

AVALIAÇÃO DO TEOR DE COLESTEROL COMO PARÂMETRO DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA MASSAS COM OVOS*

Neura BRAGAGNOLO**
Délia B. RODRIGUEZ-AMAYA**

RIALA6/742

BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação do teor de colesterol como parâmetro de controle de qualidade para massas com ovos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):21-26, 1993.

RESUMO: O teor de colesterol tem servido como índice da quantidade de ovos em massas com ovos. A resolução 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde (CNNPA-MS) estabelece três ovos por kg de massa, correspondendo a 0,450 g de colesterol por kg de massa. O método seguido pelos laboratórios de fiscalização é o colorimétrico do Instituto Adolfo Lutz (IAL). No presente trabalho, foi realizada uma avaliação comparativa de dois métodos colorimétricos, o do IAL (que utiliza ácido acético, anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado) e o de BOHAC *et alii* (que emprega ácido acético saturado com sulfato ferroso e ácido sulfúrico concentrado), e um método que envolve cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar o teor de colesterol em massas com ovos. Para o último método foi utilizada uma coluna C₁₈, fase móvel acetoneitríliia-isopropanol (75:25) e detector de conjunto de díodos, a quantificação foi feita por padronização externa. Os métodos colorimétricos superestimaram os valores de colesterol e, conseqüentemente, a quantidade de ovos adicionada às massas. Já o método por CLAE revelou que as cinco amostras de massas analisadas continham quantidades de ovos abaixo do mínimo exigido pela legislação vigente.

DESCRITORES: massa com ovos, colesterol, método colorimétrico, controle de qualidade, CLAE.

INTRODUÇÃO

O teor de colesterol tem sido utilizado como parâmetro de qualidade no controle de massas com ovos. A resolução 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde (CNNPA-MS)³ e comunicado 37/80 da Divisão Nacional de Alimentos do Ministério da Saúde (DINAL-MS) de 16 de dezembro de 1980 estabelecem que "massas com ovos" devem conter no mínimo três ovos por kg de massa, correspondendo a 0,450 g de colesterol por kg de massa. Embora a

fonte de informação não tenha sido citada, este valor aparentemente foi calculado considerando que cada ovo contém 150 mg de colesterol. O método oficial, usado pelos laboratórios de fiscalização, é o colorimétrico do Instituto Adolfo Lutz⁵ (IAL), que gera muita controvérsia, uma vez que não é específico para o colesterol, mas para qualquer esterol presente. Outras substâncias que tenham o núcleo do esterol também podem ser quantificadas, superestimando desta forma a concentração de colesterol. Entre os diferentes métodos para massas com ovos, os dois mais recentes envolvem cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)⁴ e cromatografia gasosa (CG)⁶.

* Parte da dissertação de Mestrado da 1ª autora realizada junto ao Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

** Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, UNICAMP, Caixa Postal 6121, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brasil.

No presente trabalho, foi realizada uma avaliação comparativa de dois métodos colorimétricos, o de IAL⁵ (que utiliza ácido acético, anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado) e o de Bohac *et alii*¹ (que envolve ácido acético saturado com sulfato ferroso e ácido sulfúrico concentrado) e um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), estabelecido no nosso laboratório, para determinar os teores de colesterol em massas com ovos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As amostras foram adquiridas, ao acaso, em diferentes quitandas e supermercados de Campinas, em novembro de 1991.

Analisaram-se cinco amostras de massas com ovos de marcas diferentes. As massas foram trituradas em um moinho até a obtenção de um pó que passasse por um tamis de 40 *mesh*.

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

MÉTODOS

Os procedimentos dos métodos avaliados estão apresentados esquematicamente nas Figuras 1, 2, e 3.

A medida da absorbância foi feita em um espectrofotômetro Perkin-Elmer lambda 6, computadorizado.

A curva padrão utilizada para o método do IAL⁵ foi de 0 a 100 mg/l, com colesterol purificado ("Sigma", EUA), demonstrando linearidade na faixa das amostras analisadas.

O método de Bohac *et alii*¹, utilizado para determinação de colesterol em carnes, foi adaptado às condições do laboratório por Bragagnolo & Rodriguez-Amaya² e usado como um método alternativo. A curva padrão foi feita de 0 a 900 µg.

Para o método por CLAE, a extração dos lipídios foi semelhante à do método colorimétrico do IAL⁵. A saponificação foi realizada de acordo com Bohac *et alii*¹.

Foi utilizado um cromatógrafo marca Varian, com injetor de válvula rotatória adaptado com amostrador 10 µl, "Solvent Delivery System" modelo 9010, detector de conjunto de diodos (190-367 nm), modelo 9065 Polichrom computadorizado acoplado a integrador modelo 4400 e registrador Hewlett-Packard modelo 2225 D+. A coluna utilizada foi Spherisorb ODS-1, 5 µm, 150 x 4,6 mm (Alltech Associates, EUA), precedida por coluna C₁₈ de guarda Micropak MCH-10, 10 µm, de 30 x 4,6mm. A fase móvel foi acetonitrila-isopropanol (75:25) num fluxo de 1,2 ml/min com pressão de 73 atm. Todos os solventes

usados foram de grau cromatográfico, filtrados (0,45 µm) e degaseificados antes do uso. Aliquotas do extrato de massa com ovos foram evaporados sob N₂, redissolvidas em 1 ml de fase móvel e filtradas (0,45 µm) antes da injeção. O pico do colesterol foi monitorado a 205 nm.

Para a escolha da fase móvel testou-se previamente as seguintes misturas de solventes: acetonitrila-metanol (50:50 e 60:40), hexano-isopropanol (99:1) e acetonitrila-isopropanol (50:50, 60:40, 65:35; 70:30; 75:25 e 80:20).

A identificação do colesterol foi realizada por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorbância (Figuras 4 e 5) obtidos pelo detector conjunto de diodos do padrão, da amostra, e ainda por co-cromatografia (*spiking*). Para a quantificação, utilizou-se o método de padronização externa. Os níveis utilizados para a curva padrão foram de 5 a 40 µg/injeção (10 µl).

FIGURA 1

Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos, segundo IAL⁵.

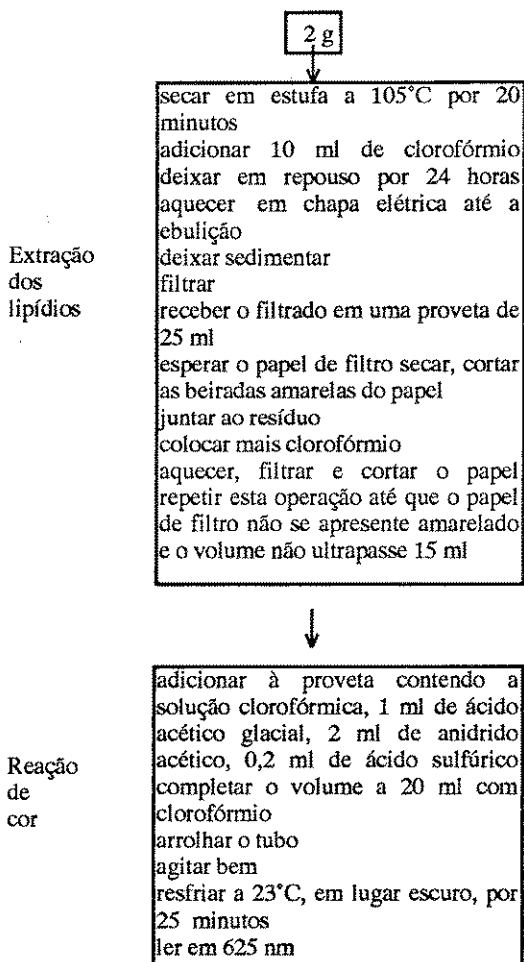


FIGURA 2

Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos, segundo Bohac *et alii*¹.

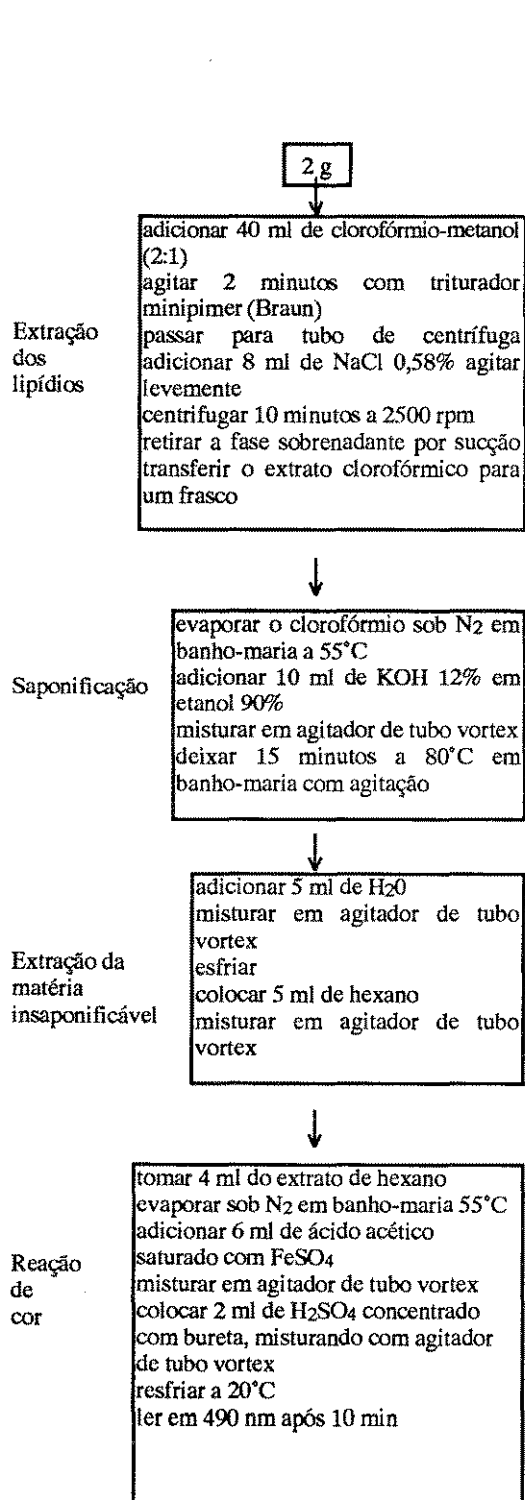
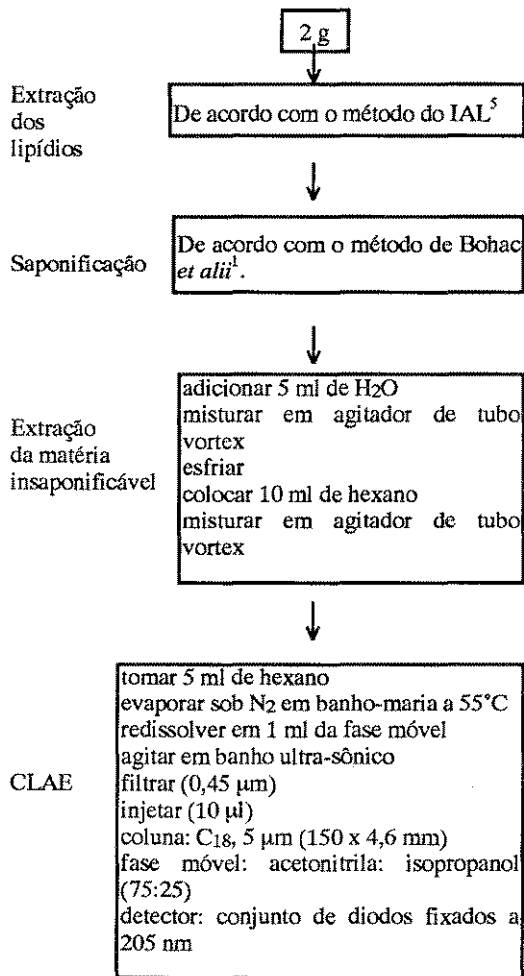


FIGURA 3

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



Um teste de recuperação foi feito adicionando-se quantidades conhecidas de colesterol (0,2 e 0,4 mg) ao extrato de clorofórmio.

Análise estatística

Com o objetivo de verificar as diferenças entre os três métodos, foi realizada análise de variância de um fator ("one way"), com auxílio do Software MICROSTAT. A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey, a um nível de significância de 5%.

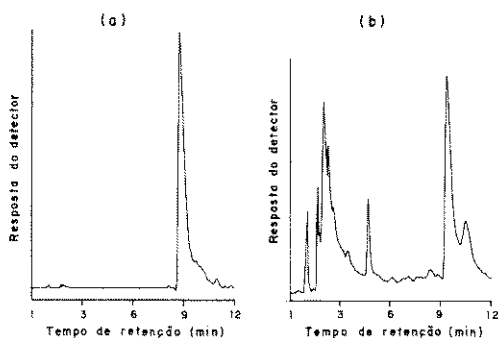


FIGURA 4

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

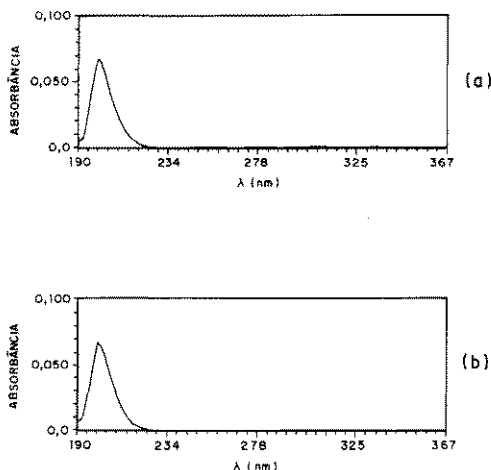


FIGURA 5

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do método por CLAE para massas com ovos

Como o método por CLAE foi estabelecido no presente trabalho, avaliou-se a sua confiabilidade.

Embora o método colorimétrico do IAL⁵ não incluísse a etapa de saponificação para massas com ovos, os testes preliminares demonstraram a importância da mesma para remoção dos

interferentes, como mostram os cromatogramas na Figura 6.

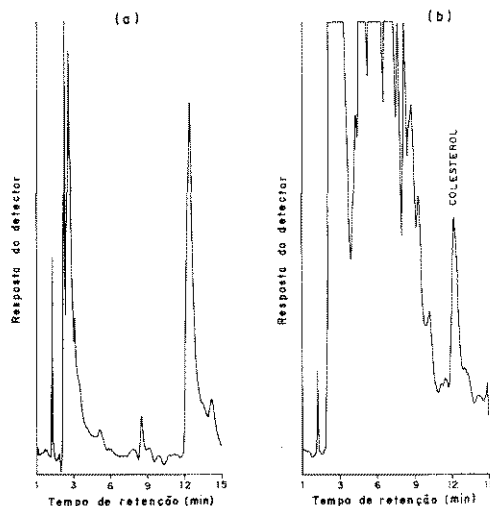


FIGURA 6

Cromatogramas de uma amostra de massa com ovos não saponificada (b) e submetida a saponificação (a). Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-1, 5 μm (150 x 4,6 mm); fase móvel, acetonitrila-metanol (50:50); fluxo, 1,2 ml/minuto; detector conjunto de diodos fixado a 205 nm.

Esta etapa, portanto, foi incluída no método por CLAE.

A recuperação do colesterol no método estabelecido foi excelente, com valores de 97-98% (Tabela 1).

TABELA 1

Recuperação do colesterol em massa com ovos pelo método por CLAE

mg DE COLESTEROL ADICIONADA	n	% RECUPERAÇÃO
0,2	2	98
0,4	2	97

n = número de determinações

A eficiência da extração foi verificada através de duas extrações consecutivas. O valor máximo obtido na segunda extração foi de 0,0159 g de colesterol por kg de massa.

Teores de colesterol em massas com ovos

Os níveis de colesterol em massas com ovos obtidos pelos três métodos, os desvios padrão e os coeficientes de variação encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2
Comparação dos teores de colesterol em massas com ovos (g/kg) obtidos por três métodos

AMOSTRAS*	COLORIMÉTRICOS				CLAE	
	IAL ⁵		Bohac <i>et alii</i> ¹		MÉDIA ± DP	%CV
	MÉDIA ± DP	%CV	MÉDIA ± DP	%CV		
1	0,39 ± 0,04	10,2	0,52 ± 0,01	1,9	0,11 ± 0,01	9,1
2	0,77 ± 0,04	5,2	0,64 ± 0,02	3,1	0,24 ± 0,00	0,0
3	0,76 ± 0,01	1,3	0,70 ± 0,01	1,4	0,18 ± 0,01	5,6
4	0,42 ± 0,03	7,1	0,44 ± 0,01	2,3	0,02 ± 0,00	0,0
5	0,48 ± 0,03	6,2	0,60 ± 0,01	1,7	0,24 ± 0,01	4,2

DP – desvio padrão

CV – coeficiente de variação

* Amostras analisadas em triplicata.

Os coeficientes de variação (%CV), médias de 6,0, 2,1 e 3,8, obtidos para os métodos de IAL⁵, do BOHAC *et alii*¹ e por CLAE, respectivamente, demonstraram uma precisão boa dos três métodos. Em relação aos teores de colesterol, uma avaliação estatística do conjunto dos dados demonstrou que os valores obtidos pelos métodos colorimétricos não diferiram entre si, mas foram significativamente maiores que os obtidos por CLAE. Estes resultados indicam a existência de substâncias interferentes nos métodos colorimétricos. A diferença entre os resultados obtidos pelos métodos colorimétricos e cromatográfico foi especialmente pronunciada com a amostra 4. CLAE acusou um valor baixíssimo, o cromatograma (Figura 7) mostrando um pico bem menor que os das demais amostras.

Pelos resultados obtidos pelo método IAL⁵, duas massas apresentaram colesterol abaixo do mínimo estabelecido. No entanto, utilizando-se o método por CLAE, todas as marcas de massa com ovos analisadas deram valores de colesterol abaixo do mínimo permitido pela legislação vigente, indicando que menos de 3 ovos foram adicionados por quilo de massa.

Considerando a discrepância nos resultados, foi preparada e analisada em triplicata por CLAE uma massa caseira com 3 ovos. A média obtida foi de 0,44 ± 0,01 g/kg, correspondendo ao valor estipulado pelas normas brasileiras, equivalente a 3 ovos adicionados na massa.

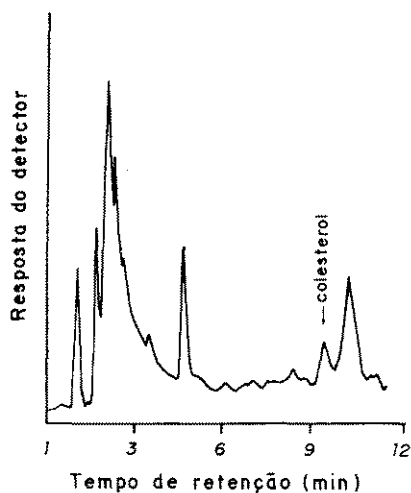


FIGURA 7

Cromatograma da amostra 4 de massa com ovos. Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-1, 5 µm (150 x 4,6 mm); fase móvel, acetonitrila-isopropanol (75:25); fluxo, 1,2 ml/minuto; detector conjunto de díodos fixado a 205 nm.

CONCLUSÃO

O método colorimétrico do IAL⁵ utilizado pelos laboratórios de fiscalização, superestimou o conteúdo de colesterol e, conseqüentemente, a quantidade de ovo nas massas. O outro método colorimétrico, de Bohac *et alii*¹, também superestimou os teores de colesterol.

É evidente, portanto, a necessidade de que a metodologia oficial seja modificada a fim de remover os interferentes antes da reação colorimétrica ou utilizar CLAE, uma técnica confiável, porém, onerosa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo suporte financeiro.

RIALA6/742

BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. - Evaluation of the cholesterol concentration as quality control parameter for egg noodles. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):21-26, 1993.

ABSTRACT: The cholesterol content has served as index of the amount of eggs in egg noodles. Resolution 12/78 of the "Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos", of the Ministry of Health (CNNPA-MS) specifies three eggs per kg of noodles, corresponding to 0.450 g of cholesterol per kg of noodles. The method used by regulatory laboratories is the colorimetric method of the Instituto Adolfo Lutz (IAL). In the present work, a comparative evaluation of two colorimetric methods, those of IAL (which utilizes acetic acid, acetic anhydride and concentrated sulfuric acid) and of Bohac *et alii* (which employs acetic acid saturated with ferrous sulfate and concentrated sulfuric acid), and a method which involves high performance liquid chromatography (HPLC), established in our laboratory, for the determination of cholesterol in egg noodles was carried out. For the latter method, a C₁₈ column, acetonitrile-isopropanol (75:25) as mobile phase and a diode array detector were used, quantitation was carried out by external standardization. The colorimetric methods overestimated the cholesterol levels, consequently, the quantity of eggs added to the noodles. The HPLC method revealed that the five samples of egg noodles analyzed contained eggs at amounts lower than the minimum stipulated by current regulation.

DESCRIPTORS: egg noodles, cholesterol, colorimetric method, quality control, HPLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOHAC, C.R.; RHEE, K.S.; CROSS, H.R. & ONO, K. - Assessment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. *J. Food Sci.*, 53(6): 1642-4, 1988.
2. BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Teores de colesterol em carnes de frango. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 28(2):122-31, 1992.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. 1, p. 11499-527. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, relativas a alimentos (e bebidas)... corrigida pelo Comunicado nº 37/80 da Divisão Nacional de Normas de Vigilância Sanitária de Alimentos.
4. HURST, W.J.; ALEO, M.D. & MARTIN Jr., R.A. - HPLC determination of the cholesterol content of egg noodles as an indicator of egg solids. *J. Agric. Food Chem.*, 33(5):820-2, 1985.
5. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, 3ª ed., São Paulo, 1985, v. 1, pg. 57-9.
6. KOVACS, M.I.P. - Determination of cholesterol in pasta products using gas-liquid chromatography. *J. Cereal Sci.*, 11: 291-7, 1990.

Recebido para publicação em 4 de dezembro de 1992.