



PARAMETROS DE CALIDAD AGROALIMENTARIA

La calidad de la fracción lipídica del huevo. Valoración de su contenido en colesterol

Por: **Cristina de Lorenzo Carretero***
y **Gregorio Vergara García***



INTRODUCCIÓN

La avicultura de puesta en España fue y continúa siendo un modelo de dinamismo y buen hacer, por su alto nivel de profesionalización y por ser, técnicamente, una de las mejor dotadas de Europa. Generadora de riqueza productiva de primer orden, de su impacto en la vida económica, dan fe, no sólo el elevado número de empleos directos que genera, sino también su incidencia en otras actividades productivas y de servicios (agricultura, transportes, industrias auxiliares, servicios veterinarios, etc.).

En España, a finales de 1.996, había más de 44 millones de ponedoras con una producción de 870 millones de docenas. Pero a pesar de que estas cifras son demostrativas de su gran importancia, el consumo de huevos en nuestro país, lo mismo que ha ocurrido en todos los países industrializados de nuestra área de desarrollo, ha experimentado un fuerte retroceso. Concretamente, en España se ha pasado de un consumo de 287 unidades/persona/año en 1987 a 215 en 1996.

¿Cuál ha sido la causa de la pérdida de consumo de uno de los alimentos más completos, de mayor riqueza culinaria y de menor coste económico? ¿Cómo ha sido esto posible en una época de consumo de alimentos de moderado aporte calórico (90 calorías metabolizables y 7 grs. de proteínas por huevo de 60 grs.) y comidas rápidas?. Independientemente de otras razones (ofer-



ta abundante de alimentos sustitutivos, por ejemplo) tres han sido las causas fundamentales: su relativamente alto contenido en colesterol (0,25 a 0,28 gr/huevo), los casos de salmonelosis, que verano tras verano aparecen en los medios de comunicación y sobre todas ellas una oleada de información de procedencia heterogénea, que ha convertido a uno de los máximos exponentes de la famosa "dieta mediterránea" en un producto con injustificada mala prensa.

Dejando de lado el tema "Salmonella" que como es sabido se transmite en la mayoría de los casos debido a falta de higiene y/o manipulación deficiente, nos centraremos en uno de los temas que nos ocupa: el colesterol.

Durante años, el huevo y su colesterol han sido tratados de manera simplista y desproporcionada, debido entre otras razones al manejo de tablas que tenían extraordinariamente sobrevalorado su contenido.

Asimismo ha perjudicado el consumo del huevo la escasa información sobre el contenido en colesterol de otros alimentos de origen animal, cuyo consumo tiene un mayor grado de consideración social, así como otros a los que la eminente endocrinóloga Dra. Clotilde Vázquez ha denominado FUENTE OCULTA, alguno de los cuales se le relaciona con el aumento de colestelolemia en niños de edad escolar.

Además de los valores citados anteriormente, hay que hacer constar que la calidad nutricional de la fracción grasa de un alimento no debe evaluarse únicamente respecto a su contenido en colesterol. De hecho, la composición de la grasa total (porcentaje de ácidos grasos saturadas, mono- y polinsaturados), así como la presencia de isómeros, tienen una muy notable influencia sobre los niveles plasmáticos de colesterol y, por tanto, sobre sus patologías relacionadas (Barroeta y Codony (1993) y referencias en el mismo).

Asimismo se ha indicado (Addis, 1990) que los productos resultantes de la oxidación de los lípidos, y concretamente los óxidos de colesterol, tienen mayor importancia en el desarrollo de estas patologías que el propio colesterol. Ello es debido a su capacidad de alterar las células endoteliales y presentar una actividad biológica específica causante de la aterogenicidad y angiotoxicidad.

Con la finalidad de mejorar la información

(*) Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (I.M.I.A.)

sobre la calidad de la fracción lipídica del huevo y, en concreto, la valoración de su contenido en colesterol, en las condiciones reales de manejo, alimentación, cuidados sanitarios, etc. en la Comunidad de Madrid, el Servicio de Investigación Agraria de la Dirección General de Agricultura y Alimenta-

sobre la calidad de la fracción grasa del huevo que se consume en la Comunidad de Madrid, en las condiciones efectivas de manejo y alimentación de las ponedoras y con vistas a su divulgación razonada. Es conocido que la clase de ácidos grasos de la dieta tiene una gran influencia sobre los nive-

trasladas al Servicio de Investigación Agraria de la Comunidad de Madrid para su análisis.

Los periodos durante los cuales se ha llevado a cabo el presente estudio se detallan a continuación en el cuadro inferior, con indicación de las fechas en las cuales se realizó la muda.

Se expresan, asimismo, las semanas de muestreo correspondientes a los periodos de antes y después de la muda, por su posible influencia en el contenido de colesterol del huevo. No se tienen referencias de estudios anteriores sobre esta posible influencia.

Una vez en el Servicio de Investigación Agraria, se obtuvo el peso de los 30 huevos de cada muestra. A continuación, se seleccionaron los huevos cuyo peso estaba comprendido entre 60-65 gramos, y, de éstos, 9 huevos fueron elegidos al azar. Cuando entre los 30 huevos no existían 9 de 60-65 gramos, se eligieron los de peso más próximo para completar la submuestra de 9 huevos.

El estudio de la fracción lipídica del huevo (colesterol y ácidos grasos) se ha realizado, por tanto, en la categoría de 60-65 gramos. El hecho de escoger un mismo rango de peso de huevos permite la comparación entre ambas naves de puesta. Además, los pesos medios de las muestras de 30 huevos (al azar) a lo largo del ciclo completo de puesta se incluyen, prácticamente, en dicha categoría (62.68 g (94-95) y 59.51 g (95-96) para huevo blanco, y 62.94 g (94-95) y 62.22 g (95-96) para huevo moreno). Se puede considerar, por tanto, que esta categoría es representativa de la producción de ambas naves, y por tanto deben asimismo serlo los estudios a ella referidos.

Una vez obtenida la submuestra de 9 huevos de 60-65 gramos, éstos se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos. Para cada huevo se determinó el peso de yema y cáscara (ésta última únicamente en el ciclo 95-96), y calculando en este caso el del albumen por diferencia con el peso total del huevo. Las tres yemas de cada grupo se homogeneizaron conjuntamente, obteniéndose de esta forma tres repeticiones independientes (por nave y por semana) para el análisis posterior. Las muestras de yema se procesaron inmediatamente (yema líquida) o se liofilizaron para su almacenamiento y análisis posterior. La liofilización ha demostrado ser un excelente procedimiento para el almacenaje de las muestras de yema. La humedad media de la yema, obtenida mediante la diferencia entre el peso fresco y el peso tras la liofilización, es de un 50%. Este valor ha sido posteriormente utilizado en el análisis del perfil de ácidos grasos para



ción, ha realizado una serie de estudios en colaboración con empresas avícolas de gran envergadura, se puede acceder a un nivel de información difícilmente alcanzable en plantas piloto o granjas experimentales.

Aunque el contenido en colesterol del huevo se encuentra fuertemente regulado, si es cierto que las modernas condiciones de manejo de las ponedoras y, especialmente, el desarrollo de metodología analítica muy precisa han permitido ofrecer cifras sobre el contenido en colesterol del huevo sensiblemente inferiores a las que se venían manejando hace unos años (valores cercanos a los 500 mg de colesterol por 100 gramos de parte comestible del huevo).

En este sentido, es preciso señalar que los métodos cromatográficos ofrecen mucha mayor fiabilidad y precisión que los basados en procedimientos colorimétricos o enzimáticos. En concreto, los métodos colorimétricos han proporcionado valores sobreestimados del contenido en colesterol del huevo.

Por otro lado, la calidad de la fracción grasa del huevo -a pesar de su contenido en colesterol- es notable, debido a su composición en ácidos grasos y a la favorable relación entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados (aproximadamente 0.73 según Codony y cols. (1.995) en: "Egg and Egg Products Quality" pp. 361-373) y a su contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ω -3 (linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico).

El objetivo de este trabajo ha sido la realización de un estudio científico, mediante el empleo de metodología analítica precisa,

les de colesterol plasmático en humanos, no estando este nivel directamente relacionado, sin embargo, con la ingesta diaria de colesterol exógeno. Asimismo, se ha señalado que los productos resultantes de la oxidación de los lípidos, y concretamente los óxidos de colesterol, tienen una gran importancia en el desarrollo de la enfermedad coronaria, al ser capaces de dañar las células endoteliales e inducir la aterogenicidad y angiotoxicidad. Por ello, los parámetros determinados en este estudio han sido: i) contenido en colesterol; ii) perfil de ácidos grasos, y iii) susceptibilidad de la grasa del huevo a la oxidación. La determinación de óxidos de colesterol en huevos almacenados o envejecidos se está llevando actualmente a cabo.

TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de huevos analizados se recogieron semanalmente en las naves objeto de estudio, a las que nos referiremos de ahora en adelante como C-6 (nave con huevo blanco, estirpe Hy Line) y N-6 (nave con huevo moreno, estirpe Isabrown). Las muestras consistían en un cartón de 30 huevos (tomados al azar) por cada nave, y fueron

Nave	Inicio	Final	Semanas Totales	Inicio muda	Final muda	Semanas muestreo (ciclo completo)	Semanas muestreo (antes de muda)	Semanas muestreo (tras muda)
C-6	Marzo 1994	Agosto 1995	74	Febrero 1995	Marzo 1995	71	42	29
C-6	Sept. 1995	Sept. 1996	49	Sept. 1996	—	49	49	—
N-6	Marzo 1994	Febrero 1995	46	Sin muda	Sin muda	46	—	—
N-6	Abril 1995	Sept. 1996	76	Marzo 1996	Mayo 1996	70	51	19



la extracción previa de la grasa (ver el apartado correspondiente de la Metodología).

METODOLOGIA ANALITICA

Contenido en Colesterol

Para la determinación del contenido en colesterol de la yema de huevo se ha puesto a punto un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que permite el análisis de cada muestra en 10 minutos.

Inicialmente se realizó una saponificación directa de la materia lipídica de la yema, sin extracción previa de la grasa. Este método reduce la manipulación de la muestra y por consiguiente el riesgo de pérdida del producto a determinar, en este caso el colesterol. Dado que el análisis en el HPLC se realizó mediante calibración con un patrón externo (colesterol, SIGMA-ALDRICH QUIMICA, S.A.), se realizaron ensayos de recuperación consistentes en la adición, a una muestra de yema cuyo contenido en colesterol era previamente conocido, de cantidades variables de colesterol comercial (5-10 µg). El contenido en colesterol de la muestra debía incrementarse en dichas cantidades. El valor medio de recuperación de colesterol así obtenido es de un 98%.

Saponificación directa

La saponificación directa de la muestra de yema líquida (400 mg) o de yema liofilizada (200 mg) se realizó mediante adición de 0.5 ml de potasa (7.14 N en H₂O) en presencia de un antioxidante fuerte (8 ml de butilhidroxianisol (BHA, 0.125% p/v) en etanol absoluto). Los tubos cerrados se incubaron durante 15 minutos a 80° C, con agitación en vórtex en los tiempos 1, 2 y 4 minutos. Posteriormente se enfriaron por inmersión en agua fría, se abrieron y adicionaron 12 ml de H₂O y 10 ml de ciclohexano. Los tubos se agitaron suavemente a fin de evitar emulsiones indeseables y se aguardó hasta la completa separación de las fases.

La fase orgánica se retiró mediante pipeta Pasteur y se reservó. El procedimiento se repitió en cada muestra con otros dos volúmenes de 10 ml de ciclohexano. Los 30 ml finales de ciclohexano contienen la materia insaponificable de la grasa, entre la que se encuentra el colesterol.

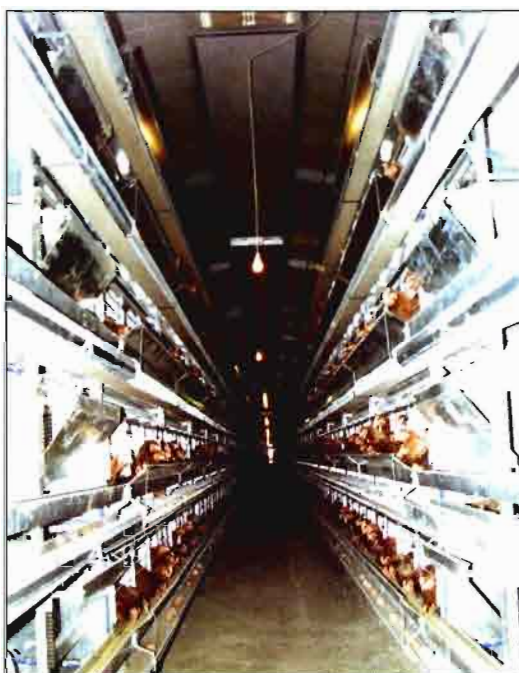
La fase orgánica (30 ml) se destinó a sequedad en un rotavapor Buchi. A continuación se adicionaron 5 ml de acetona y se repitió la destilación. El residuo se redisolvió finalmente en 5 ml de hexano calidad HPLC para su inyección al cromatógrafo.

Cromatografía líquida de alta resolución

El análisis cromatográfico por HPLC se realizó en fase normal, con una columna de

silice Spherisorb de 250 x 4,6 mm (Ø interno) y 5 µm de poro, y elución en régimen isocrático con una fase móvil hexano/isopropanol 85/15 (v/v, %), a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La detección se realiza a 210 nm. El tiempo total de carrera cromatográfica es de 10 minutos. El pico de colesterol aparece bien resuelto, con un tiempo de retención de 6.3-6.4 minutos.

Además del análisis por HPLC, algunas muestras fueron analizadas mediante cromatografía gas-líquido (GLC) en columna capilar (25 m x 0,25 mm Ø interno) de silice Spherisorb SGL-5, con inyector split/splitless a una relación 1/40 y detector de ionización de llama. Las condiciones de trabajo



fueron: inyector, 290°C; columna, 280°C; detector, 320°C. Como gas portador se utilizó hidrógeno. La adición de 5α- colestano (SIGMA) como patrón interno produjo picos reproducibles con un tiempo de retención de 6.1 minutos. El pico de colesterol apareció con un tiempo de retención de 9.8 minutos. No existieron diferencias significativas en el contenido de colesterol de las muestras analizadas por ambos métodos cromatográficos (HPLC y GLC).

Perfil de ácidos grasos

Cromatografía líquida de alta resolución

Tras la separación manual de yema y albumen, se pesaron 5.0 g de yema en un bote de centrifuga, y se homogeneizaron con un medio que contenía 5.5 ml de agua destilada salina (0,85% NaCl), 20 ml de metanol y 10 ml de cloroformo mediante un

homogeneizador Ultra Turrax y en presencia de butilhidroxianisol (BHA) como antioxidante. La relación obtenida de solventes (cloroformo: metanol: agua) fue de 1:2:0.8. Para ello se tuvo en cuenta el contenido de agua de la yema, estimado en un 50% mediante liofilización.

Tras la homogeneización se añadieron 20 ml de cloroformo y 20 ml de agua destilada salina, y se volvió a homogeneizar durante 30 segundos, obteniéndose una relación final de solventes de 2:2:1.8. Posteriormente se centrifugó en una centrifuga Heraeus a 3000 rpm durante 10 minutos.

Tras la centrifugación se separaron tres fases: la superior, de color amarillo pálido, contiene agua salina y metanol, con algunos pigmentos hidrosolubles; la fase intermedia contiene sedimentos sólidos y la inferior, de color naranja intenso, la grasa disuelta en cloroformo. De esta última fase se recogió un alícuota de 10 ml, que se filtró a través de una embudo con papel de filtro embebido previamente en una mezcla cloroformo: metanol (2:1), en presencia de BHA (antioxidante) y de sulfato sódico anhidro (deshidratante).

El alícuota se recogió en un matraz previamente tarado y se evaporaron los disolventes en un evaporador rotatorio Buchi con el baño a 40-50°C. Tras la completa evaporación se secó en corriente de nitrógeno, se pesó el matraz y se calculó la cantidad de grasa extraída. Se comprobó en todos los casos que el % de grasa extraída de la yema fuera próximo al 30%, valor proporcionado por la bibliografía sobre la composición del huevo.

Metilación

Para la formación de los ésteres metílicos de los diferentes ácidos grasos se tomaron 20-25 gotas de la grasa licuada, mediante una pipeta Pasteur, y se pasaron a un tubo de vidrio al que se añadieron 2 ml de potasa metanólica (KOH 2N en metanol) y 2 ml de hexano. La muestra se agitó suavemente durante 20-30 segundos. Tras 5 minutos (tiempo de finalización de la reacción) se observó la separación de dos fases. De la fase superior se inyectó inmediatamente 1 µl al cromatógrafo de gases. La demora en la inyección de los ésteres metílicos puede dar origen a la formación de jabones y a un error en la determinación.

Cromatografía capilar gas-líquido

La determinación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 8500, mediante una columna capilar de 25 m y 0.22 mm de diámetro interno BPX70, con espesor de película de 0.25 µm. inyector split/splitless y detector de ionización de llama (FID). Las condiciones de trabajo fueron:

- temperatura del horno: 150°C (inicial); rampa de 2°C/min durante 40 min; 230°C 5 min (final).
- tiempo total de carrera: 45 min.
- temperatura del inyector: 280°C
- relación split/splitless 1:50 (aprox.)
- temperatura del detector: 280°C
- gas portador: He
- presión gas portador: 30 psi.

La determinación de los tiempos de retención correspondientes a los principales ácidos grasos del huevo se llevó a cabo mediante inyección, por separado y en mezcla, de patrones comerciales de los ésteres metílicos de diferentes ácidos grasos (SIGMA), disueltos en hexano.

Susceptibilidad a la Oxidación (Test de TBA inducido)

La estabilidad oxidativa de la fracción lipídica de la yema de huevo se ha valorada mediante una modificación del método propuesto por Kombrust y Mavis (Lipids 16: 316-328; 1980). Las muestras de yema de huevo, liofilizada o fresca, se homogeneizaron en CIK 1.15% en relaciones p/v de 5-10%. Las muestras se incubaron a 37°C y en presencia de buffer Tris-maleato 80 mM pH 7.4, sulfato ferroso 5 mM y ácido ascórbico 2 mM, durante tiempos variables de 0 a 120 minutos. Para cada muestra se obtuvieron las curvas de incubación a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 minutos. La incubación se detuvo por inmersión en agua a 4°C e inmediatamente se añadieron 2 ml del reactivo de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,375% (p/v) en ácido clorhídrico 0.25 N y ácido tricloroacético 15% (p/v). El cromógeno de desarrolló por inmersión en agua hirviendo durante 15 minutos. Tras detener la reacción por inmersión en agua a 4°C, las muestras se centrifugaron 10 min a 10.000 rpm y se determinó la absorbancia a 532 nm del sobrenadante. La calibración se realizó mediante tetraetoxipropano (TEP, SIGMA-ALDRICH).

RESULTADOS

Contenido en Colesterol

Se adjuntan los datos semanales de las distintas variables determinadas. Para cada nave se proporcionan los siguientes datos:

Variable 1: semana de vida

Variable 2: peso medio de la muestra de 30 huevos

Variable 3: peso medio de la submuestra de 9 huevos de 60-65 gramos

Variable 4: peso medio de las 9 yemas

Variable 5: peso medio de las 9 cáscaras

Variable 6: colesterol en mg/huevo

Variable 7: colesterol en mg/g huevo

Variable 8: colesterol en mg/g yema

Variable 9: colesterol en mg/100 g de parte comestible (sin cáscara)

A continuación se adjuntan los parámetros estadísticos básicos de las diferentes variables (nº de datos, valor medio, intervalo de confianza al 95%, mediana, valores máximo y mínimo, varianza, desviación estándar y error estándar). Los errores han sido, en todos los casos, inferiores o muy próximos al 1%.

Se incluye, asimismo, la matriz de correlaciones entre las diferentes variables. Las correlaciones señaladas con un asterisco son significativas para un nivel de probabilidad de $p < 0.05$.

Todos estos análisis estadísticos se han llevado a cabo, en ambas naves y en el caso de realizarse muda forzada, para: 1) el ciclo completo (incluyendo muda); 2) para el período antes de la muda y, 3) para el de después de la muda. Se intenta discernir si la muda forzada produce algún efecto sobre el contenido de colesterol del huevo. En la siguiente tabla se facilitan los resultados de colesterol expresado en mg/huevo de 60-65 gramos para distintos momentos del ciclo de puesta en ambas estirpes de ponedoras.

Susceptibilidad a Oxidación y Enraizamiento

- La susceptibilidad al enraizamiento aumenta con la temperatura de almacenamiento de los huevos. El almacenamiento a 10°C hasta 4 meses no muestra diferencia con respecto de los huevos de puesta reciente.

- Los huevos enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados $\omega 3$ controlan la susceptibilidad a la oxidación igual que los huevos normales no enriquecidos, hasta las cuatro semanas de almacenamiento a 10°C. El incremento progresivo de almacenamiento incrementa la susceptibilidad a la oxidación de los huevos control, en tanto que los enriquecidos controlan la oxidación, probable-

mente debido al aporte extra en antioxidantes naturales (vitamina E), que se suministra en este caso a las ponedoras.

En el periodo del ciclo ANTES de la muda forzada se han elegido tres momentos: inicio, medio y final de dicho periodo, a fin de comparar los valores de colesterol en estos tres momentos del ciclo de puesta. Se ha realizado la media de las 5 semanas correspondientes a cada momento, como se indica en la tabla. Las letras minúsculas diferentes indican DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS para un nivel de probabilidad de $p < 0.05$, dentro de la misma estirpe y el mismo ciclo de puesta.

Se puede observar como el colesterol del huevo se incrementa significativamente en la mitad del ciclo (con respecto al valor del inicio de ciclo) en ambas estirpes, excepto para Isabrown 95-96. En este caso, aunque se produce este incremento, la diferencia no es significativa debido a la ocurrencia de errores estándar más altos. En la mitad del ciclo es donde se alcanzan los valores máximos de colesterol para ambas estirpes, produciéndose un ligero descenso hacia final del ciclo que no resulta significativo estadísticamente.

Si se comparan los valores medios de colesterol por huevo en el ciclo antes de la muda, tras la muda y en el ciclo completo, se observa una diferencia entre las estirpes. Las DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS, dentro de una misma estirpe, vienen en este caso indicadas por las letras mayúsculas diferentes para un nivel de probabilidad de $p < 0.05$. Así, mientras que para Hy Line blanco la muda disminuye ligeramente el colesterol del huevo, en Isabrown moreno no existen diferencias significativas. Ninguno de los valores (de antes o después de la muda) es significativamente diferente del valor medio del ciclo completo, para ambas estirpes.

Nave	C-6 (Hy Line blanco)		Ñ-6 (Isabrown moreno)	
	94-95	95-96	94-95	95-96
Inicio	Semanas 23-27 183.2 + 11.6 ^a	Semanas 24-28 156.8 + 7.3 ^a	Semanas 25-29 207.6 + 16.5 ^a	Semanas 27-31 167.4 + 9.1 ^a
Medio	Semana 41-45 225.0 + 6.8 ^b	Semanas 46-50 196.8 + 3.1 ^b	Semanas 45-49 229.2 + 11.7 ^a	Semanas 49-53 194.8 + 9.1 ^b
Final	Semanas 60-64 219.2 + 2.2 ^b	Semanas 68-72 187.6 + 3.9 ^b	Semanas 66-70 226.0 + 3.6 ^a	Semanas 73-77 210.6 + 5.8 ^b
Ciclo antes de muda	Semanas 23-64 211.6 + 3.7 ^A	Sin muda	Sin muda	Semanas 27-77 199.8 + 3.4 ^A
Ciclo tras muda	Semanas 68-96 192.8 + 2.7 ^B			Semanas 84-102 191.6 + 2.7 ^A
CICLO COMPLETO	Semanas 23-96 203.9 + 2.7 ^{AB}	Semanas 24-72 192.1 + 3.3	Semanas 25-70 214.5 + 3.4	Semanas 27-102 197.6 + 3.0 ^A