

COLESTEROL — DA DETERMINAÇÃO EM OVOS E PRODUTOS QUE CONTÊM OVOS

FANNY S. TABACOW HIDAL,

Química do Instituto Adolfo Lutz.

A determinação da quantidade de ovos em produtos alimentícios vem sendo, desde há algum tempo, estudada. Assim, H. R. Strohecker e R. Vaubel¹, publicaram um excelente trabalho focalizando este problema, que foi também objeto de estudo de J. Tillmans, H. Riffart e A. Kuhn², L. M. Lampert³, e E. O. Haenni⁴, etc.

O primeiro método ideado para a determinação da quantidade de ovos em produtos alimentícios consistiu na determinação do conteúdo dos lipídios fosforados do ovo. Foi posteriormente verificado, porém, que o conteúdo dos lipídios fosforados em produtos alimentícios frequentemente diminui com o tempo, isto é, durante a armazenagem do produto, como também diminui durante o processo da sua fabricação.

J. Tillmans, H. Riffart e A. Kuhn², mostraram que o conteúdo de colesterol nos ovos é mais ou menos constante, mesmo durante a armazenagem do produto. L. M. Lampert³, que contribuiu com valiosos trabalhos para o desenvolvimento dos métodos analíticos neste campo, sugeriu a determinação do conteúdo de colesterol nos ovos e dos valores assim obtidos, calcular a quantidade de ovos nos produtos alimentícios.

Dos estudos levados a efeito então, mostrou-se: 1.º — que a quantidade quase que total de colesterol é encontrada nas gemas de ovos; 2.º — nem todo o colesterol é encontrado na forma livre. S. J. Thannhauser e H. Schaber⁵, H. Dam⁶ e K. Kusey⁷ indicam um mínimo de 10% para o colesterol em forma de ésteres.

O valor do colesterol determinado em ovos, varia segundo o método utilizado para a sua determinação.

J. Tillmans, H. Riffart e A. Kuhn² acharam uma média de 1,49% de colesterol livre em 8 amostras de gema. L. M. Lampert³ achou uma média de 1,36% de colesterol total na gema, H. Riffart

e H. Keller⁸ acharam uma média de colesterol livre em 3 amostras de gema igual a 1,49% pelo método titrimétrico e 1,50% pelo método colorimétrico. Outros autores dão para ovos com peso médio de 50 g, correspondendo à gema 15 a 18 g, o valor de 1,70% de colesterol.

São dois os tipos de métodos mais usados para a determinação do colesterol; o primeiro, em que se aproveita o fato do colesterol ser precipitável com digitonina, o que só se dá com o colesterol livre e não com os ésteres, e depois a sua valoração gravimétrica ou colorimétrica.

O segundo método consiste na extração do colesterol por meio de solventes orgânicos com ou sem saponificação prévia, utilizando-se para a determinação métodos colorimétricos.

Os métodos que usam a digitonina dão bons resultados mas devido ao elevado preço do reativo não são muito usados na rotina. No segundo grupo de métodos, quando usamos para a determinação a reação colorimétrica de Lieberman⁹, Burchard¹⁰, obtemos ótimos resultados.

Têm grande importância neste método o solvente e os detalhes do procedimento da extração, bem como a saponificação prévia do produto.

Devido a esses fatores, passamos a estudá-lo e posteriormente aplicá-lo à rotina.

ESTUDO DA REAÇÃO DE LIEBERMAN-BURCHARD

A reação de Lieberman-Burchard^{9,10}, processa-se normalmente em solução clorofórmica, quando tratamos o colesterol com anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado. Desenvolve-se uma coloração que, do azul inicial, passa para verde e cuja intensidade varia com o conteúdo de colesterol.

São muitos os fatores que influenciam decisivamente o resultado final da reação. Assim, pois, a quantidade de ácido sulfúrico deve ser exatamente medida, a reação deve desenvolver-se numa temperatura exatamente determinada, no escuro e num determinado intervalo de tempo. Além do que, o material usado deve estar rigorosamente seco.

A coloração original da reação de Lieberman⁹-Burchard¹⁰ atinge o seu máximo em 9 minutos e é de pequena duração. Shettel¹¹, estudando a reação acima, mostrou que a coloração desenvolvida torna-se estável por mais tempo quando adicionamos aos reagentes iniciais ácido acético glacial em proporção definida. Assim a coloração desenvolve-se mais lentamente, atingindo um máximo em 21 minutos, aí permanecendo durante 14 minutos para depois diminuir muito lentamente.

Assim, pois, esta reação pode ser usada para determinações quantitativas.

PARTE EXPERIMENTAL

Iniciando os nossos trabalhos experimentais efetuamos uma série de determinações do colesterol contido em ovos de galinha, adquiridos nos nossos mercados e separados segundo a classificação aí usada, isto é, ovos de 1.^a qualidade com carimbo verde, ovos de 2.^a qualidade com carimbo roxo e ovos de 3.^a qualidade com carimbo preto.

A técnica foi a seguinte: pesamos em um becker cêrca de 0,100 g de ovo total em pó, sêco a 50° e adicionamos sob agitação 10 cm³ de uma solução a 60% de hidróxido de potássio, cobrimos com um vidro de relógio, aquecemos em banho-Maria durante 3 horas e agitamos ocasionalmente até desintegrar tôda a massa.

Deixamos esfriar até 40°, adicionamos 6 cm³ de álcool etílico e agitamos até que tôda a matéria insolúvel ficasse finamente dispersa. Adicionamos 20 cm³ de éter etílico, agitamos bem e transferimos as soluções para um funil de separação de 250 cm³ de capacidade. Lavamos o becker da saponificação com 2 ou 3 pequenas porções de éter e com 10 cm³ de uma solução a 1% de hidróxido de potássio e transferimos as soluções de lavagens para o funil de separação. Agitamos bem o líquido por 10 a 15 segundos. Deixamos em repouso durante alguns minutos para permitir que as camadas se separassem e em seguida vagarosamente transferimos a camada inferior, que é a solução de sabão, para um funil de separação de 150 cm³, com o cuidado de não transferir qualquer pequena quantidade de emulsão ou matéria insolúvel que estivesse entre as duas camadas. Lavamos a extremidade inferior do funil com 5 cm³ de hidróxido de potássio a 1%, transferimos para o funil de 150 cm³

adicionamos 10 cm³ de éter e agitamos vigorosamente. Depois que as camadas separaram-se, descarregamos a camada inferior e transferimos a camada de éter do funil de 150 para o de 250 cm³ lavando o primeiro com 2 vezes 5 cm³ de éter.

Lavamos a solução de éter como anteriormente com 10 cm³ de uma solução a 1% de hidróxido de potássio, retendo qualquer matéria insolúvel ou emulsão no funil. Adicionamos à solução de éter 2 cm³ de ácido clorídrico (1+4), agitamos, adicionamos 10 cm³ de água e agitamos novamente. Descarregamos os ácidos da lavagem. Lavamos a solução de éter com 2 porções de 10 cm³ de hidróxido de potássio a 1%. A uma porção da última água de lavagem adicionamos algumas gotas de HCl (1+4), e algumas gotas de fenolftaleína. Se tal prova apresentar-se clara ou só levemente turva, damos por terminada a lavagem do éter. Caso contrário, precisaremos repetí-la.

Se a prova não apresentar turvação, lavamos a solução de éter sucessivamente com 5 cm³ de água contendo uma gota da solução de ácido clorídrico (1+4), e com duas porções de 5 cm³ de água.

Finalmente desprezamos a camada aquosa o mais completamente possível sem perder a solução de éter. Filtramos a solução etérea para um tubo de ensaio com saída lateral graduado em 5 cm³ através de 2 g de sulfato de sódio anidro, em um funil Buchner de vidro com placa porosa ligado a um pequeno aparelho de destilação, segundo nos mostra a figura n.º 1.

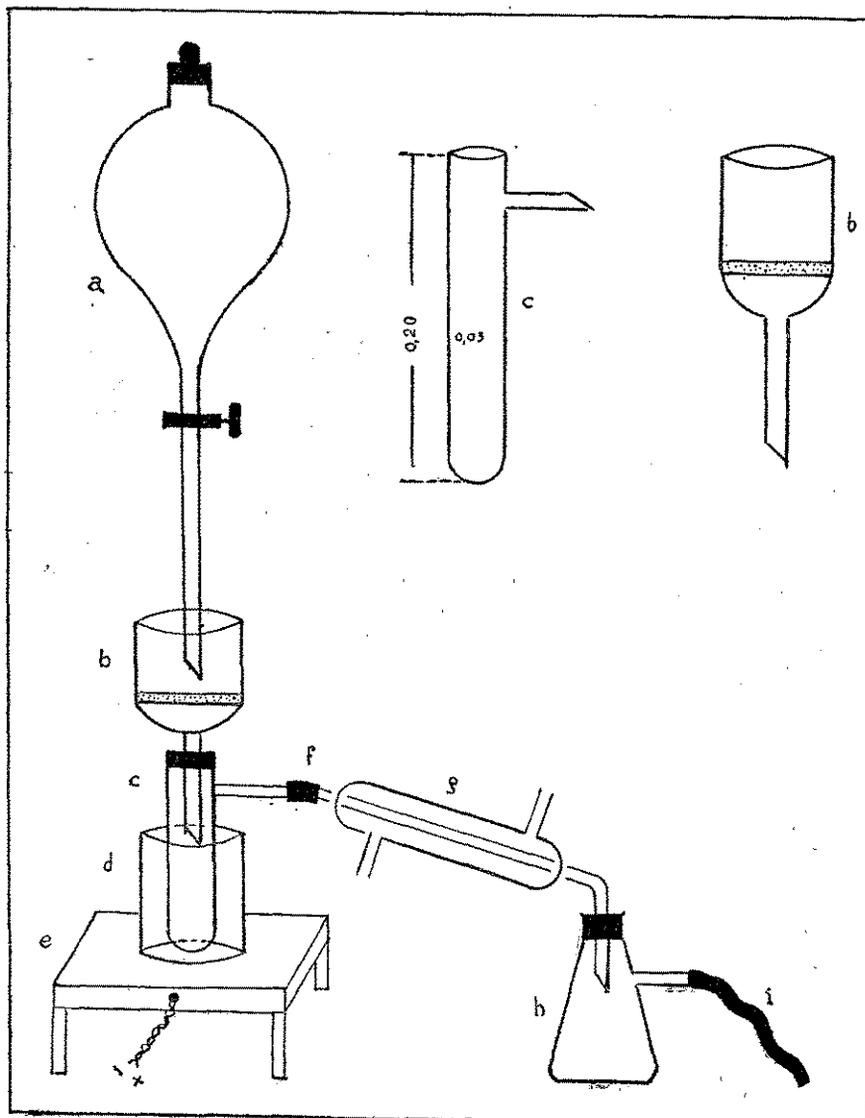
Depois da destilação total do éter colocamos o tubo em um dessecador sob ácido sulfúrico durante 12 horas para a secagem completa.

O resíduo dissolvemos em 5 cm³ de clorofórmio, adicionamos 1 cm³ de ácido acético glacial, 2 cm³ de anidrido acético e 0,2 cm³ de ácido sulfúrico exatamente medidos. Fechamos o tubo com uma rolha de borracha recoberta por celofane, agitamos bem e levamos a um banho a 23º durante 25 minutos, conservando o tubo no escuro.

A coloração verde desenvolvida foi medida num aparelho chamado "Lumetron" fabricado pela Photovolt Corporation, Modelo 400 A, que não é nada mais que um colorímetro fotoelétrico. Usamos para a leitura o filtro vermelho n.º 650, e da leitura assim efetuada, deduzimos a quantidade de colesterol da amostra. Para isso efetuamos primeiramente a construção de um gráfico padrão, partindo de quantidades conhecidas de colesterol, como passamos a descrever.

APARELHO DE FILTRAÇÃO

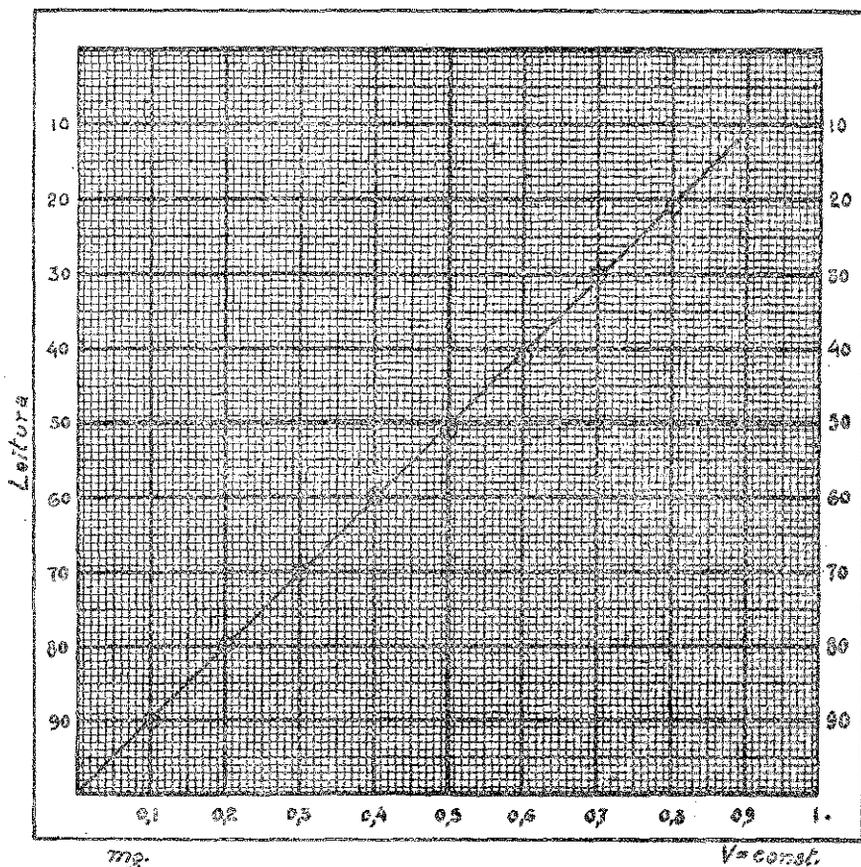
Figura N.º 1



- a — funil de separação.
- b — funil Buchner G3, de vidro com placa porosa.
- c — tubo de ensaio graduado com saída lateral.
- d — banho-maria ($\pm 50^{\circ}\text{C}$).
- e — chapa elétrica de aquecimento.
- f — ligação de borracha.
- g — refrigerante.
- h — balão com saída lateral.
- i — tubo de borracha.

GRAFICO PADRÃO

USADO na determinação do colesterol,
no Lumetron 400 A — Filtro vermelho 650



Pesamos 0,050 g de colesterol Reidel, recristalizado em álcool e seco em estufa a 50° durante 24 horas. Dissolvemos em 50 cm³ de clorofórmio recém destilado. 1 cm³ desta solução contém 0,001 g de colesterol. Tomamos 0,1 cm³, 0,2 cm³, 0,3 cm³, etc, desta solução. Elevamos a 5 cm³ com clorofórmio e efetuamos a reação de Lieberman-Burchard, modificada por Sheftel. Das leituras assim obtidas, traçamos o gráfico padrão.

$$\frac{\text{Cálculo}}{\text{S}} \frac{L \cdot 100}{\text{S}} = \text{n.º de g de colesterol por 100 g de produto.}$$

L = mg de colesterol na análise.

S = n.º de g da amostra.

Apresentamos abaixo os resultados da dosagem do colesterol em ovos de galinhas, pelo emprêgo do método que acabamos de descrever.

Conteúdo do colesterol em ovos de galinhas:

OVOS COM CARIMBO VERDE

N.º da amostra	g/ovo	g/%
1	0,235	1,85
2	0,274	2,20
3	0,238	1,76
4	0,212	1,42
5	0,164	1,18
6	0,192	1,50
7	0,174	1,31
8	0,217	1,55
9	0,279	2,00
10	0,188	1,48
11	0,264	1,84
12	0,194	1,84
pêso médio dos ovos 50 g		
média de colesterol por ovo, 0,216 g		

OVOS COM CARIMBO RÔXO

N.º da amostra	g/ovo	g/%
13	0,204	1,27
14	0,203	1,48
15	0,174	1,15
16	0,143	1,41
17	0,159	1,01
18	0,190	1,34
19	0,169	1,05
20	0,161	1,18
pêso médio dos ovos 45 g		
média de colesterol por ovo, 0,175 g		

OVOS COM CARIMBO PRETO

N.º da amostra	g/ovo	g/%
21	0,187	1,66
22	0,173	1,47
23	0,156	1,23
24	0,166	1,29
25	0,153	1,40
26	0,198	1,55
27	0,169	1,32
28	0,175	1,63
29	0,187	1,78
pêso médio dos ovos 40 g		
média de colesterol por ovo, 0,170 g		

A mesma técnica é usada para a determinação do número de ovos em macarrões, biscoitos, pães de ovos, etc., porém com uma ligeira modificação na primeira fase do processo, isto é, fazemos primeiramente uma hidrólise ácida para desintegrar a massa.

Pulverizamos a amostra, passamos por uma peneira de 20 malhas, pesamos 2 g da mesma em um becker de 100 cm³, e adicionamos, sob agitação, 10 cm³ de ácido clorídrico (1+1). Aquecemos em banho-Maria durante 30 minutos, agitando ocasionalmente para desintegrar toda a massa.

Esfriamos o frasco, adicionamos cuidadosamente com agitação 8 g de hidróxido de potássio em pastilhas, até que a média do líquido comece a ferver. (Cuidado, esta reação se dá com grande desenvolvimento de calor).

Enquanto quente colocamos o frasco no banho-Maria, cobrimos com um pequeno vidro de relógio e aquecemos 3 horas com ocasional agitação da mistura.

Esfriamos até cerca de 40°, adicionamos 6 cm³ de álcool agitamos vigorosamente por 1 minuto e transferimos a solução para um funil de separação de 250 cm³. O processo continua como ficou dito acima para ovos.

$$\text{Cálculo} \quad \frac{L}{S} \cdot 100 = \text{n.º de g de colesterol por 100 g do produto.}$$

L = mg de colesterol na análise

S = n.º de g da amostra.

Da quantidade de colesterol assim obtida podemos deduzir a quantidade de ovos empregados na fabricação do produto.

Quando tomamos para os ovos a média de 0,170 g de colesterol por ovo, então um macarrão que contém 3 ovos por quilo de massa deverá conter 0,510 g de colesterol por quilo. A quantidade mínima permitida pelo Regulamento Bromatológico do Estado de São Paulo

é 0,450 g de colesterol por quilo, para macarrões, e 0,600 g para pães com ovos.

Foram analisados por êste modo, uma série de produtos que damos a seguir:

BISCOITOS

N.º da amostra	Colesterol g/%
3.103	0,160
3.104	0,140
3.105	0,150
3.106	0,150
3.107	0,110
3.411	0,100
3.412	0,120
3.413	0,060
3.415	0,150
3.417	0,180
3.418	0,120
3.419	0,160
3.420	0,280
3.597	0,060
3.598	0,100
3.770	0,106
4.054	0,128
4.066	0,100

MACARRÕES

N.º da amostra	Colesterol g/%
1.670	0,050
1.700	0,090
2.315	0,060
2.421	0,050
2.814	0,060
3.213	0,080
3.287	0,058
3.288	0,050
3.289	0,055
67	0,050
266	0,120
343	0,070
1.471	0,100
1.472	0,054
1.839	0,044
2.053	0,054

CONTROLE DO MÉTODO

Para podermos julgar a especificidade e exatidão do método por nós usado, passamos a dosar o colesterol em massas às quais adicionamos colesterol em quantidade conhecida. Os resultados obtidos nestas análises permitem-nos declarar que a determinação do colesterol de acôrdo com a técnica descrita é de grande exatidão e especificidade. Podemos pois, aconselhar o uso dêste método nas análises de rotina, para a determinação da quantidade de ovos em produtos alimentícios.

RESUMO

Estudamos neste trabalho o problema da determinação da quantidade de ovos em produtos alimentícios. Foram feitas análises em

18 biscoitos e 16 macarrões, e os resultados obtidos permitem-nos declarar que a determinação da quantidade de ovos em produtos alimentícios de acôrdo com a técnica descrita, é de grande exatidão.

SUMMARY

We have studied in this work the problem of the determination of the amount of eggs in alimentary pastes. We have made analysis in 18 "biscoito" and 16 "macaroni" and the results in these analysis give to us the permission to say that the determination of amount of eggs in alimentary pastes in accord of the technic described is of great accuracy.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — STROHECKER, H. R. e VAUBEL, R. — 1939 — Handbuch der Lebensmittelchemie, ed. A. Juchenack, E. Baines, B. Bleyer e J. Grossfeld, Vol. V, 261, Berlin.
- 2 — TILLMANS, J., RIFFART, H., KUHN, A. — 1930 — Z. Utersuch. Lebensm, 60: 361.
- 3 — LAMPERT, L. M. — 1930 — Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 2: 159.
- 4 — HAENNI, E. O. — 1941 — J. Ass. Off. Agr. Chem., 24: 119.
- 5 — THANNHAUSER, S. J. e SCHABER, H. — 1928 — Z. Phisiol. Chem., 127: 278.
- 6 — DAM, H. — 1928 — Biochm. Z., 194: 188.
- 7 — KUSUI, K. — 1929 — Z. Phisiol. Chem., 181: 121.
- 8 — RIFFART, H. e KELLER, H. — 1934 — Z. Untersuch, Lebensm, 68: 113.
- 9 — LIEBERMAN, C. — 1885 — Ber., 18: 1803.
- 10 — BURCHARD — 1914 — Journ. Pharm. Chim., 9: 146.
- 11 — SHEFTEL, A. G. — 1944 — Journ. Lab. Clin. Med., 29: 875.