

Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência

The determination of cholesterol in eggs: a comparison of an enzymatic method with that of high performance liquid chromatography

Mônica R. MAZALLI¹
Tatiana SALDANHA¹
Neura BRAGAGNOLO^{2*}

RIALA6/939

Mazalli, M. R.; Saldanha, T. e Bragagnolo, N. - Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 49 - 54, 2003.

RESUMO. Os métodos enzimáticos apesar de serem baratos e simples são pouco utilizados na análise de colesterol em alimentos, uma vez que a enzima reage com qualquer esteroide presente na amostra. Considerando que ovos possuem apenas colesterol, o objetivo deste trabalho foi otimizar um método enzimático para determinação de colesterol em gema de ovos e compará-lo com um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em ambos os métodos foi realizada saponificação direta das amostras e extração da matéria insaponificável com hexano. No método enzimático foi utilizado um *kit* (LABORLAB SA) e a absorbância foi determinada a 499 nm, 90 minutos após a reação. Na CLAE utilizou-se coluna C₁₈, 100 x 4,6 mm x 4 µm (Chromolith, Merck), fase móvel acetonitrila:isopropanol (85:15) e fluxo de 2 mL/min. Os métodos foram validados através de testes de recuperação, material de referência certificado de ovo em pó (SRM 1846, NIST) e repetibilidade. Os valores médios de colesterol nos ovos foram 1363 ± 47 e 1364 ± 40 mg/100g de gema para o método enzimático e por CLAE, respectivamente, não havendo diferenças significativas (p>0,01) entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Ambos os métodos podem ser utilizados com confiabilidade para determinação de colesterol em gema de ovos, sendo que o método enzimático possui a vantagem de ser bem menos oneroso que o por CLAE.

PALAVRAS-CHAVE. colesterol, CLAE, método enzimático, ovos.

¹ alunas de pós-graduação em Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

² Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

* Endereço para correspondência: Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, C.P. 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil, email: neura@fea.unicamp.br.

INTRODUÇÃO

O total de colesterol nos ovos tem correlação positiva com a linhagem e idade das aves, peso do ovo, peso da gema e correlação negativa com o percentual de produção e níveis protéicos da dieta^{2,13}. Deste modo, os valores encontrados na literatura para colesterol em ovos variam largamente. Estas diferenças também são geradas, devido a grande variedade de métodos analíticos.

Para obtenção de resultados analíticos confiáveis, torna-se necessário a validação dos métodos analíticos escolhidos, que podem ser validados no próprio laboratório através de teste de recuperação e pelo emprego de material de referência certificado. Somente desta forma, os resultados encontrados terão exatidão e precisão adequadas para a finalidade a que se destinam¹².

O método colorimétrico foi muito utilizado para determinação de colesterol em alimentos, entretanto, superestimam o teor de colesterol, devido principalmente, a presença de fitoesteróis, de triacilgliceróis ou ácidos graxos livres, que interferem na formação da cor^{3,7,10}. Por outro lado, segundo Bragagnolo e Rodriguez-Amaya^{5,6}, dependendo do método colorimétrico pode-se obter resultados comparáveis aos métodos cromatográficos.

Atualmente, os métodos cromatográficos são os mais empregados, porém, apresentam custos elevados. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido bastante utilizada na determinação do colesterol em alimentos, pois além de separar os esteróis, também separam outros possíveis interferentes e ainda pode ser realizada a temperatura ambiente, ao contrário da cromatografia gasosa (CG), impedindo deste modo, a oxidação do colesterol⁵.

Apesar dos métodos enzimáticos serem mais baratos e simples, não existem muitos estudos à respeito de sua utilização em alimentos, pois estes não apresentam especificidade para o colesterol, mas também para qualquer outro esterol presente, podendo desde modo, superestimarem os resultados^{1,7,10}. Baseiam-se na degradação do colesterol pela enzima colesterol-oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio, que através de reação secundária produzem cor. No entanto, Jiang et al.⁷ não encontraram diferenças significativas nos valores de colesterol em ovos obtidos através dos métodos enzimático, CLAE e CG.

Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar um método enzimático para determinação de colesterol em ovos e compará-lo com um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Para a realização deste trabalho foram adquiridos, ao

acaso, ovos com peso médio de 60 g e peso médio de gema de 17 g, obtidos em diferentes supermercados de Campinas, São Paulo.

Os ovos foram cozidos por cinco minutos após ebulição e posteriormente as gemas foram separadas, misturadas e homogenizadas, tomando-se 15 alíquotas de 0,25 g para análise.

2. Método

Em ambos os métodos as etapas anteriores a quantificação foram semelhantes, realizando-se saponificação direta das amostras e extração da matéria insaponificável segundo Bragagnolo e Rodriguez-Amaya⁴, com modificações realizadas durante o presente trabalho. A Figura 1 demonstra o fluxograma analítico.

2.1 Saponificação direta

Pesou-se 0,25 g de amostra em tubo de ensaio com tampa rosqueável de 70 mL e adicionou-se 10 mL de KOH 2% em etanol absoluto. Posteriormente, os tubos foram colocados em banho-maria à 50°C em agitação por 2 horas. Em seguida, adicionou-se 5 mL de água destilada e deixou-se resfriar. Para extração da matéria insaponificável, adicionou-se 10 mL de hexano agitando em vortex por um minuto. Após a separação, toda a fase hexânica foi transferida para um tubo com tampa rosqueável de 50 mL. Repetiu-se a extração mais duas vezes.

2.2. Determinação do colesterol pelo método enzimático

Para o método enzimático foi utilizado um *kit* (LABORLAB S.A) cuja enzima colesterol-oxidase reage com o grupo 3 β-OH dos esteróis produzindo peróxido de hidrogênio que através de uma reação secundária produz luteína, um composto de coloração rosada. A escolha do *kit* enzimático foi baseada no trabalho de Nogueira e Bragagnolo¹⁰ que verificaram não haver diferenças nos resultados de colesterol obtidos por este *kit*, rotineiramente usado na determinação de colesterol sérico e outro específico para colesterol em alimentos.

Uma alíquota de 0,5 mL do extrato de hexano foi seco sob N₂. Em seguida, 0,5 mL de isopropanol grau cromatográfico foi adicionado e agitou-se em vortex. Adicionou-se 3 mL do reativo enzimático preparado da seguinte forma: 0,5 mL do reativo de cor n° 1 (4 aminofenazona 0,025 mol/L), 0,5 mL do reativo de cor n° 2 (fenol 0,055 mol/L), 19 ml de água destilada e 0,4 mL do reativo enzimático (lipase e" 300 U/mL, COD e" 3 U/mL, POD e" 20 U/mL) à amostra. Procedeu-se tratamento térmico por 10 minutos a 37 ± 2°C em banho-maria. Após repouso de 1,5 horas, leu-se a absorbância em espectrofotômetro, contra o branco, igualmente preparado, a 499 nm. A curva de calibração foi construída a partir de uma solução padrão de colesterol (50 mg/50 mL), variando de 0,04 a 0,24 mg.

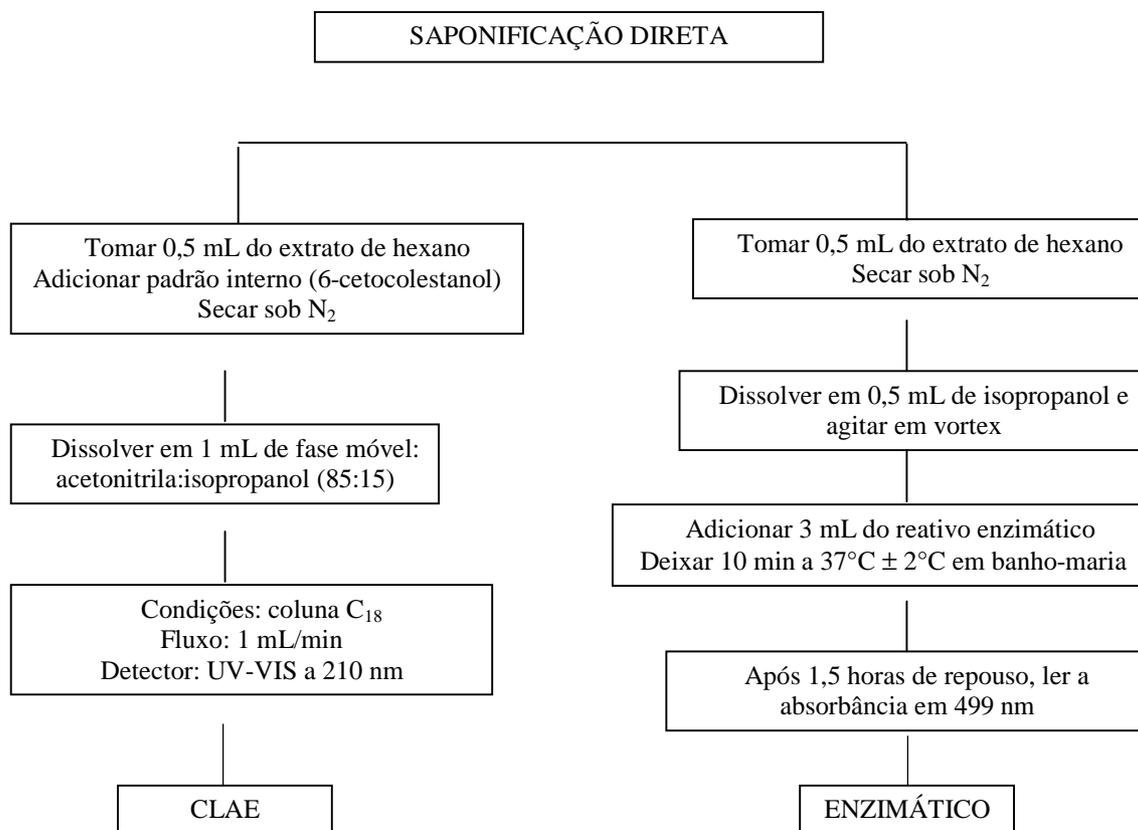


FIGURA 1. Fluxograma para determinação de colesterol por CLAE e pelo método enzimático

2.3. Determinação do colesterol por CLAE

Tomou-se 0,5 mL do extrato de hexano, adicionou-se 0,5 mL (0,504 mg) de 6-cetocolesterol como padrão interno e secou-se sob N_2 . Em seguida, foi dissolvido em 1 mL de fase móvel, filtrado em membrana com poro de 0,45 μm . Injetou-se no cromatógrafo líquido (SHIMADZU), constituído por um sistema de solventes (LAD 10); válvula “Rheodyne” com alça de amostragem de 20 μL e detector UV-VIS (SPD-10 AV). A coluna analítica usada foi C_{18} , 100 mm x 4,6 mm x 4 μm (Chromolith, Merck). A fase móvel utilizada foi acetoneitrila:isopropanol (85:15), com fluxo de 2 mL/min. Os solventes utilizados foram grau cromatográfico, filtrados e degaseificados em ultra-som antes do uso. Os cromatogramas foram processados a 210 nm.

A identificação do colesterol foi realizada através da comparação do tempo de retenção das amostras com o padrão e a quantificação por padronização interna, utilizando 6-cetocolesterol como padrão interno. Um cromatograma característico pode ser observado na Figura 2.

3. Validação dos métodos analíticos

Os métodos foram validados intralaboratorialmente através do emprego de material de referência certificado de ovo

em pó (SRM 1846, NIST), teste de recuperação adicionando-se dois níveis (0,79 e 1,56 mg/100g) de colesterol à amostra e repetibilidade através do coeficiente de variação.

4. Análise estatística

Para verificar as diferenças entre os dados de colesterol obtidos pelos dois métodos e a comparação dos valores experimentais com o padrão de referência certificado (SEM 1846, NIST) foi realizada análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos de material de referência certificado (Tabela 1) de ovo em pó (SRM 1846, NIST) foram $19,1 \pm 0,2$ mg/g para CLAE e $18,8 \pm 0,3$ mg/g pelo enzimático, os quais não foram significativamente diferentes do valor referido no material de referência certificado ($19 \pm 0,2$ mg de colesterol/g de gema).

Ambos os métodos apresentaram uma boa recuperação (Tabela 2), embora o método por CLAE apresentou valores mais elevados (99 e 96%) do que o método enzimático (93 e 92%). Valores superiores de recuperação foram encontrados por Shen et al.¹¹ em gema de ovos (97,6%) e por Karkalas et al.⁸

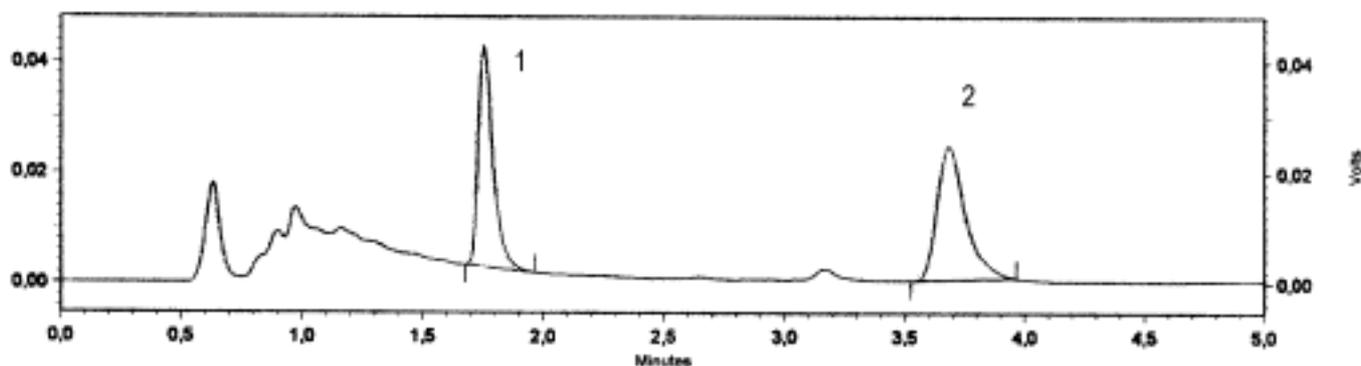


Figura 2. Cromatograma característico de amostra de gema de ovo obtido por CLAE. **Condições cromatográficas:** Fase móvel: acetonitrila:isopropanol (85:15), coluna C₁₈, 100 x 4,6 mm x 4 µm (Chromolith, Merck.), fluxo de 2 mL/min. Picos: (1) 6-cetocolesterol e (2) colesterol.

em carne e queijo (99,2%), ambos utilizando métodos enzimáticos. No trabalho de Bragagnolo e Rodriguez-Amaya⁴, foram encontrados resultados semelhantes de recuperação ao do presente estudo, obtidos por CLAE, na determinação de colesterol em ovos.

Os coeficientes de variação (% CV) entre as amostras (Tabela 3) nos métodos foram equivalentes, variando 3,4% para CLAE e 2,9% para o método enzimático, assim como, para os resultados do material de referência certificado (Tabela 1) que variaram 1,3% para CLAE e 1,2% para o método enzimático. A repetibilidade entre os métodos foi satisfatória, embora o método enzimático dependeu de um controle rigoroso nas condições de análise. Os coeficientes de variações obtidos por Shen et al.¹¹ em gema de ovos (1,6%) e por Nogueira e

Bragagnolo⁹ (4,5%) em ovo em pó, foram semelhantes e maiores, respectivamente, ambos utilizando métodos enzimáticos.

Os valores médios de colesterol em gema de ovos foram 1363 ± 47 e 1364 ± 40 mg/100g de gema para o método enzimático e por CLAE, respectivamente, não havendo diferenças significativas ($p > 0,01$) entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Shen et al.¹¹ também não encontraram diferenças significativas na determinação de colesterol em ovos utilizando o método enzimático e a CG e Jiang et al.⁷ utilizando os métodos enzimático, CLAE e CG.

Os valores de colesterol obtidos em ovos no presente trabalho (232 mg/ovo) foram inferiores ao USDA¹⁴ e semelhantes aos encontrados por Bragagnolo e Rodriguez-Amaya⁴.

Tabela 1: Teores de colesterol (mg/g) obtidos pela comparação entre os métodos enzimático e por CLAE em material de referência certificado de ovo em pó (SRM 1846).

	Método CLAE	Método enzimático	SRM 1846
média ± dp	19,1 ± 0,2 a	18,8 ± 0,3 a	19,0 ± 0,2 a
CV (%)	1,3	1,2	1,1

média ± dp = média ± estimativa de desvio padrão de 5 amostras.

CV = coeficiente de variação

Valores na mesma linha com letras iguais não apresentaram diferença significativa ao nível de 1%.

Tabela 2. Recuperação de colesterol (%) em amostra de gema de ovo, obtidos pelos métodos por CLAE e enzimático.

Colesterol adicionado (mg/100g de amostra)	Método CLAE		Método enzimático	
	média ± dp	CV (%)	média ± dp	CV (%)
0,79	99,0 ± 1,0	2,0	93,0 ± 2,4	2,6
1,56	96,0 ± 1,0	1,0	92,0 ± 1,0	1,0

média ± dp = média ± estimativa de desvio padrão de 5 amostras.

CV = coeficiente de variação

Tabela 3: Resultados de colesterol (mg/100g) em gema de ovo, obtidos pelos métodos por CLAE e enzimático.

Ovos	Método CLAE	Método enzimático
1	1294 a	1341 a
2	1376 a	1318 a
3	1347 a	1329 a
4	1371 a	1324 a
5	1312 a	1347 a
6	1365 a	1359 a
7	1382 a	1353 a
8	1371 a	1424 a
9	1288 a	1406 a
10	1388 a	1394 a
11	1318 a	1312 a
12	1424 a	1424 a
13	1341 a	1329 a
14	1418 a	1406 a
15	1447 a	1394 a
Média ± dp	1363 ± 47	1364 ± 40
CV (%)	3,4	2,9

média ± dp = média ± desvio padrão de 15 amostras.

CV = coeficiente de variação

Valores na mesma linha com letras iguais não apresentaram diferença significativa ao nível de 1%.

CONCLUSÃO

Ambos os métodos podem ser utilizados com confiabilidade para determinação de colesterol em ovos, sendo que o método enzimático possui a vantagem de ser bem menos oneroso que o por CLAE, porém exige um controle rigoroso nas condições de análise.

AGRADECIMENTOS

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

Mazalli, M. R.; Saldanha, T. e Bragagnolo, N. - The determination of cholesterol in eggs: a comparison of an enzymatic method with that of high performance liquid chromatography. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 49 - 54 ,2003.

ABSTRACT. Enzymatic methods are simple and of low-cost, but are nevertheless little used in the determination of cholesterol in foods as the enzyme reacts with any sterol, present in the sample. As eggs only have cholesterol, the objective of this study was to optimize an enzymatic method for the determination of cholesterol in eggs and compare it to a high performance liquid chromatography (HPLC) method. For both methods, the samples were saponified directly and the unsaponifiable matter extracted with hexane. For the enzymatic method, a test kit (LABORLAB S.A) was used and the absorbance read at 499 nm, 90 minutes after the reaction. For HPLC, a C₁₈, 100 x 4.6 mm x 4 µm (Chromolith, Merck) column was used, the solvent being acetonitrile:2-propanol (85:15 v/v) with a flow rate of 2 mL/min. The methods were validated according to recovery test, the use of egg standard reference material (SRM 1846, NIST), and repeatability. The mean result for the enzymatic method was 1363 ± 47 and for HPLC 1364 ± 40 mg/100 g of yolk. There were no significant differences (p>0.01) found between the results of the two methods. Both methods are reliable for use in the determination of cholesterol in yolk, the enzymatic method showing the additional advantage of being cheaper than HPLC.

KEY WORDS. cholesterol, eggs, method enzymatic, HPLC.

REFERÊNCIAS

1. Amundson, D.M.; Zhou, M. Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. **J. Biochem. Biophys. Methods**, 38: 43-52, 1999.
2. Beyer, R.S.; Jensen, L. Cholesterol content of commercially produced eggs in Georgia. **Poult. Sci.**, 68: 1703-1706, 1989a.
3. Beyer, R.S.; Jensen, L. Overestimation of the cholesterol content of eggs. **J. Agric. Food Chem.**, 37: 917-920, 1989b.
4. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B. Comparison of the cholesterol content of brazilian chicken and quail eggs. **J. Food Comp. Anal.**, 2003. (no prelo).
5. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B. Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1): 53-57, 2001.
6. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B. Avaliação comparativa de três métodos para determinação de colesterol em gema de ovo. **Arq. Biol. Tec.**, 36: 237-251, 1993.
7. Jiang, Z.; Fenton, M.; Sim, J.S. Comparison of four different methods for egg cholesterol determination. **Poult. Sci.**, 70: 1015-1019, 1991.
8. Karkalas, J.; Donald, A.E.; Clegg, K.M. Cholesterol content of poultry meat and cheese determined by enzymic and gas-liquid chromatography methods. **J. Food Technol.**, 17: 281-283, 1981.
9. Nogueira, G.C.; Bragagnolo, N. Utilização de um método enzimático para determinação de colesterol em ovo em pó. **Anais XVI Cong. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 1: 431-434, 1998.
10. Nogueira, G.C.; Bragagnolo, N. Assessment of methodology for the enzymatic assay of cholesterol in egg noodles. **Food Chem.**, 79: 267-270, 2002.
11. Shen, C-S. J.; Chen, I.S.; Sheppard, A.J. Enzymatic determination of cholesterol in egg yolk. **J. Assoc. Anal. Chem.**, 65(5): 1222-1227, 1982.
12. Soares, L. M.V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1): 79-84, 2001.
13. Stadelman, W.J.; Pratt, D.E. Factors influencing composition of the hen egg. **World's. Poult. Sci. J.**, 45: 247-260, 1989.
14. United State Departamente of Agriculture – USDA. Nutrient database for standart reference. Realease 13. **NDB** 01123, 1999.

Recebido em 25/11/2002 ; Aprovado em 26/03/2003