,37	86,7
0,02	0,5	0,438	80,86 a 87,40	84

Na Figura 23, são apresentados os valores de dispersão da recuperação.

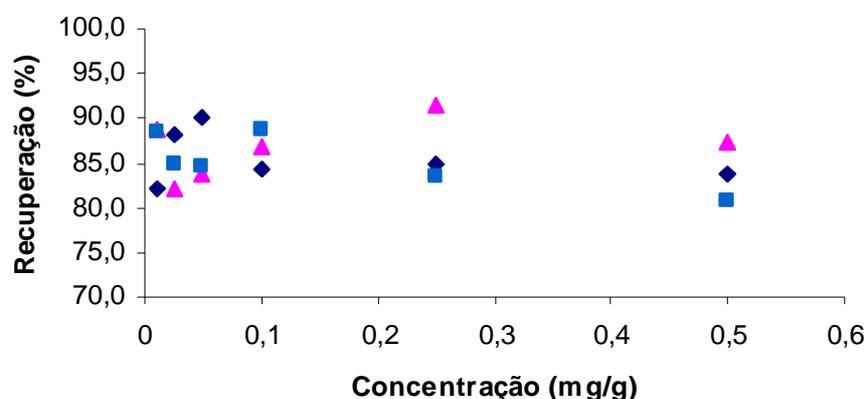


Figura 23 - Valores de dispersão da recuperação nas seis repetições das concentrações de colesterol.

Os valores de recuperação do colesterol, encontrados na maioria dos trabalhos, situaram-se entre 95 e 105 %, como, por exemplo, o de Saldanha et al. (2004) que obtiveram, em amostras de carne, uma recuperação de 95 %, utilizando CLAE e detector UV. Entretanto, Baggio e Bragagnolo (2004), assim como neste trabalho, também encontraram valores mais baixos de recuperação do colesterol (88,8 a 90,23 %) em amostras de produtos cárneos processados, utilizando CLAE e detectores por conjunto de diodos e índice de refração.

Os baixos valores de recuperação obtidos no presente trabalho podem ser atribuídos às baixas

concentrações na amostra, uma vez que esta é constituída de produtos de origem vegetal, ao contrário dos valores de recuperação verificados em outros trabalhos nos quais a recuperação foi determinada em produtos de origem animal e, portanto, com altas concentrações de colesterol. Os trabalhos encontrados na literatura, que determinaram colesterol em produtos de origem vegetal, não apresentaram os valores de recuperação obtidos.

4.4.7. Robustez

Os resultados encontrados na robustez são apresentados na Tabela 36.

Tabela 36 - Valores de concentração obtidas nas análises de robustez, em 3 replicatas, com as respectivas médias, desvio padrão e coeficiente de variação.

Amostra	Conc. colesterol (mg/g)	Média	Desvio padrão	CV %
Hexano de marca diferente				
1	0,02093	0,0206	0,0010	4,9
2	0,02142			
3	0,01948			
Maior tempo de contato da amostra com o solvente para extração				
1	0,02124	0,0207	0,0007	3,4
2	0,02084			
3	0,01987			
Injeção com seringa diferente				
1	0,01764	0,0169	0,0006	3,6
2	0,01659			
3	0,01659			
Injeção imediatamente após a limpeza do <i>insert</i>				
1	0,0197	0,0208	0,0009	4,5
2	0,02169			
3	0,02043			
Injeção imediatamente antes da limpeza do <i>insert</i>				
1	0,02013	0,0206	0,0010	4,9
2	0,02192			
3	0,02049			
Armazenamento das amostras por 10 dias				
1	0,01892	0,0200	0,0010	4,9
2	0,02085			
3	0,02013			

Para o método de comparação de pares assumiram-se como valores padrões aqueles referentes às concentrações das amostras injetadas imediatamente antes da limpeza do *insert*, pois estas representariam a situação das amostras anteriormente injetadas, ou seja, todos os parâmetros avaliados no teste de robustez foram comparados com os valores obtidos das amostras injetadas antes da limpeza do *insert*.

Pela análise estatística descritiva verifica-se que as amostras apresentaram resultados homogêneos, verificados pelos baixos valores de

desvio-padrão e coeficiente de variação, que ficaram entre 3,4 a 4,9 %.

Pelo teste t pareado, com probabilidade de erro bicaudal ou do tipo I, verifica-se que não houve diferença significativa quando foi alterada a marca do hexano utilizado durante os outros procedimentos da validação, pois o valor de t calculado (0,4392) foi menor que o valor de t tabelado (0,7034), sendo o intervalo de confiança da diferença de: -0.002082 a 0.002555. Na Tabela 37 são apresentados os valores encontrados.

Tabela 37 - Comparação dos valores de média, desvio padrão, desvio padrão do erro e intervalos entre amostras padrão e amostras que foram preparadas com hexano de marca diferente.

Parâmetro	Amostra padrão	Hexano de marca diferente	Diferença
Média	0.02085	0.02061	0.0002367
Desvio padrão	0.00095	0.00101	0.0009333
Desvio padrão do erro	0.00055	0.00059	0.0005388
Intervalo (inferior)	0.01849	0.01810	-0.0020820
Intervalo (superior)	0.02320	0.02312	0.0025550

Também não houve diferença significativa quando foi alterado o tempo de agitação e/ou contato das amostras com o hexano para extração da fração insaponificável, no vórtex, de 15 segundos para 1 minuto, pois o valor de t

calculado (0.2950) foi menor que o valor de t tabelado (0.7958), sendo o intervalo de confiança da diferença de: -0.002672 a 0.003065. Na Tabela 38 são apresentados os valores encontrados.

Tabela 38 - Comparação dos valores de média, desvio padrão, desvio padrão do erro e intervalos entre amostras padrão e amostras que foram deixadas maior tempo em contato com solvente.

Parâmetro	Amostra padrão	Maior tempo de contato da amostra com solvente	Diferença
Média	0.02085	0.02065	0.0001967
Desvio padrão	0.00095	0.00071	0.0011550
Desvio padrão do erro	0.00055	0.00041	0.0006667
Intervalo (inferior)	0.01849	0.01890	-0.0026720
Intervalo (superior)	0.02320	0.02240	0.0030650

Quando foi alterada a seringa para injeção das amostras no cromatógrafo foi encontrada diferença significativa, pois o valor de t calculado (4.765) foi maior que o valor de t

tabelado (0.0413), sendo o intervalo de confiança da diferença igual a 0.0003789 a 0.007434 (Tabela 39).

Tabela 39 - Comparação dos valores de média, desvio padrão, desvio padrão do erro e intervalos entre amostras padrão e amostras que foram injetadas com seringa diferente.

Parâmetro	Amostra padrão	Injeção com seringa diferente	Diferença
Média	0.02085	0.01694	0.0039070
Desvio padrão	0.00095	0.00060	0.0014200
Desvio padrão do erro	0.00055	0.00035	0.0008198
Intervalo (inferior)	0.01849	0.01543	0.0003789
Intervalo (superior)	0.02320	0.01845	0.0074340

Quando foi verificado se as condições de limpeza do *insert* (para injeção das amostras) interferiam nos resultados, observou-se que não havia diferença significativa, pois o valor de t calculado (0.1539) foi menor que o valor de t tabelado (2.245), sendo o intervalo de confiança da diferença entre: -0.0002201 e 0.0007001. Este parâmetro foi utilizado para avaliação do

equipamento, pois este possui um dispositivo que avisa quando deve ser realizada a limpeza do *insert* de injeção das amostras e, de acordo com os resultados obtidos, comprovou-se que, nas condições experimentadas, esta limpeza poderia ser realizada após um maior número de injeções (Tabela 40).

Tabela 40 - Comparação dos valores de média, desvio padrão, desvio padrão do erro e intervalos entre amostras injetadas imediatamente antes e depois da limpeza do *insert*.

Parâmetro	<i>Insert</i> limpo	<i>Insert</i> sujo	Diferença
Média	0.02085	0.02061	0.0002400
Desvio padrão	0.00095	0.00100	0.0001852
Desvio padrão do erro	0.00055	0.00058	0.0001069
Intervalo (inferior)	0.01849	0.01811	-0.0002201
Intervalo (superior)	0.02320	0.02311	0.0007001

Para verificar quanto tempo as amostras podem ser armazenadas secas, em tubo de ensaio, no refrigerador, antes de serem injetadas no cromatógrafo, estas foram armazenadas durante 10 dias e avaliadas. Não foi encontrada diferença significativa entre amostras analisadas logo após o preparo e aquelas armazenadas por 10 dias.

Entretanto, a diferença mínima entre os valores de *t* calculado (2,019) e *t* tabelado (2,113) sugere que as amostras podem ser armazenadas por até 10 dias e havendo necessidade de maior tempo de estocagem, outros testes devem ser realizados. O intervalo de confiança da diferença foi de - 0.0002522 a 0.002012 (Tabela 41).

Tabela 41 - Comparação dos valores de média, desvio padrão, desvio padrão do erro e intervalos entre amostras padrão e amostras padrão e amostras armazenadas por 10 dias depois de preparadas.

Parâmetro	Padrão	10 dias de armazenamento da amostra	Diferença
Média	0.02085	0.01997	0.0008800
Desvio padrão	0.00095	0.00098	0.0004557
Desvio padrão do erro	0.00055	0.00056	0.0002631
Intervalo (inferior)	0.01849	0.01754	-0.0002522
Intervalo (superior)	0.02320	0.02239	0.0020120

4.5. Considerações finais

Dos métodos descritos na literatura para detecção de subprodutos de origem animal às rações para ruminantes, aqueles baseados na análise de proteínas e DNA, que necessitam de aquecimento no preparo das amostras, apresentaram o inconveniente de promover a desnaturação e degradação das proteínas, interferindo nos resultados. Além disso, alguns autores relataram a falta de reprodutibilidade do método.

Técnicas de imunoensaio baseadas na análise de proteínas, apesar de detectar pequenas quantidades e serem de fácil aplicação, podem, na maioria das vezes, apresentar reação cruzada com alguns compostos, apresentando resultados

falso-positivos ou superestimando as concentrações no momento da leitura. Técnicas de análise por ELISA não são eficientes quando aplicadas em material não estéril.

Técnicas baseadas na análise de DNA apresentaram um baixo limite de detecção, entretanto, não apresentaram especificidade.

O método de microscopia validado por Sanches et al. (2006) detectou a presença de 0,05 % de farinha de carne e ossos à ração para ruminantes, entretanto, devido ao uso dos solventes utilizados para o preparo das amostras, ocorre a extração de toda a fração lipídica. Desta forma, há a impossibilidade de identificar gordura animal, componente também proibido pela legislação.

5. CONCLUSÕES

O preparo da amostra utilizando o método de saponificação da amostra sem aquecimento foi o que apresentou os melhores resultados e o menor número de etapas em sua execução.

A técnica de cromatografia gasosa deve ser preferida quando comparada à técnica de cromatografia líquida, para a detecção do colesterol da farinha de carne e ossos presente no suplemento (ração) para ruminantes, pois além

de ser mais sensível apresentou picos com melhor resolução.

O método proposto demonstrou precisão e exatidão.

A presença de farinha de carne e ossos na ração para ruminantes pode ser confirmada, de maneira indireta, pela presença de colesterol em concentrações superiores a 0,025 mg/g de amostra.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils: review. *Journal of Chromatography A*, v. 935, p.173-201, 2001.
- AHMIDA, H.S.M.; BERTUCCI, P.; FRANZO, L.; MASSOUD, R.; CORTESE, C.; LALA, A.; FEDERICI, G. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *Journal of Chromatography B*, v. 842, p. 43-47, 2006.
- AI, J. Rapid measurement of free phytosterols in tobacco by short-column GC/MS/MS. *Journal of Food Chemistry*, v. 45, p. 3932-3935, 1997.
- AL-HASANI, S.M.; HLAVAC, J.; CARPENTER, M.W. Rapid determination of cholesterol in single and multicomponent prepared foods. *Journal of AOAC International*, v. 76, n. 4, p. 902-906, 1993.
- ALONSO, L.; LOZADA, L.; FONTECHA, J.; JUÁREZ, M. Determination of cholesterol in milk fat by gas chromatography with direct injection and sample saponification. *Chromatographia*, v. 41, n. 1/2, p. 23-28, 1995.
- ANSFIELD, M. Production of sensitive immunoassay for detection of ruminant proteins in rendered animal material heated to >130°C. *Food and Agricultural Immunology*, v. 6, p. 419-433, 1994.
- ANSFIELD, M.; REANEY, S.D.; JACKMAN, R. Performance assessment and validation of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine heat stable proteins in compound animal feedstuffs. *Food and Agricultural Immunology*, v. 12, n. 4, p. 285-297, 2000a.
- ANSFIELD, M.; REANEY, S.D.; JACKMAN, R. Production of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine proteins, heated to >130°C at 2.7 bar, in compound animal feedstuffs. *Food and Agricultural Immunology*, v. 12, n. 4, p. 273-284, 2000b.
- AZEVEDO, P.R.A.; MORAIS, M.V.T. Uma revisão sobre a encefalopatia espongiforme bovina (EEB). *Revista Nacional da Carne*, v. 324, 2004. Disponível em: <<http://www.grupodipemar.com.br>>. Acesso em 31 de janeiro de 2004.
- BAETEN, V.; VON HOLST, C.; GARRIDO, A.; VANCUTSEM, J.; RENIER, A.M.; DARDENNE, P. Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near-infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 382, n. 1, p. 149-157, 2005.
- BAGGIO, S.R.; BRAGAGNOLO, N. Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 1, p. 64-70, 2004.
- BALLESTEROS, E.; GALLEGRO, M.; VALCARCEL, M. Gas chromatographic determination of cholesterol and tocopherols in edible oils and fats with automatic removal of interfering triglycerides. *Journal of Chromatography A*, v. 719, p. 221-227, 1996.
- BEHRMAN, E.J.; GOPALAN, V. Cholesterol and plants. *Journal of Chemical Education*, v. 82, n. 12, p. 1791-1793, 2005.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. *Química de los alimentos*. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1997. 1087p.
- BELLAGAMBA, F.; COMINCINI, S.; FERRETTI, L.; VALFRE, F.; MORETTI, V.M. Application of quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific DNA sequences in animal meals and feedstuffs. *Journal of Food Protection*, v. 69, n. 4, p. 891-896, 2006.
- BELLAGAMBA, F.; MORETTI, V.M.; COMINCINI, S.; VALFRE, F. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 49, p. 3775-3781, 2001.

BELLAGAMBA, F.; VALFRE, F.; PANSERI, S.; MORETTI, V.M. Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *Journal of Food Protection*, v. 66, n. 4, p. 682-685, 2003.

BELLAVER, C. Limitações e vantagens do uso de farinhas de origem animal na alimentação de suínos e de aves. In...SIMPÓSIO BRASILEIRO ALLTECH DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL, II, 2005, Curitiba. Anais...Curitiba: Alltech, 2005.

BOHAC, C.E.; RHEE, K.S.; CROSS, H.R.; ONO, K. Assessment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. *Journal of Food Science*, v. 53, n. 6, p. 1642-1644, 1988.

BOVINE spongiform encephalopathy - A fact sheet for veterinarians. Auburn: AABP, 1996. 4 p. (News letter supplement).

BRAGAGNOLO, N. Aspectos comparativos entre carnes segundo a composição de ácidos graxos e teor de colesterol. In...CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, II, 2001. (Via internet).

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Teores de colesterol, lipídios e ácidos graxos em carne suína. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 1, p. 98-104, 2002.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Otimização da determinação de colesterol por CLAE e teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.17, n. 3, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial n. 516 de 09 dez. 1997. Declara o Brasil livre da encefalopatia espongiforme bovina. Disponível em: <<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultalei?op=viewTextual&codigo=6476>>. Acesso em 19 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 27 de 13 jan. 1998. Aprova o regulamento técnico referente à informação nutricional complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de

nutrientes). Diário Oficial da União, Brasília, 16 de janeiro de 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899 de 29 mai. 2003. Determina a publicação do guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de jun. 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 46 de 10 jun. 2003. Adota o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre critérios para validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de junho de 2003b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 69 de 23 set. 2003. Que aprova a padronização da metodologia para detecção de subprodutos de origem animal em misturas de ingredientes para alimentação de ruminantes por microscopia. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de setembro de 2003c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 8 de 25 mar. 2004. Que considera a epidemiologia da Encefalopatia Espongiforme Bovina - EEB e a necessidade de manutenção da situação sanitária do Brasil em relação a essa doença, 2004a. Disponível em: <<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultalei?op=viewTextual&codigo=6476>>. Acesso em 22 de junho de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 7 de 17 mar. 2004. Que considera a necessidade de impedir a introdução do agente etiológico da encefalopatia espongiforme bovina - EEB no Território Nacional, 2004b. Disponível em: <<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultalei?op=viewTextual&codigo=6276>>. Acesso em 22 de junho de 2005.

BREINHÖLDER, P.; MOSCA, L.; LINDNER, W. Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices. *Journal of Chromatography B*, v. 777, p. 67-82, 2002.

- BRODMAN, P.D.; MOOR, D. Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Science*, v. 65, n. 1, p. 599-607, 2003.
- BUTOLO, J.E. *Qualidade de ingredientes na alimentação animal*. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. 430p.
- CHEN, F.C.; HSIEH, Y.H.P.; BRIDGMAN, R. C. Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive detection of prohibited ruminant proteins in feedstuffs. *Journal of Food Protection*, v. 67, n. 3, p. 544-549, 2004.
- CHOUDHARI, K.B.; JAYANTHI, S.; MURTY R.B.; MATHARU, R.R. A high-performance liquid chromatographic method for the analysis of lipids from lyophilized formulations. *Journal of Chromatography A*, v. 724, p. 343-347, 1996.
- CIOLA, R. *Introdução à cromatografia em fase gasosa*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1973. 231p.
- COLLINS, C.H. *Princípios básicos de cromatografia*. 3. ed. Campinas: Unicamp, 1988. 236 p.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Unicamp, 2006. 453 p.
- COMISSÃO das Comunidades Europeias. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Directiva 2002/657/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 221, p. 8-36, 2002. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2002/l_221/l_22120020817pt00080036.pdf>. Acesso em 10 de janeiro de 2006.
- COMISSÃO da União Europeia. Decisão da comissão de 23 de dezembro de 2003. Dá execução ao disposto na Directiva 2003/126/CE do Conselho relativamente ao método analítico para determinação de constituintes de origem animal para o controle oficial de forragens. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 339:78-84, 2003.
- COSTA, L.M.C.; BORGES, J.R. J. Encefalopatia espongiforme bovina. *Revista CFMV*, v. 6, n. 21, 2000.
- CUNHA, S.S.; FERNANDES, J.O.M.; OLIVEIRA, B.P.P. Quantification of free and esterified sterols in portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1128, p. 220-227, 2006.
- DIEMAIR, W. *Laboratoriumsbuch für Lebensmittelchemiker*. 8. ed. Dresden: Verlag Von Theodor Steinkopff, 1963.
- DIONISI, F.; GOLAY, P.A.; AESCHLIMANN, J.M.; FAY, L.B. Determination of cholesterol oxidation products in milk powder: methods comparison and validation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, 2227-2233, 1998.
- DUTTA, P.C.; NORMÉN, L. Capillary column gas-liquid chromatographic separation of D5¹ unsaturated and saturated phytosterols. *Journal of Chromatography A*, v. 816, p. 177-184, 1998.
- EBBEHOJ, K.F.; THOMSEN, P.D. Differentiation of closely related species by DNA hybridization. *Meat Science*, v. 30, n. 4, p. 359-366, 1991.
- EDWARDS, D.I. *Chromatography: principles and techniques*. London: Butterworths, 1970. 83p.
- ENCEPHALOPATIES spongiform. Washington: USDA. Disponível em <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/Comments/2006-0011/2006-0011-2.pdf>>. Acesso em 26 de janeiro de 2007.
- FATS (animal) in vegetable fats and oils (determination of cholesterol). In: *Oils and fat*. 16. ed. Virginia: AOAC, 1995. Official Method 970.51. Chapter. 41. p. 31-36.

- FENTON, M.; SIM, J.S. Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 540, n. 1-2, p. 323-329, 1991.
- FENTON, M. Chromatographic separation of cholesterol in foods. *Journal of Chromatography A*, v. 624, n. 1-2, p. 369-388, 1992. (Resumo).
- FERRARI, A.M.; SANTOS, J. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 1, p. 132-138, 2005.
- FERREIRA, J.S. *Avaliação do coeficiente de partição do colesterol entre duas fases: solução saponificada e hidrôcarbonetos*. 2000. 133f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 497-509, 1957.
- FREGA, N.; BOCCI, F.; LERCKER, G. Direct gas chromatographic analysis of the unsaponifiable fraction of different oils with a polar capillary column. *Journal of American Oil Chemistry Society*, v. 69, n. 5, p. 447-450, 1992.
- FUMIERE, O.; DUBOIS, M.; BAETEN, V.; VON HOLST, C.; BERBEN, G. Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 385, n. 6, p. 1045-1054, 2006.
- GIZZI, G.; VONHOLST, C.; BAETEN, V.; BERBEN, G.; VANRAAMSDONK, L. *Intercomparison study for the determination of processed animal proteins including meat and bone meal in animal feed*. [s.l.]: IRMM; CRAG; RIKILT, 2003a. 45p. (Final Report).
- GIZZI, G.; VAN RAAMSDONK, L.W.D.; BAETEN, V.; MURRAY, I.; BERBEN, G.; BRAMBILLA, G.; VON HOLST, C. An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Revue Scientifique et Technique de L Office International des Epizooties*, v. 22, n. 1, p. 311-331, 2003b.
- GOAD, L.J. Aspects of phytosterols biosynthesis. In: PRIDHAM, J. B. *Terpenoids in plants*. New York: Academic Press, 1967. p. 159-190.
- GUIDE to label nutrient claims. Rockville: FDA. Disponível em: <<http://www.fda.gov/fdac/foodlabel/heart.html>>. Acesso em 26 de janeiro de 2007.
- HARPER, H.A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P.A. *Manual de química fisiológica*. 5. ed. São Paulo: Ateneu, 1982, 736p.
- HOFMANN, K. Proof of proper heating at meat-and-bone meal. *Fleischwirtschaft*, v. 76, p. 1037-1039, 1996.
- HOFMANN, K. Safe controls for renewed confidence: the ELISA meat & bone meal test. *Fleischerei*, v. 11, p. III-IV, 1997.
- HORWITZ, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*, v. 54, n. 1, p. 67-76, 1982.
- HOVING, E.B. Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids: review. *Journal of Chromatography B*, v. 671, p. 341-362, 1995.
- HSIEH, Y.H.P.; SHEU, S.C.; BRIDGMAN, R.C. Development of monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats. *Journal of Food Protection*, v. 61, p. 476-481, 1998.
- HUNT, D.J.; PARKES, H.C.; LUMLEY, I.D. Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. *Food Chemistry*, v. 60, n. 3, p. 437-442, 1997.
- HWANG, B.S.; WANG, J.T.; CHOONG, Y.M. A simplified method for the quantification of total cholesterol in lipids using gas chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 16, p. 169-178, 2003.

- INFECTIONS control guidelines for transmissible spongiform encephalopathies. Washington: WHO/CDS/CSR/APH, 1999. Disponível em: <<http://www.who.int/emc>>. Acesso em: 29 de junho de 2005.
- INFORMACIÓN sanitária mundial. Paris: OIE, 2007. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em 29 de janeiro de 2007.
- JAMES, C.S. *Analytical chemistry of foods*. Londres: Blackie Academic & Professional, 1995. 178p.
- JEKEL, A.A.; VAESSEN, H.A.M.G. Capillary gas-chromatography method for determining non-derivatized sterols: some results for duplicate 24h diet samples collected in 1994. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 360, p. 595-600, 1998.
- JEMMI, T.; SCHLOSSER, H. Animal species determinations in heat-treated meat from domestic and wild ruminants using isoelectric-focusing. *Fleischwirtschaft*, v. 71, n. 10, p. 1191-1195, 1991. (Resumo).
- JEMMI, T.; SCHLOSSER, H. Species identifications in marinated and heat-treated meat using isoelectric-focusing. *Fleischwirtschaft*, v. 73, n. 5, p. 600-602, 1993. (Resumo).
- KELLER, S.; JAHREIS, G. Determination of underivatized sterols and bile acid trimethyl silyl ether methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry-single ion monitoring in faeces. *Journal of Chromatography B*, v. 813, p. 199-207, 2004.
- KINGOMBE, C.I.B.; LÜTHI, E.; SCHLOSSER, H.; HOWALD, D. KUHN, M.; JEMMI, T. A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. *Meat Science*, v. 57, p. 35-41, 2001.
- KOOLMAN, J.; RÖHM, K.H. *Bioquímica: texto e atlas*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 478p.
- KOVACS, M.I.P. Determination of cholesterol in pasta products using gas-liquid-chromatography. *Journal of Cereal Science*, v. 11, n. 3, p. 291-297, 1990.
- KRCMAR, P.; RENCOVA, E. Identification of species-specific DNA in feedstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 26, p. 7655-7658, 2003.
- KRCMAR, P.; RENCOVA, E. Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. *Journal of Food Protection*, v. 68, n. 6, p. 1217-1221, 2005.
- LAGARDA, M.J.; GARCÍA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods: review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 1486-1496, 2006.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.
- LEITE, F. *Validação em análise química*. Campinas: Átomo, 1996. 124p.
- MARASCHIELLO, C.; DIAZ, I.; REGUEIRO, J.A.G. Determination of cholesterol in fat and muscle of pig by HPLC and capillary gas chromatography with solvent venting injection. *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 19, n. 3, p. 165-168, 1996.
- MARINETTI, G.V. *Disorders of lipid metabolism*. New York: Plenum, 1990. 226p.
- MATSUNAGA, T.; CHIKUNI, K.; TANABE, R.; MUROYA, S.; SHIBATA, K.; YAMADA, J. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, v. 51, n. 2, p. 143-148, 1999.
- MAZALLI, M.R.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC method for quantification and characterization of cholesterol and its oxidation products in eggs. *Lipids*, v. 41, p. 615-622, 2006.
- MEIER, S.; MJOS, S.A.; JOENSEN, H.; GRAHL-NIELSEN, O. Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *Journal of Chromatography A*, v. 1104, p. 291-298, 2006.

- MEYER, R.; HÖFFELEIN, C.; LÜTHY, J.; CANDRIAN, U. Detection of pork in heated meat products by polymerase chain reaction (PCR). *Journal of AOAC International*, v. 77, n. 3, p. 617-622, 1994.
- MEYER, R.; CANDRIAN, U.; LÜTHY, J. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International*, v. 78, n. 6, p. 1542-1551, 1995.
- MORALES, P.; GARCIA, T.; GONZALES, I.; MARTIN, R.; SANZ, B.; HERNANDEZ, P.E. Monoclonal antibody detection of porcine meat. *Journal of Food Protection*, v. 57, n. 2, p. 146-149, 1994.
- MOURA, A.F.P.; TENUTA-FILHO, A. Colesterol em camarão processado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 2, p. 117-121, 2002.
- MURRAY, I.; AUCOTT, L.S.; PIKE, I.H. Use of discriminant analysis on visible and near infrared reflectance spectra to detect adulteration of fishmeal with meat and bone meal. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 9, n. 4, p. 297-311, 2001.
- NIEDERER, M.; BOLLHALDER, R. Identification of species specific central nervous tissue by chromatography-mass spectrometry (GC-MS) a possible method for supervision of meat products and cosmetics. *Mitteilungen aus dem gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, v. 92, p. 133-144, 2001.
- NJINKOUÉ, J.M.; BARNATHAN, G.; MIRALLES, J.; GAYDOU, E.M.; SAMBE, A. Lipids and fatty acids in muscle, liver and skin of three edible fish from the Senegalese coast: *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* and *Cephalopholis taeniops*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 131, p. 395-402, 2002.
- ORIENTAÇÕES sobre validação de métodos de ensaios químicos: revisão 01. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 36p. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em 25 de novembro de 2005.
- PECSOK, R.L.; SHIELDS, L.D. *Modern methods of chemical analysis*. Nova York: John Wiley & Sons, 1968, 480p.
- PERKINS, E.G. *Analysis of fats, oils and derivatives*. American Oil Chemists Illinois: Society Champaign, 1993. 664p.
- PHILLIPS, K.M.; RUGGIO, D.M.; BAILEY, J. A. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 732, p. 17-29, 1999.
- PHILLIPS, K.M.; RUGGIO, D.M.; TOIVO, J.I.; SWANK, M.A.; SIMPKINS, A. H. Free and sterified sterols composition of edible oils and fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 15, p. 123-142, 2002.
- PIIRONEN, V.; LINDSAY, D.G.; MIETTINEN, T.A.; TOIVO, J.; LAMPI, A.M. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition: review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 939-966, 2000.
- PIIRONEN, V.; TOIVO, J.; PUUPPONEN-PIMIA, R.; LAMPI, A.M. Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 83, p. 330-337, 2003.
- PITUCO, E.M.; STEFANO, E. Encefalopatia espongiiforme bovina – EEB. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/encefalopatia.htm>>. Acesso em 22 de junho de 2005.
- PRUSINER, S.B. The prion diseases. *Science*, v. 278, p. 2458-2461, 1997.
- REBANHO bovino brasileiro. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 17 de janeiro de 2007.
- RIOS, A.O.; MERCADANTE, A.Z. Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. *Food Additives and Contaminants*, v.21, n.2, p. 125-133, 2004.

- RODRIGUES, M.M. As doenças do gado. *Revista Eletrônica de Ciências*. Disponível em: <http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_03/vacalouca.html>. Acesso em 22 de junho de 2005.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. Análise de colesterol em alimentos: perspectiva histórica e tendências atuais. In: SEMINÁRIO “COLESTEROL: ANÁLISE, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE”, 1996, Campinas. Anais...Campinas: Centro de química de alimentos e nutrição aplicada, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996. p. 59-64.
- RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; FREGA, N.; LERCKER, G. Applications on thermostable polar capillary columns. *Grasas e Aceites*, v. 53, n. 1, p. 76-83, 2002. (Resumo).
- ROSSELL, J.B. *Analysis of oilseeds, fats and fatty foods*. London: Elsevier, 1991. 564p.
- SALDANHA, T.; MAZALLI, M.R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 1, p.109-113, 2004.
- SALDANHA, T.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: Comparative Study of RI, UV and APCI-MS detectors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 4107-4113, 2006.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- SANCHES, R.L.; ALKMIN-FILHO, J.; SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. In-house validation of a method for detection of animal meals in ruminant feeds by microscopy. *Food Control*, v. 17, p. 85-92, 2006.
- SILVA, D.J. *Análise de alimentos – métodos químicos e biológicos*. 2. ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 1990. 165p.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NUMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.
- SOARES, L.V. *Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos*. Barueri: Manole, 2006. 337p.
- STEDMAN, R.L. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke: review. *Chemical Reviews*, v. 68, n. 2, p. 153-207, 1968.
- THE FITNESS for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. Lisboa: EURACHEM, 1998. 61p.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Journal of Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- TOIVO, J.; PIIRONEN, V.; KALO, P.; VARO, P. Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid-phase extraction in sample preparation. *Chromatographia*, v. 48, n. 11/12, p. 745-750, 1998.
- TOIVO, J.; PHILLIPS, K.; LAMPI, A.M.; PIIRONEN, V. Determination of sterols in foods: recovery of free, esterified and glycosidic sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.14, p. 631- 43, 2001.
- ULBERTH, F.; REICH, H. Gas chromatography determination of cholesterol in processed foods. *Food Chemistry*, v. 43, n. 5, p. 387-391, 1992.
- VOLIN, P. Analysis of steroidal lipids by gas and liquid chromatography: review. *Journal of Chromatography A*, v. 935, p. 125-140, 2001.
- WAIBLINGER, H.U.; WEBER, W.; KLEINERT, T. Differenzierung von Wildfleischproben mittels DNA – und Protein-Analytic. *Lebensmittelchemie*, v. 52, p. 97-99, 1998.

WEAST, R.C.; SELBY, S.M.; HODGMAN, C.D. *Handbook of chemistry and physics: a ready reference book of chemical and physical data*. 46. ed. Ohio: Chemical Rubber Publishing Company, 1965. 449p.

WINTERO, A.K. THOMSEN, P.D.; DAVIES, W. A comparison of DNA-hybridization, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork and beef. *Meat Science*, v. 57, n. 1, p. 75-85, 1990.