



## Determinación de la formación de óxidos de colesterol en el proceso de preparación de frito pastuso usando como técnica de análisis HPLC

Determination of the formation of cholesterol oxides in the process of preparation of frito pastuso using HPLC as the analysis technique

Juan José Lozada-Castro<sup>1</sup>, David Arturo-Perdomo<sup>2</sup>, Wilson Alexander Álvarez-Castillo<sup>3</sup>, Lady Vanessa Montezuma-Riascos<sup>4</sup>

- 1 PhD. en Ciencias Químicas. Docente Departamento de Química, Grupo de Investigación Estudio de Sistemas Contaminantes Universidad de Nariño. Pasto, Colombia. e-mail: jjlc@udenar.edu.co
- 2 Químico. Laboratorio de Cromatografía- Universidad de Nariño. Pasto, Colombia. e-mail: davechem06@gmail.com
- 3 Químico. Departamento de Química Universidad de Nariño. Pasto, Colombia. e-mail: walvarez@quimica.udenar.edu.co
- 4 Química. Departamento de Química Universidad de Nariño. Pasto, Colombia. e-mail: lvanesam@misena.edu.co

Fecha de recepción: Noviembre 24 - 2014

Fecha de aceptación: Septiembre 18 - 2015

Lozada-Castro JJ, Arturo-Perdomo D, Álvarez-Castillo WA, Montezuma-Riascos LV. Determinación de la formación de óxidos de colesterol en el proceso de preparación de frito pastuso usando como técnica de análisis HPLC. Rev Univ. salud. 2015;17(2): 177 - 191.

### Resumen

**Introducción:** Los procesos de preparación de los alimentos inducen a la formación de compuestos nocivos para la salud, entre estos se encuentran los óxidos de colesterol (COPs). **Objetivo:** Determinar la formación de 25-hidroxicolesterol (5-colesten-3 $\beta$ ,25-diol), 6-cetocolesterol (3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -coleston-6-ona) y 7-cetocolesterol (3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -coleston-7-ona), en el proceso de preparación de frito pastuso (alimento típico de Nariño, Colombia). **Materiales y métodos:** La determinación de los COPs se realizó mediante extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-UV) en fase reversa. Los factores evaluados fueron: receta de preparación, tipo de grasa o aceite utilizado y tipo de carne de cerdo, aplicando un diseño experimental DCA con tres factores y tres niveles en cada caso, se realizaron 10 ensayos totalmente aleatorizados por duplicado, para verificar la reproducibilidad de los resultados. El análisis de óxidos de colesterol (COPs) se aplicó a los diferentes insumos para la preparación y en el alimento listo para el consumo. **Resultados:** El 7-cetocolesterol se determinó en la mayoría de las muestras; los niveles más altos se encontraron en las muestras de los experimentos donde se utilizó: carne de costilla, grasa de cerdo y la receta de fritura directa de la carne. Los niveles más bajos se encontraron para los experimentos donde se utilizó lomo y pierna, aceite reutilizado y preparaciones de la carne a cocción en agua y posterior fritura. **Conclusiones:** Las desviaciones estándar relativas fueron inferiores al 4,76% obteniendo resultados reproducibles. La identificación de óxidos de colesterol en la presente investigación permitió establecer la influencia que tienen las formas de preparación de los alimentos de consumo frecuente, en la formación de compuestos que presentan reconocidos efectos adversos para la salud humana.

**Palabras clave:** Colesterol, análisis de alimentos, HPLC, extracción en fase sólida. (Fuente: DeCS, Bireme).

### Abstract

**Introduction:** Food preparation processes lead to the formation of harmful compounds to health, some of these include oxides of cholesterol (COPs). **Objective:** To determine the formation of 25-hydroxycholesterol (5-cholesten-3 $\beta$ , 25-diol), 6-cetocolesterol (3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -coleston-6-ona) and 7-cetocolesterol (3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -coleston-7-ona) in the process of preparation of "frito pastuso" (a typical dish in Nariño, Colombia). **Materials and methods:** The COPs were determined by extraction in solid phase (SPE) and liquid chromatography of high efficiency (HPLC-UV) in reversed phase. The evaluated factors were: recipe, type of grease or oil used and type of pork by using a DCA experimental design with three factors and three levels in each case. 10 totally randomized tests were performed in duplicate to check the reproducibility of the results. The analysis of cholesterol oxides (COPs) was applied to different inputs for the preparation and the food ready for consumption. **Results:** The 7-cetocolesterol was determined in the majority of samples. The highest levels were found in the samples of the

experiments which used rib meat, pork fat and direct meat fried recipe. The lowest levels were found for experiments which used loin and leg, reused oil and the recipe where the meat is first cooked in water before frying. **Conclusions:** The relative standard deviations were lower to 4,76% where reproducible results were obtained. The identification of cholesterol oxides in this research helped to establish the influence that the different ways to prepare food of frequent consumption have on the formation of compounds that have recognized adverse effects on human health.

**Keywords:** Cholesterol, analysis of food, HPLC, solid phase extraction. (Source: DeCS, Bireme).

## Introducción

El colesterol (5-colestan-3,β-ol) es el principal esterol presente en el tejido animal, cumpliendo numerosas funciones en el organismo humano: participa en la formación de hormonas sexuales y ácidos biliares; los cuales juegan un rol importante en la digestión y absorción de las grasas, así como en la producción de hormonas que regulan el balance de sodio y potasio en el cuerpo humano, también participa en la síntesis de la vitamina D.<sub>1</sub>

Frecuentemente los alimentos de origen animal son sometidos a procesos de conservación y manipulación incluyendo procedimientos de tratamiento térmico, exposición al ambiente, luz, radiación, iones metálicos o combinación de estos factores, los cuales pueden conducir a reacciones y cambios no deseados, como la oxidación de lípidos incluyendo al colesterol, dando origen a más de 70 compuestos de oxidación denominados genéricamente COPs; estos compuestos poseen estructuras semejantes al colesterol pero con algunos grupos funcionales como hidroxilos, cetona o epóxido en diferentes posiciones de la estructura original del colesterol.<sub>2-6</sub>

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los COPs poseen una serie de efectos potencialmente aterogénicos, citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, por ejemplo el α -epoxicolesterol causa lesiones ateroscleróticas y tiene actividad carcinógena, el 25-hidroxicolesterol y el colestanoetriol presentan actividad citotóxica y angiotóxica, además estos compuestos pueden alterar las funciones de las membranas e inhibir la síntesis de colesterol.<sub>6-10</sub>

Los alimentos de origen animal como la carne de cerdo por contener cantidades significativas de colesterol son potenciales fuentes de COPs. La población de la ciudad de Pasto, se caracteriza por consumir grandes cantidades de carne de cerdo, razón por la cual los

COPs formados en el proceso de preparación del frito pastuso pueden estar relacionados con la morbilidad por enfermedades cardiovasculares. Según estudios realizados por la Secretaría Municipal de Salud en Pasto (SMS) la hipertensión está dentro de las diez primeras causas de morbilidad por consulta y las diez primeras causas de mortalidad, están determinadas por infarto agudo de miocardio, con una tasa de 31% en el 2009.<sub>11</sub>

De acuerdo al estudio adelantado por la SMS de Pasto, uno de los tres principales factores de riesgo que influyen en las enfermedades crónicas son los inadecuados hábitos alimentarios y nutricionales, asociados a la preparación inadecuada de los alimentos, puesto que cambios en la temperatura de cocción y uso de grasas animales con alto contenido de colesterol son factores relevantes que influyen en la formación de los COPs.<sub>12</sub>

Estudios reportados por Pino A et al., afirman que el consumo de carne se relacionó positivamente con el riesgo de desarrollar hipertensión arterial alta. El consumo de carnes rojas procesadas se asoció con un mayor riesgo (20-40%) de desarrollar hipertensión arterial, en comparación con el consumo de carnes rojas sin procesar.<sub>13</sub>

Para implementar programas de prevención de enfermedades crónicas como es la hipertensión arterial es necesario evaluar los procesos de preparación de alimentos tradicionales (frito pastuso) para encontrar las relaciones existentes entre los factores asociados al tipo de alimentación, preparación de alimentos, formación de COPs e hipertensión arterial, esto en dirección a las políticas de salud pública impulsadas en el municipio, teniendo en cuenta que actualmente el Decreto 0772 de 2014 de la Alcaldía de Pasto, tiene como propósito impulsar los hábitos y estilos de vida saludables.

En este trabajo se determinó la formación de algunos COPs en el proceso de preparación de un alimento tradicional de Pasto - Colombia (frito pastuso), el cual se somete a diferentes procesos de cocción, lo que permitirá establecer si se forman COPs en estos procesos.

Este trabajo servirá para en un futuro relacionar la presencia de estos compuestos en alimentos de consumo tradicional con enfermedades cardiovasculares.

## Materiales y métodos

### Materiales y reactivos

Se usó un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC Waters Breeze, equipado con bomba binaria Waters 1525 (USA), inyector Rheodyne 75251, con loop de 20 $\mu$ L y detector de arreglo de diodos (PDA) Waters 2998. La adquisición de los datos se realizó con el programa Empower II de Waters corporation. La separación de los COPs se realizó en una columna C8 (Hypersil Gold, Thermo Scientific 150mm x4,6 mm) termostatzada a 30°C.

Cartuchos de sílica gel de 500 mg y volumen de 3 mL para extracción en fase sólida (DiscoverySupelco, USA). Filtros de nylon de 4 mm y 0,4 $\mu$ m (National Scientific, USA), Viales ambar de 12 y 4 mL (National Scientific, USA), se usaron para las muestras.

Colesterol al 98% (Merck, Alemania), 7-cetocolesterol, 6-cetocolesterol y 25-hidroxicolesterol (Sigma- USA).

Acetonitrilo ACS/HPLC, cloroformo AR-ACS, 2-propanol, n-hexano AR-ACS (Burdick Jackson). Sulfato de sodio anhidro, pancreac, PA-ACS-ISO (España).

### Población y muestra

Las muestras de los insumos para preparar el frito pastuso se obtuvieron en un punto de compra reconocido por los habitantes en donde comúnmente se adquiere la carne de cerdo en la ciudad de Pasto, el análisis de fritura, se llevó a cabo con dos tipos de grasa: vegetal (aceite de palma) y animal (manteca de cerdo), los cuales se obtuvieron en un almacén de cadena de Pasto, esto con el fin de eliminar el sesgo causado por el origen de las muestras de los insumos,

estas muestras se consiguieron por compra directa de tal manera que simularan el proceso real realizado por un habitante y se hicieron de acuerdo al diseño en dos tomas para cada bloque.

Las muestras de carne se empacaron al vacío en bolsas de poliestireno; donde cada bolsa contenía aproximadamente 20g, se refrigeraron a -22°C, esto con el propósito de retardar la proliferación de microorganismos, así como para disminuir la velocidad con la que transcurren reacciones químicas y enzimáticas deteriorativas de la carne.

Para garantizar el desarrollo del diseño experimental, los análisis se realizaron en el laboratorio incluyendo en los que se reutiliza el aceite.

### Tipo de estudio

El diseño experimental aplicado para este trabajo fue completamente aleatorizado, estudiando el efecto de tres factores con tres niveles cada uno, sobre una variable de medida, que en este caso fue la concentración de COPs en el proceso de preparación de frito pastuso (Tabla 1). Actualmente, se conoce que en la formación de estos compuestos intervienen algunos factores tales como: temperatura de preparación, humedad, composición de los ingredientes y tiempo de cocción. Por tal razón en este trabajo se consideraron tres de ellos teniendo en cuenta las reacciones químicas:

- Tipo o forma de preparación del frito pastuso: Cocción en agua, fritura y tiempo de condimentación. Se evaluaron también alternativas que conducen a obtener el mismo plato pero de forma diferente, como es la fritura directa de la carne. Debido a que la cantidad de grasa en la carne de cerdo es variable en cada parte de animal, se tuvo en cuenta para el estudio tres tipos de carne como son, costilla, lomo y pierna, los cuales varían en contenidos químicos como colesterol, lípidos y metales.
- Tipo de aceite utilizado: En el estudio de este factor en la formación de COPs se tuvieron en cuenta tres niveles correspondientes al tipo de aceite empleado en la preparación del frito pastuso. Estos niveles corresponden a: aceite de palma (aceite vegetal nuevo, con bajo contenido de colesterol), aceite vegetal reutilizado cinco

veces (se conoce que en la preparación del frito pastuso es común reutilizar el aceite varias veces). Este factor es de importancia, debido a que los procesos de reutilización de estos aceites conllevan a la formación de sustancias indeseadas como óxidos, nitritos, radicales libres (lipoperóxidos), los cuales desencadenan la formación de COPS. El tercer nivel es el uso de grasa de cerdo, considerando el contenido de colesterol de este insumo usado en la preparación de frito pastuso y su influencia en la formación de COPS.

- **Humedad:** La cantidad de agua es de gran importancia porque los COPS de interés se forman por interacción con el agua como por ejemplo el colestanoltriol. Considerando lo anterior, se tuvieron en cuenta tres tipos de carne (costilla, lomo y pierna) de acuerdo a su contenido de humedad (alta Ha, media Hm y baja Hb) como se describe en la tabla 1.

**Tabla 1. Factores y niveles del diseño experimental**

Factor	Nivel	Características
Tipo de preparación	P <sub>1</sub>	Carne adobada un día antes, cocción por 20 min, después se fríe por 10min.
	P <sub>2</sub>	Carne adobada posterior a la preparación, cocción por 20 min, después se fríe por 10 min.
	P <sub>3</sub>	Carne adobada posterior a la preparación y se fríe directamente por 30 min.
Tipo de aceite	Vn	Aceite de palma
	Vr	5 veces reutilizado
	Gs	Grasa de cerdo sin utilizar
Humedad	Ha	Lomo
	Hm	Pierna
	Hb	Costilla

P<sub>1</sub>: preparación 1, P<sub>2</sub>: preparación 2, P<sub>3</sub>: preparación 3  
Ha: humedad alta, Hm: humedad media, Hb: humedad baja

Vn: vegetal nuevo, Vr: vegetal reutilizado, Gs: manteca de cerdo

**Condimentos utilizados.** Se utilizó la forma de condimentación tradicional para carnes en los puntos de muestreo, entre los ingredientes se encuentran la cebolla larga, ajo, sal, comino.

**Procedimientos.** Parámetros característicos de la muestra e insumos relacionados con los COPS. Se analizaron los COPS en insumos: carne cruda, carne frita, muestras de grasa, aceite nuevo y aceite utilizado, según el diseño experimental. Los parámetros estudiados fueron humedad, lípidos totales y colesterol. Los análisis se realizaron en los laboratorios de la Universidad de Nariño, Pasto Colombia, así: humedad y lípidos totales en el de Bromatología y la determinación del contenido de colesterol, en el de Cromatografía, mediante HPLC siguiendo la metodología reportada por Daneshfar et al.<sup>14</sup>

Para analizar la humedad se utilizó el método oficial No. 930.15 de 1998 de la AOAC<sub>15</sub> que se detalla a continuación: se pesan 3 g de muestra, se calienta en una estufa a 135 °C durante 3 h, se deja enfriar durante 8 h en un desecador y se pesa la muestra seca. El contenido de agua se determina por diferencia de peso, hasta peso constante.

En la tabla 2 se presenta el diseño experimental con dos experimentos centrales el cual incluye los factores: tipo de preparación, tipo de aceite usado, humedad de la carne y el número de muestras realizándose en dos bloques para evaluar la reproducibilidad experimental.

Tabla 2. Diseño experimental

Bloque	Experimento	Preparación	Aceite	Humedad	Bloque	Preparación	Aceite	Humedad
I	A	-1	1	1	II	-1	1	1
	B	-1	-1	-1		-1	-1	-1
	C	-1	1	-1		-1	1	-1
	D	0	0	0		0	0	0
	E	1	-1	-1		1	-1	-1
	F	-1	-1	1		-1	-1	1
	G	1	1	1		1	1	1
	H	1	-1	1		1	-1	1
	I	0	0	0		0	0	0
	J	1	1	-1		1	1	-1

**COPs extracción y limpieza.** La extracción de la fase lipídica se realizó por medio de lixiviación y la limpieza de las muestras por SPE, según la metodología descrita por Lozada et al.<sup>16,17</sup>

Se tomaron 5.0g de muestra macerada y homogeneizada previamente, se realizó la extracción por lixiviación con  $\text{CHCl}_3$  agitando con el agitador mecánico durante 18 h; se eliminó el disolvente con rotavapor a 60°C y se pesó el extracto lipídico hasta peso constante.

**Determinación de colesterol por HPLC.** Al residuo obtenido del extracto lipídico aproximadamente de 1-2 mL que contenía el colesterol se diluyó con isopropanol para garantizar la disolución del colesterol en la fase móvil del sistema cromatográfico siendo este menos polar que los COPs. Los extractos se filtraron e inyectaron a dicho sistema y a las condiciones antes expuestas. La longitud de onda de trabajo fue de 205 nm.

**Determinación de COPs por HPLC.** Los análisis cromatográficos de los COPs se realizaron mediante el siguiente procedimiento: el residuo lipídico obtenido en el proceso de lixiviación se pasó a través de un cartucho de silica de 500 mg, los COPs se eluyeron con 10 mL de acetona, posteriormente el residuo se

llevó a sequedad mediante presión reducida a 35°C. El residuo obtenido se disolvió con 250µL de ACN y se inyectó 20µL en el sistema cromatográfico a una longitud de onda de 205 y 238 nm.

Los analitos fueron separados usando modo isocrático, empleando como fase móvil acetonitrilo: agua, 90:10 y un flujo 1,5 mL/min. Los tiempos de retención y las áreas de los picos fueron usados para la identificación y cuantificación usando el método de calibración con estándar externo.

### Análisis estadístico

Los análisis de COPs en las muestras fueron evaluados mediante test ANOVA, análisis de varianza y gráficos de correlación, usando el programa Statgraphics Centurión XVI.

## Resultados y discusión

**Parámetros característicos de la carne de cerdo: colesterol, humedad y lípidos.** La determinación de los parámetros relacionados con la formación de COPs (colesterol, lípidos y humedad) en los insumos y en el frito pastuso se realizó por duplicado. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 3 y 4.

**Tabla 3. Contenido de humedad, lípidos y colesterol en insumos**

Muestra	Agua(%)		Lípidos (%)		Colesterol (mg/g)	
	Media <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Media	RSD	Media	RSD
Lomo	66,4	4,9	12,3	4,02	0,0847	1,74
Pierna	74,2	4	3,16	4,92	0,2194	2,96
Costilla	71,8	2,56	6,88	2,47	0,3542	2,53
Manteca de cerdo	-	-	-	-	0,2730	2,97
Vegetal nuevo	-	-	-	-	-	-
Vegetal reutilizado	-	-	-	-	0,1165	4,61

<sup>a</sup> Valores medios <sup>b</sup> Desviación estándar relativa, %, n=2

**Tabla 4. Contenido de humedad, lípidos y colesterol en frito pastuso**

Bloque	Ensayo <sup>a</sup>	Agua <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>c</sup>	Lípidos(%)	RSD	Colesterol( mg/g)	RSD
I	A	48,7	4,36	9,38	0,75	0,96	2,76
	B	50,5	3,36	11,2	4,42	0,06	4,44
	C	50,4	3,65	14,2	4,48	0,83	4,33
	D	59,7	3,32	6,21	4,62	0,26	4,44
	E	52,8	2,41	15,7	4,32	0,67	4,76
	F	43,3	4,57	11,5	3,79	0,35	4,68
	G	52,9	3,21	11,5	3,69	1,02	1,50
	H	54,5	3,37	10,8	4,03	0,58	2,10
	I	59,9	3,31	14,8	3,48	0,37	2,23
	J	48,9	2,60	18,5	3,44	0,71	3,82
II	A	43,2	4,58	10,5	2,73	1,01	2,94
	B	36,6	4,64	27,4	2,48	0,83	3,20
	C	33,2	4,70	16,2	1,20	0,86	3,83
	D	41,5	4,77	20,5	2,07	1,21	3,74
	E	42,6	2,99	26,4	1,65	0,64	1,99
	F	47,8	4,14	6,0	4,78	0,59	4,79
	G	53,2	3,19	8,78	4,82	0,71	4,76
	H	52	4,35	8,79	4,84	0,14	3,48
	I	47,7	4,45	11,9	3,66	0,32	4,82
	J	47,8	2,07	20,7	2,10	0,88	2,17

<sup>a</sup> Ensayos etiquetados según diseño experimental para bloque I y II <sup>b</sup> Valores medios <sup>c</sup> Desviación estándar relativa; %

**Validación del método.** El método utilizado fue validado calculando la linealidad, precisión, porcentajes de recuperación, límites de detección y cuantificación. Respecto a la linealidad se determinó usando 7 puntos de calibrado en un rango de concentración de 0,1 – 100 ppm para COPs con coeficientes de correlación entre 0,9997 – 0,9995; para cada nivel se realizaron dos replicas. Para evaluar la precisión intra-día e inter-día se evaluaron a una concentración de 20 ppm de la mezcla de estándares

de COPs durante 5 días consecutivos y 9 inyecciones por día encontrando desviaciones estándar relativas inferiores a 1,2%. Los porcentajes de recuperación se evaluaron por triplicado en muestras de costilla de cerdo enriquecidas con la mezcla estándar de COPs de 50 ppm; estos valores estuvieron en el rango de 95% - 101,9%. La tabla 5 indica los límites de detección y cuantificación, recuperación y reproducibilidad del método utilizado.

**Tabla 5. Características analíticas del método para determinación de COPs**

COPs	LD <sup>a</sup> μg/L	LQ <sup>b</sup> μg/L	Intra-día*		Inter-día**		Recuperación %
			X <sup>c</sup>	RSD <sup>d</sup>	X	RSD	
25-OH	1,06	2,91	1,056	0,29	0,93	0,78	101,9
6-CETO	2,2	6,1	0,971	0,96	1,21	1,18	95,0
7-CETO	7,8	23	1,221	0,25	1,12	0,93	98,24

(\* n= 5, \*\* n= 9)

<sup>a</sup> Límite de detección, μg/L

<sup>b</sup> Límite de cuantificación, μg/L

<sup>c</sup> valores medios, μg/g.

<sup>d</sup> desviación estándar relativa, %

25-OH: 25-hidroxicolesterol6-ceto: 6-cetocolesterol7-ceto: 7-cetocolesterol

### Contenido de COPs

Teniendo en cuenta la metodología y el diseño experimental completamente aleatorizado, la tabla 6 resume los experimentos realizados frente a los valores de la variable dependiente, que en ese caso es

la concentración de 7-cetocolesterol, puesto que este compuesto se detectó en la mayoría de las muestras analizadas, resultados que permitieron realizar el análisis estadístico.

**Tabla 6. Concentración de COPs por factores**

Bloque	Preparación	Aceite	Humedad	7-Ceto μg/g
I	-1	1	1	0,296
	-1	-1	-1	0,125
	-1	1	-1	0,376
	0	0	0	0,029
	1	-1	-1	0,289
	-1	-1	1	ND
	1	1	1	ND
	1	-1	1	0,06
	0	0	0	0,054
	1	1	-1	0,331
	-1	1	1	0,578
	-1	-1	-1	0,440
	-1	1	-1	0,940
	0	0	0	0,058
	1	-1	-1	0,482
II	-1	-1	1	0,067
	1	1	1	0,089
	1	-1	1	ND
	0	0	0	0,509
	1	1	-1	0,437



Con la tabla anterior se realizó el análisis del diseño mediante el paquete estadístico Statgraphic Centurión XVI. Según el análisis de varianza, solo uno de los factores influye en la formación de COPs (7-ceto), en este caso, el factor humedad de la carne, ejerce una influencia negativa sobre la respuesta, cuyo valor-p de la razón F es inferior a 0,05, como se ilustra en la tabla 7.

**Tabla 7. Análisis de varianza para diseño experimental**

Fuente	Razón-F	Valor-P
A: Preparación	1,99	0,1776
B: Aceite	3,88	0,0664
C: Humedad	8,39	<b>0,0105</b>

**Parámetros característicos de la carne de cerdo.** Es necesario considerar que el contenido de agua es un parámetro importante en la determinación de COPs, ya que podría intervenir en el proceso de formación de óxidos de colesterol por la formación de radicales libres hidroxilo, tanto en el proceso de preparación, como en el almacenado. Las muestras de carne de los bloques I y II poseen menos concentración de agua que las muestras crudas (Tabla 4), por cuanto en el proceso de preparación se pierden tanto agua como otros compuestos propios de la carne, estos valores oscilan entre 33,2% – 59,9% respectivamente.

Con respecto a los valores de colesterol en insumos se puede observar que la manteca de cerdo pura obtuvo la mayor cantidad de colesterol (0,2730mg/g), lo cual es razonable debido a que este compuesto es propio de animales. Es interesante destacar los resultados obtenidos para la muestra de aceite reutilizado ya que al parecer presenta la menor concentración de colesterol (0,1165 mg/g).

En muestras de frito pastuso los máximos valores fueron para lomo y costilla que corresponde a G, A y

C, J, respectivamente y los valores más bajos fueron para las muestras D, I, que corresponde a pierna.

Por otra parte, la fracción lipídica varió considerablemente entre las muestras de carne cruda y carne preparada ya que en el proceso de preparación se incrementó su concentración, obteniendo los valores más altos para las muestras B, C, E y J, que corresponden a costilla con valores de 11,2% - 36,2%; de igual forma los valores más bajos fueron obtenidos para las muestras de lomo y pierna respectivamente.

El comportamiento de las muestras presentó variaciones en todos los casos posiblemente al efecto de los factores estudiados; caso contrario ocurre con su interpretación estadística ya que el valor-p de la razón F fueron mayores a 0,05; demostrando que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, con lo cual, parámetros como agua y colesterol deberían tratarse independientemente; por otra parte, este mismo valor para lípidos (valor-p < 0,05), indica que si existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Las desviaciones estándar relativas fueron inferiores a 4,84% en todos los casos.

**Efecto del proceso de preparación de frito pastuso en la formación de COPs.** Estudios realizados en este campo han demostrado que el uso de altas temperaturas, tiempos de preparación elevados y métodos de conservación inadecuados aceleran en gran medida las reacciones de oxidación del colesterol.<sup>6</sup> La influencia de los tres factores como preparación, grasa y humedad de la carne, están relacionados con la formación de COPs. El 7-cetocolesterol estuvo presente en la mayoría de las muestras (Gráfico 1a); el 25-hidroxicolesterol fue detectado en grasa de cerdo, aceite vegetal reutilizado, costilla cruda (Tabla 8) y en el ensayo C del alimento preparado (Tabla 9), pero a muy bajas concentraciones (Gráfico 1b). El compuesto 6-cetocolesterol no fue detectado.



Tabla 8. Contenido de COPs y RSD en insumos

Muestra	Compuesto	µg/g	RSD <sup>a</sup>	Muestra	Compuesto	µg/g	RSD
Gc	25-OH	0,0046	2,8	Lomo	25-OH	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND		6-Ceto	ND	ND
	7-Ceto	0,1450	2,5		7-Ceto	0,0851	1,8
Avn	25-OH	ND	ND	Pierna	25-OH	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND		6-Ceto	ND	ND
	7-Ceto	ND	ND		7-Ceto	ND	ND
Avr	25-OH	0,0363	4,1	Costilla	25-OH	0,0658	2,3
	6-Ceto	ND	ND		6-Ceto	ND	ND
	7-Ceto	0,0133	ND		7-Ceto	0,2167	1,5

<sup>a</sup> Desviación estándar relativa, % (n=2)

Avn: Aceite vegetal nuevo

Gc: grasa de cerdo

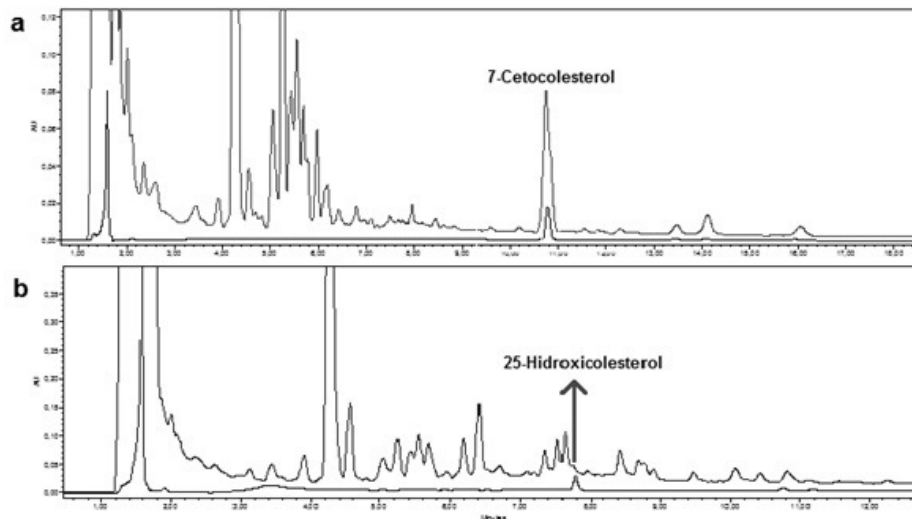
Avr: Aceite vegetal reutilizado

Tabla 9. Contenido de COPs y RSD en frito pastuso

Muestra	Compuesto	Bloque 1		Bloque 2		Muestra	Compuesto	Bloque 1		Bloque 2	
		µg/g	RSD	µg/g	RSD			µg/g	RSD	µg/g	RSD
A	25-OH	ND	4,0	ND	ND	F	25-OH	ND	ND	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND	ND	ND		6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,296	1,7	0,578	2,9		7-Ceto	ND	ND	0,067	4
B	25-OH	ND	ND	ND	ND	G	25-OH	ND	ND	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND	ND	ND		6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,125	4,0	0,440	2,9		7-Ceto	ND	ND	0,089	1,2
C	25-OH	0,005	1,2	0,049	2,5	H	25-OH	ND	ND	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND	ND	ND		6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,376	1,5	0,940	3,7		7-Ceto	0,060	4,3	ND	ND
D	25-OH	ND	ND	ND	ND	I	25-OH	ND	ND	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND	ND	ND		6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,029	4,1	0,058	4,4		7-Ceto	0,054	2,7	0,509	2,5
E	25-OH	ND	ND	ND	ND	J	25-OH	ND	ND	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND	ND	ND		6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,289	2,4	0,482	3,2		7-Ceto	0,331	2,2	0,437	2,6

ND: No detectado

**Gráfico 1. Cromatogramas de COPs obtenidos por HPLC-UV, usando columna C8, acetonitrilo/agua, 90:10 y flujo 1,5 mL/min**

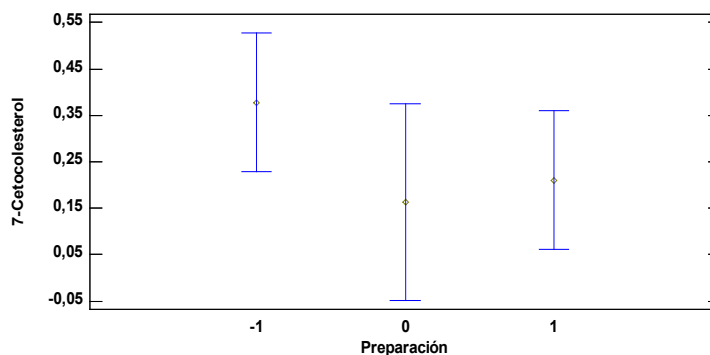


a) Solución estándar de 5 ppm y muestra preparada C2 a 238 nm para 7-cetocolesterol. b) solución estándar de 5 ppm y muestra preparada C2 a 205 nm para 25-hidroxicolesterol.

**Tipo de preparación.** Las mayores concentraciones de 7-ceto fueron obtenidas para la fritura directa de la carne (nivel -1), que corresponde a las muestras C y A respectivamente (Gráfico 2), las menores concentraciones fueron para el tipo de preparación en la cual el adobo fue minutos antes de la cocción y posterior fritura (nivel 0), cuyas muestras fueron I, D y F, respectivamente. De igual forma, se obtuvo similar comportamiento para las muestras G y H en la cual, también se utilizó cocción de la carne solo

que el adobo fue un día antes de la preparación (nivel 1). Probablemente esta diferencia en las concentraciones se debe al efecto de factores como tiempo-temperatura, ya que en la preparación sin cocción en agua, la carne estuvo expuesta por mayor tiempo a la temperatura de fritura que puede alcanzar valores hasta 175 °C; en la cocción y posterior fritura, la carne se expuso a temperatura de ebullición del agua y después a la fritura en aceite o grasa pero en menor tiempo.

**Gráfico 2. Influencia del tipo de preparación en la formación de 7-cetocolesterol**

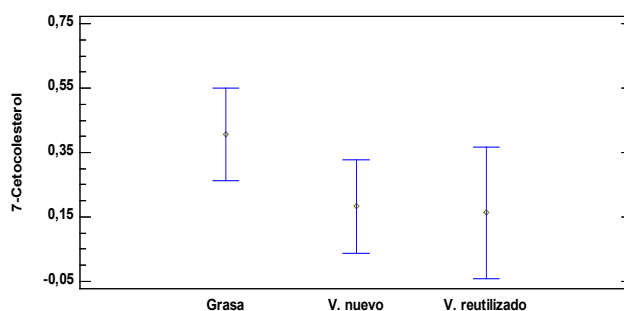


En cualquier caso, tanto las condiciones de tiempo-temperatura como la forma de preparación de alimentos, ejercen un efecto significativo sobre el grado de formación de COPs acelerando en gran medida las reacciones de oxidación lipídica disminuyendo en consecuencia la estabilidad oxidativa del colesterol de membrana.<sup>6</sup>

**Aceite o grasa.** En el análisis de COPs en insumos, se encontró que la grasa de cerdo y aceite reutilizado presentaron concentraciones apreciables de 7-ceto, además se determinó 25-hidroxicolesterol en grasa de cerdo en baja concentración. Por otra parte, en las muestras de frito pastuso las concentraciones más bajas de 7-ceto fueron para aceite reutilizado (Gráfico 3), las cuales corresponden a los experimentos D e I respectivamente, y cuyos niveles de colesterol fueron los más bajos, además, como es aceite reutilizado los hidroperóxidos lipídicos generados por autooxidación de ácidos grasos poliinsaturados y

los radicales alcoxilo y peroxilo generados a partir de los mismos, posiblemente afectaron tanto al colesterol como a otros lípidos presentes; de igual forma las muestras F, H, E y B que corresponden a aceite vegetal nuevo, presentaron valores bajos de concentración en comparación a las tratadas con grasa de cerdo, encontrando los máximos niveles de concentración del oxisterol y cuyas muestras fueron C, A y J, respectivamente.<sup>17</sup> Debido a que la grasa de cerdo posee ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico, estos oxidan al colesterol más rápido que los aceites saturados durante el calentamiento; por otra parte, las capacidades de los aceites de cocina para inhibir la pérdida de colesterol se debe a que demasiado aceite sólo fluiría alrededor de la carne, en este caso, la degradación de colesterol sin duda disminuirá significativamente, debido a que el exceso de aceite podría formar una barrera física alrededor de la carne bloqueando el contacto del oxígeno y el colesterol.<sup>18, 19</sup>

**Gráfico 3. Influencia del tipo de aceite o grasa en la formación de 7-cetocolesterol**



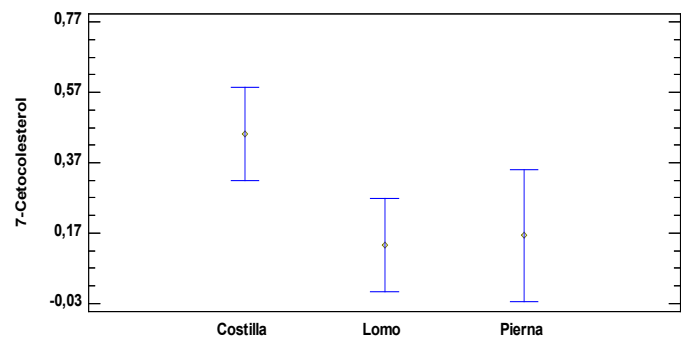
**Tipo de carne de cerdo.** En muestras de carne de cerdo cruda las concentraciones de COPs fueron mayores en costilla, encontrando 7-ceto y 25-hidroxi, siendo este último el de menor concentración, y en la única pieza de carne que fue detectado. Aunque los niveles de COPS en carne fresca son mínimos o inexistentes, estos pueden presentarse a causa de exposición de los alimentos a condiciones de almacenamiento o de conservación no adecuados, por otra parte, estudios reportan que han detectado cantidades apreciables de  $7\alpha$ - y  $7\beta$ -hidroxicolesterol, y de 7-cetocolesterol en hamburguesas frescas, inmediatamente antes de ser almacenadas.<sup>3,20,21</sup>

Con respecto a los ensayos en frito pastuso, las muestras con mayores concentraciones de 7-ceto fueron para costilla, cuyos niveles de colesterol y lípidos fueron los más altos en los análisis de insumos y posiblemente fueron los desencadenantes del proceso oxidativo. De igual manera, los valores más bajos se encontraron para las piezas de lomo y piezas de pierna, respectivamente. Por consiguiente, se verifica que la exposición a grasas animales, condiciones de tiempo-temperatura, método de cocinado aplicado, ejerza un efecto significativo sobre el grado de formación de oxisteroles (Gráfico 4). En este sentido, Nourooz-Zadeh y Appelqvist, concluyeron que, en corteza de cerdo fresca no se

detectan cantidades cuantificables de óxidos de colesterol. Sin embargo, cuando ésta es sometida a fritura a 170º C se detectan las formas 7α-OH y 7β-OH colesterol y cuando la temperatura de cocinado asciende hasta 200º C, aparecen además los óxidos 5,6α-epoxi, 7-keto y 25-OH colesterol.<sup>22</sup> De forma similar, Gil et al., demostraron que la cantidad de

oxiesteroles en carne de cerdo recién cocinada a la plancha, es significativamente inferior a la cuantificada sobre muestras sometidas a cocción o a asado en horno.<sup>4</sup> Dicho comportamiento apoya lo reportado por Chien et al., respecto a que la generación de óxidos de colesterol aumenta conforme se prolonga el período de calentamiento.<sup>23</sup>

Gráfico 4. Influencia de la pieza de carne de cerdo en la formación de 7-cetocolesterol



**Análisis de correlación.** Los valores de los coeficientes de correlación lineal de Pearson presentan para cada par de variables valores cercanos a 1, lo cual indica correlaciones entre algunos parámetros bromatológicos y la formación de COPs. Un valor del coeficiente de Pearson de -0,6745 indica una correlación negativa entre contenidos de agua de las muestras de carne de cerdo en insumos y las concentraciones de 7-cetocolesterol en frito pastuso; de igual forma, una correlación positiva con lípidos

totales en insumos son demostrados por el valor del coeficiente de Pearson de 0,7471, respectivamente. La tabla 10 indica la matriz de correlación de parámetros bromatológicos en la cual incluye el valor-p para cada par de variable que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas, cuyos valores inferiores a 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 10. Matriz de correlación de parámetros bromatológicos y 7-cetocolesterol

Correlaciones	7-Cetocolesterol	Colesterol	Lípidos	Humedad
7-Cetocolesterol		0,4111	0,7471	-0,6745
		0,0717	0,0002	0,0011
Colesterol	0,4111 <sup>a</sup>		0,2268	-0,283
	0,0717 <sup>b</sup>		0,3364	-0,2267
Lípidos	0,7471	0,2268		-0,7972
	0,0002	0,3364		0
Humedad	-0,6745	-0,283	-0,7972	
	0,0011	0,2267	0	

<sup>a</sup> Coeficiente de correlación de Pearson    <sup>b</sup> Valor-p

Tabla 11. Matriz de correlación para factores y 7-cetocolésterol

Correlaciones	[7-ceto]	Humedad	Aceite	Preparación
[7-ceto]		-0,2857	0,1387	-0,0500
		0,2221	0,5598	0,8341
Humedad	-0,2857 <sup>a</sup>		0,0000	0,0000
	0,2221 <sup>b</sup>		1,0000	1,0000
Aceite	0,1387	0,0000		0,0000
	0,5598	1,0000		1,0000
Preparación	-0,0500	0,0000	0,0000	
	0,8341	1,0000	1,0000	

<sup>a</sup> Coeficiente de correlación de Pearson    <sup>b</sup> Valor-p

Gráfico 5. Diagrama de dispersión de la matriz de correlación de parámetros bromatológicos y 7-cetocolésterol

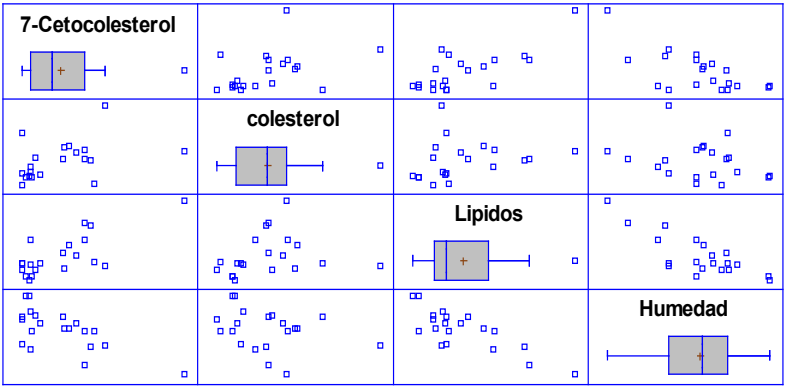
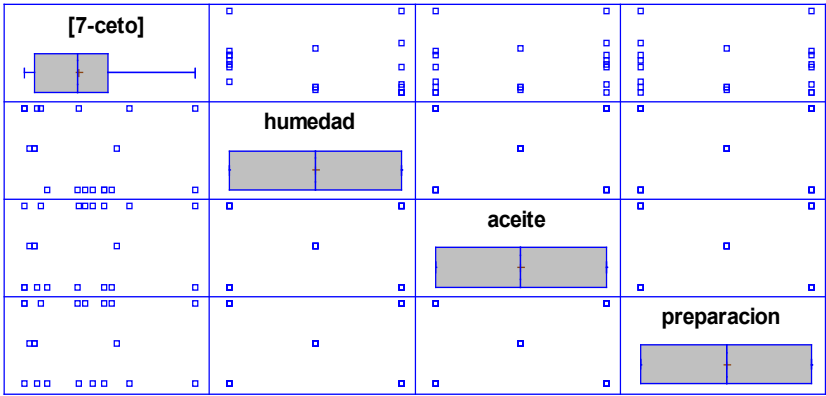


Gráfico 6. Diagrama de dispersión de la matriz de correlación para factores y 7-cetocolésterol



El gráfico 5 presenta los diagramas de dispersión de los parámetros bromatológicos medidos, observando la correlación negativa y positiva para humedad - 7-ceto y lípidos - 7-ceto, respectivamente.

Por otra parte, el coeficiente de correlación de Pearson para cada par de variables con respecto a factores y 7-cetocolesterol, fue próximo a cero, lo que indica que no existen correlaciones entre los factores del diseño experimental y 7-cetocolesterol (Tabla 10). Estos resultados vienen corroborados por los valores-p inferiores a 0,05 indicando que no existen correlaciones significativas entre cada par de variables.

El gráfico 6 presenta los diagramas de dispersión de los parámetros de preparación medidos, en los que se observa que no existe linealidad entre los pares de variables mostrados, corroborando así los datos encontrados en la tabla 11.

### Conclusiones

Los contenidos de colesterol, lípidos y agua de la carne de cerdo fueron similares a los reportados en la literatura; además su interpretación estadística demostró que existen diferencias significativas entre los valores de lípidos de las muestras de carne de cerdo crudas, lo cual puede influir en gran medida en la formación de 7-cetocolesterol. El óxido de colesterol 7-cetocolesterol presentó los más altos niveles de concentración en muestras de frito pastuso preparadas con costilla sometida a fritura directa en grasa de cerdo, el 25-hidroxicolesterol solo fue detectado en costilla preparada, costilla cruda y grasa de cerdo, pero a concentraciones muy bajas. El 6-cetocolesterol no fue detectado, lo cual concuerda con la bibliografía, pues pocas veces se reporta este compuesto.

La identificación de óxidos de colesterol en la presente investigación permite establecer la influencia que tienen las formas de preparación de los alimentos de consumo frecuente, en la formación de compuestos que presentan reconocidos efectos adversos para la salud humana. Por lo tanto, se hace necesario establecer programas educativos tendientes a mejorar las prácticas de preparación de los alimentos que contribuyan con la disminución de los índices de morbilidad por enfermedades cardiovasculares.

### Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Posgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño (VIPRI) por la financiación de este trabajo y a la sección de laboratorios por el aporte de equipos y personal requeridos para el desarrollo de la investigación.

### Referencias

1. Velarde E, González A. Colesterol y óxidos de colesterol en carne de pollo. Departamento de Ciencias. Pontificia Universidad Católica del Perú. Revista de Química. 2006; 20 (1-2):11-20.
2. Astaciaran I, Ansorena D, Echarte M, Conchillo A, Menéndez-Carreño M. Óxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta. An. R. Acad. Nac. Farm. 2007;73(4):1159-1174.
3. Pie J, Spahis k, Seillan C. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. J agric. Food chem. 1990;8: 973-979.
4. Gil MD, Bañón S, Laencina J, Garrido M. Oxidación del colesterol en cárnicos: factores que determinan su formación. A. veterinaria. 2004;20: 21-34.
5. Zhou Q, Wasowicz E, Handler B, FleishPer LY, Kummerov FA. An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. Atherosclerosis. 2000;149:191-197.
6. García-Cruset S, Carpenter KL, Guardiola F, Stein BKY, Mitchinson MJ. Oxysterols profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. Free Radical Res. 2001;33(1):31-41.
7. Valenzuela A, Sanhueza J, Nieto S. Óxidos de colesterol (oxisteroles): factores que condicionan su formación, efectos biológicos, y su presencia en alimentos. Revista Chilena de Nutrición. 2002;29(2):116-124.
8. Echarte M, Conchillo A, Ansorena D, Astiasaran I. Óxidos de colesterol en alimentos frescos y congelados, crudos y a la plancha. Nutr. Hosp. 2005; 20: 293-296.
9. Chen-Yi L, Diane W. Distribution of oxysterols in human serum: Caracterización of 25-hydroxicholesterol association whit serum albumin. Nutritional Biochemistry. 1995;6:618-625.
10. Larkeson B, Dutta PC & Hansson I. Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. J. Am. Oil Chem. Soc. 2000;77(6):675-680.

11. Alcaldía de Pasto. Secretaría Municipal de Salud. Plan territorial de Salud 2012-2015. Citado 6 de Marzo de 2015. Disponible en: [http://www.pasto.gov.co/phocadownload/documentos2012/salud/plan\\_territorial\\_de\\_salud\\_2012-2015.pdf](http://www.pasto.gov.co/phocadownload/documentos2012/salud/plan_territorial_de_salud_2012-2015.pdf).
12. Alcaldía de Pasto. Dirección Municipal de Salud. Plan integrado local de acción para la prevención de enfermedades crónicas en Pasto 2006-2015, San Juan de Pasto, 2006.
13. Pino A, Cediel G, Hirsch S. Ingesta de alimentos de origen animal versus origen vegetal y riesgo cardiovascular. *Revista Chilena de Nutrición*. 2009;36(3): 210-216.
14. Daneshfar A, Khezeli T, Lotfi HJ. Determination of cholesterol in foot samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. *Journal of Chromatography B*. 2009;877:456-460.
15. Official Method of Analysis of AOAC International. Gaithersburg, MD, Método No. 930.15 de 1998.
16. Lozada JJ, Gil-Díaz M, Santos-Delgado M, Rubio-Barroso S, Polo-Díez LM. Effect of electron beam irradiation on cholesterol oxide formation in different ready-to-eat-foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2011;12:519-525.
17. Lozada JJ. Determinación de óxidos de colesterol en muestras de alimentos mediante cromatografía de gases. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de química analítica. Madrid. 2012:438.
18. Echarte M, Zulet A, Astiasaran I. Oxidation process affecting fatty acids and cholesterol in fried and roasted salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49:5662-5667.
19. Zhang T. Cholesterol oxidation in roasted salmon fish with different cooking oils. (Tesis Doctoral). Louisiana State University. Department of food science. 2003: 72.
20. Addis PB, Warner GJ. The potential health aspects of lipid oxidation products in food. En: Free radicals and food additives. Auroma O, Halliwell B. Eds. Taylor & Francis Ltd London. 1991:77-119.
21. Nam KC, Du M, Jo C, Ahn DU. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. *Meat Sci*. 2001;58: 431-435.
22. Nourooz-Zadeh J, Appelquist LA. Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J. Food Sci*. 1987;52:57-67.
23. Chien JT, Wang HC, Chen BH. Kinetic model of the cholesterol oxidation during heating. *J. Agr. Food. Chem*. 1998;46:2572-2577