

CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE TOCOFEROLES DE LA YEMA DE HUEVO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y DEL TIPO DE ALMACENAMIENTO

Changes in the content of tocopherols in yolk according to time and type of storage

Micaela Martínez y Antonio Ramírez

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia, Apartado de Correos 4021, E-30080-Murcia, España.

RESUMEN

En este estudio se ha determinado como cambia el contenido de vitamina E (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol) y acetato de α -tocoferol de la yema de huevo durante su almacenamiento. Éste se realizó bajo dos formas distintas de conservación (temperatura ambiente a 18-23°C y refrigeración a 4°C). Los resultados obtenidos muestran que el contenido de acetato de α -tocoferol disminuye significativamente en ambos tipos de conservación ($F=7,33$; $P\leq 0,001$) durante el almacenamiento. Sin embargo, el contenido de α , $\beta+\gamma$ y δ -tocoferoles no cambia significativamente. Los niveles de α -tocoferol, δ -tocoferol y acetato de α -tocoferol fueron significativamente mayores en las yemas de los huevos refrigerados que en las de los huevos almacenados a temperatura ambiente ($F=21,70$ y $P\leq 0,001$; $F=7,27$ y $P\leq 0,01$; $F=7,90$ y $P\leq 0,01$, respectivamente). Por el contrario, el nivel de $\beta+\gamma$ -tocoferoles no presenta diferencias significativas en función del tipo de conservación.

Palabras clave: tocoferoles, huevo, almacenamiento, conservación, HPLC.

ABSTRACT

This study concerns the changes of vitamin E content (α -tocopherol, β -tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol) and α -tocopherol acetate content in yolk during storage. It was carried-out at room temperature (18-23°C) and under refrigeration conditions (4°C). Results indicate that the content of α -tocopherol acetate decreased significantly in both types of storage ($F=7,33$; $P\leq 0,001$). Nevertheless, α , $\beta+\gamma$ and δ -tocopherol content did not change significantly. α -Tocopherol, δ -tocopherol and α -tocopherol acetate content were significantly higher in refrigerated yolks than in those kept at room temperature ($F=21,70$ and $P\leq 0,001$; $F=7,27$

and $P \leq 0,01$; $F=7,90$ and $P \leq 0,01$, respectively). On the contrary $\beta + \gamma$ tocopherol content did not show significant differences due to the type of storage.

Key words: tocopherols, egg, storing, preservation, HPLC.

INTRODUCCIÓN

Los tocoferoles son vitaminas esenciales para el metabolismo de muchos animales al no ser biosintetizados por su propio organismo. Este hecho hace que su presencia en las grasas de determinadas especies animales se deba, bien a la ingestión de vegetales, bien a su adición artificial en la dieta. La fuente natural de vitamina E (dl- α -tocopherol), que se puede obtener de diversas procedencias (aceites de hígado de pescado, cereales y productos derivados, hortalizas, frutas o aceites vegetales), es una mezcla de ocho estereoisómeros, de los cuales, solamente uno es el d- α -tocopherol. Los otros siete isómeros tienen diferentes configuraciones moleculares y menor actividad biológica que el d- α -tocopherol HORWITT (1993). Sin embargo, parece ser que no hay discriminación entre las formas dl- y d- de la vitamina durante su absorción.

La vitamina E, que elimina los radicales peróxidos lipídicos, es el principal antioxidante tisular HORWITT (1986). Además, el papel antioxidante de los tocoferoles se realiza fundamentalmente a nivel de la membrana celular, protegiendo los PUFA constituyentes de los fosfolípidos de la bicapa lipídica de las células de los tejidos (animales). LEONHAROLT et al. (1996) descubrieron que el radical de la vitamina E es regenerado por la vitamina C.

Entre las principales aplicaciones terapéuticas de la vitamina E puede destacarse su uso en la retinopatía de prematuros MAJIMA

(1992); disminución del efecto del tabaco JENDRYCZKO et al. (1992); α y β -lipoproteinemias RADER y BREWER (1993); enfermedad de Parkinson PARKINSON'S STUDY GROUP (1993); prevención del adenoma de colon y recto GREENBERG et al. (1994); descenso en la incidencia del cáncer de pulmón (TAPPEL 1993; TAYLOR 1994); prevención de la aterosclerosis gracias al descenso en la oxidación de LDL JIALAL (1995) e, incluso, enlentecimiento de la progresión de la infección de VIH en el desarrollo del SIDA WANG y WATSON (1994). Algunas de las aplicaciones anteriores todavía se encuentran en fase de investigación.

El huevo es uno de los pocos alimentos de origen animal con niveles importantes de vitamina E DEL CERRO (1995). Es un hecho cotidiano que la población no consuma este producto el mismo día de la puesta, sino que lo haga varios días o semanas más tarde. Además, en muchos hogares, el huevo no siempre se almacena en refrigeración, sino que se deja a temperatura ambiente. Existen pocos estudios en la literatura especializada acerca de los cambios que experimenta el contenido en vitamina E de la yema de huevo durante el periodo de almacenamiento.

Considerando estos antecedentes, hemos investigado los cambios en el contenido de tocoferoles, en huevos que han tenido un proceso de almacenamiento de hasta cincuenta días, bajo dos formas diferentes de conservación: refrigeración y temperatura ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales, instalaciones y dieta

En la experiencia se han utilizado un total de 250 gallinas de la raza Leghorn, todas ellas de 18 meses de edad. Los animales fueron alojados en jaulas que tenían unas dimensiones de 50x45x45 cm, y que se encontraban dispuestas en sistema california clásico de dos pisos, con una capacidad de cuatro gallinas por jaula. Las gallinas fueron alimentadas *ad libitum* durante todo el periodo de puesta. La dieta estuvo constituida por granos de cereales, productos y subproductos de semillas de leguminosas, semillas oleaginosas, productos y subproductos de granos de cereales, aceites y grasa animal, minerales y metionina líquida, todos ellos mezclados. Se añadió al pienso vitamina A (9000 UI/ Kg), vitamina D₃ (2.600 UI/Kg) y acetato de α -tocopherol (4,5 mg/Kg). La dieta presentaba un 16,5% de proteína bruta, 2.742 Kcal de energía metabolizable/Kg. de pienso y un 3,6% de calcio.

Toma de muestras

Para la realización del estudio se recogieron 250 huevos de entre 53 y 63 g, todos ellos puestos el mismo día. A continuación, los huevos se llevaron al laboratorio y una mitad fue almacenada en oscuridad y a temperatura ambiente (18-23°C) y la otra mitad en oscuridad y refrigeración (4°C). Para realizar las muestras se utilizaron ocho huevos, cogidos al azar, los días 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50, para cada tipo de conservación, y se analizó el contenido de α , β , γ , δ -tocopherol y acetato de α -tocopherol. En total se analizaron 144 hue-

vos (72 almacenados a temperatura ambiente y 72 en refrigeración).

Procesado de la muestra

Para el análisis del contenido de tocoferoles, se siguió el procedimiento de extracción de BLIGH y DYER (1959). En primer lugar, se llevó a cabo la separación de la yema de la clara del huevo, para lo cual, se utilizaron placas de petri a modo de soporte para las yemas de huevo. Una vez eliminada toda la clara, se cogieron 0,25 g de yema de cada huevo (n= 8) y se pusieron en tubos de ensayo individuales de 20 mL. A los tubos se les añadió 5 mL de cloroformo-metanol (2:1, vol/vol) y la mezcla se homogeneizó mecánicamente durante 10 minutos. Este proceso se realizó en atmósfera de nitrógeno y en ausencia de luz para evitar procesos de oxidación lipídica. A continuación, las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 2.300 rpm. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -18°C, en atmósfera de nitrógeno y en ausencia de luz. Este proceso se realizó por triplicado, reuniéndose en un tubo final los tres sobrenadantes obtenidos. El sobrenadante final fue desecado con nitrógeno y resuspendido en 2 mL de metanol. Los extractos metanólicos fueron filtrados a través de una membrana de 0,5 mm FHLPO 1300 Millipore.

Sistema de HPLC

Los análisis de cromatografía líquida se realizaron usando un cromatógrafo líquido de alta presión Beckman de doble bomba, con una válvula de inyección de 20 mL, un detector ultravioleta de longitud de onda variable (Module 163) fijado a 294 nm, la longitud de onda

de máxima absorción para los tocoferoles, y un Módulo de Control 421 A. La columna analítica fue una Tracer RN5512 Spherisorb ODS C18 de fase reversa (25 x 0,4 cm, 5mm), unida a una precolumna TR-000818 rellena con el mismo material que la anterior. La cromatografía se llevó a cabo isocráticamente a temperatura ambiente, con una fase móvil de metanol:agua (95:5 v/v) y a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min HUANG et al. (1986). La sensibilidad del detector fue de 0,05 aufs. Se utilizó un integrador Spectra-Physics 4290 para la determinación de las curvas de calibración y para el cálculo de las cantidades de tocoferol en las muestras de yema de huevo.

Reactivos y patrones

Todos los reactivos químicos utilizados fueron del mejor grado de pureza comercialmente disponible. Metanol, agua y acetato de etilo fueron de calidad HPLC. Todos los eluyentes fueron desgasificados mediante sonicación durante 30 segundos. Los estándares de α , β , γ , δ -tocoferol y acetato de α -tocoferol se obtuvieron de ampollas selladas. Todos los productos químicos fueron de E. Merck, Darmstadt, Germany.

Los patrones (α , β , γ , δ -tocoferol y acetato de α -tocoferol) se prepararon en matraces aforados, disolviendo 25 mg de cada producto en 25 mL de metanol. La mezcla fue almacenada en oscuridad y frío hasta su análisis. De esta manera, se obtuvieron soluciones patrón de 1.000 ppm para cada tocoferol, que fueron almacenadas a -35°C y en ausencia de luz. Las soluciones de trabajo fueron de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ppm con el fin de obtener, a partir de ellas, las rectas de calibrado para cada uno de los tocoferoles. Todas ellas se prepararon diluyendo la solución inicial de 1.000 ppm.

Finalmente, las ecuaciones de regresión lineal y los coeficientes de correlación, para cada uno de los tocoferoles, se obtuvieron a partir de la representación de las áreas de los picos obtenidos frente a las diferentes concentraciones de cada tocoferol:

$$\alpha\text{-tocoferol: } y = 1610,4 x - 1474,9$$

$$r = 0,994 \quad R^2 = 98,81 \%$$

$$\beta\text{-tocoferol: } y = 1750 x - 402,2$$

$$r = 0,995 \quad R^2 = 99,13 \%$$

$$\gamma\text{-tocoferol: } y = 1817,5 x - 1455,9$$

$$r = 0,992 \quad R^2 = 98,42 \%$$

$$\delta\text{-tocoferol: } y = 2088,3 x - 732,1$$

$$r = 0,991 \quad R^2 = 98,39 \%$$

Acetato de α -tocoferol:

$$y = 291,4 x - 453,1$$

$$r = 0,98 \quad R^2 = 97,76 \%$$

Donde: x es la concentración de patrón preparado en ppm, e y es el área del pico obtenido en las condiciones de la técnica.

Debido a que β y γ -tocoferoles coeluyen en condiciones cromatográficas de fase reversa HUANG et al. (1986), hemos calculado una nueva recta que se corresponde con los datos obtenidos de ambas. Con esta nueva recta podremos cuantificar de una manera más exacta el contenido de estos dos isómeros en la yema de huevo. La recta de calibrado obtenida ha sido la siguiente:

$$\beta+\gamma\text{-tocoferol: } y = 1782,9 x - 839,3$$

$$r = 0,99 \quad R^2 = 98,64 \%$$

La sensibilidad de detección, usando una doble señal del nivel de ruido WILLIAMS (1985), fue de 2 $\mu\text{g/mL}$.

Identificación de los picos

Los picos fueron identificados al coincidir con los tiempos de retención de los

estándares conocidos. Sin embargo, debido a la proximidad de otras sustancias con tiempos de retenciones parecidos, realizamos una confirmación tocoferol a tocoferol, adicionando

cada uno de los patrones por separado a una muestra de huevo. La secuencia de inyecciones fue la siguiente:

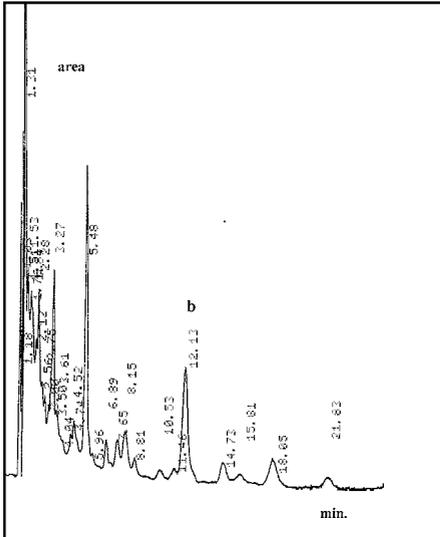


Figura 1.- Cromatograma de una muestra de huevo + β -tocopherol (b).

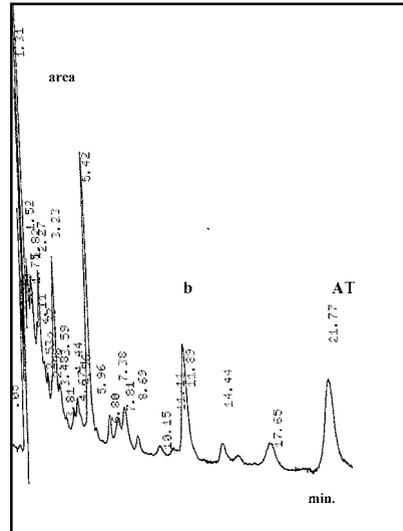


Figura 2.- Cromatograma de una muestra de huevo + β -tocopherol (b) + acetato de α -tocopherol (AT).

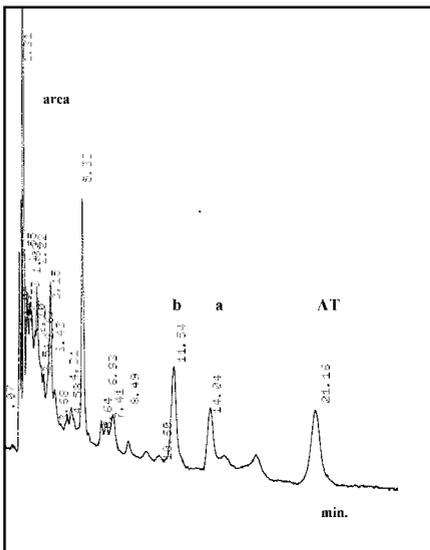


Figura 3.- Cromatograma de una muestra de huevo + β -tocopherol (b) + acetato (AT) de α -tocopherol + α -tocopherol.

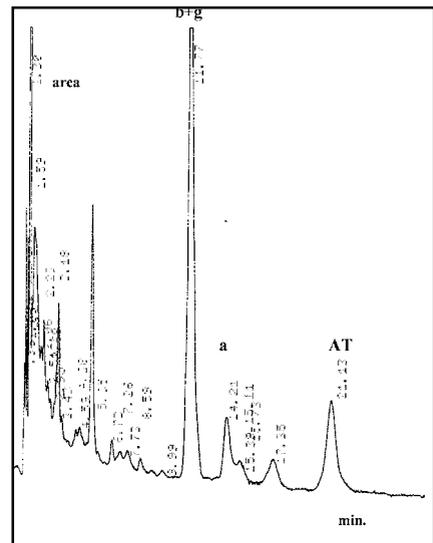


Figura 4.- Cromatograma de una muestra de huevo + β -tocopherol + acetato (AT) de α -tocopherol + α -tocopherol + γ -tocopherol.

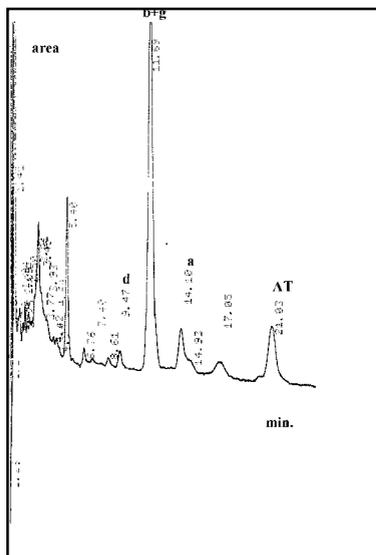
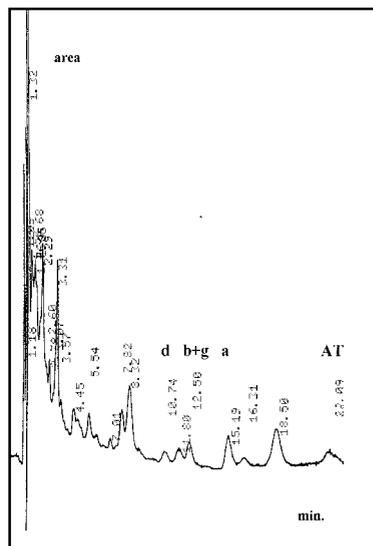


Figura 5.- Cromatograma de una muestra de huevo + β -tocopherol + acetato (AT) de α -tocopherol + α -tocopherol + γ -tocopherol + δ -tocopherol.

De la secuencia de cromatogramas realizada se deduce que el orden de elución de los tocoferoles es el siguiente: δ -tocopherol, β + γ -tocopheroles, α -tocopherol y acetato de α -tocopherol, lo que está de acuerdo con su estructura química (polaridad) en cromatografía de fase reversa.

Análisis estadístico

Se ha utilizado un ANOVA de dos vías para analizar los efectos del tipo de almacenamiento y tiempo de almacenamiento sobre el contenido de tocoferoles en la yema de huevo. Antes de realizar el ANOVA se hicieron tests de homogeneidad de varianza para confirmar la homogeneidad de los resultados. Los cálculos se realizaron mediante los modelos lineales generales del SAS Institute, Inc. (1985).



Cuadro 1.- Evolución del contenido de tocoferoles (mg/g de yema de huevo) durante el almacenamiento del huevo.

		Tocoferoles						
Días	α-tocoferol		β-γ-tocoferoles		δ-tocoferol		acetato de α-tocoferol	
	T.Ambiente	Refrigeración	T.Ambiente	Refrigeración	T.Ambiente	Refrigeración	T.Ambiente	Refrigeración
0	19,92±0,20a	21,66±0,42ab	13,12±0,15a	14,56±0,23a	2,88±0,10a	3,60±0,10a	58,96±0,55c	58,08±0,35cd
5	20,48±0,16a	20,96±0,08ab	14,24±0,14a	13,20±0,13a	2,88±0,51a	4,08±0,10a	59,76±0,54c	63,04±0,34d
10	19,72±0,82a	21,04±0,19ab	12,16±0,12a	12,72±0,10a	2,24±0,51a	4,40±0,10a	50,88±0,46bc	55,52±0,33bcd
15	20,00±0,25a	23,84±0,11b	12,48±0,10a	15,28±0,10a	2,56±0,51a	4,40±0,10a	52,48±0,52bc	55,04±0,22abcd
20	19,12±0,25a	23,60±0,14b	12,16±0,09a	13,28±0,12a	2,64±0,51a	3,52±0,10a	48,48±0,48bc	58,16±0,25cd
25	19,44±0,14a	22,80±0,15ab	14,24±0,10 ^a	13,28±0,13a	3,36±0,51a	3,52±0,10a	52,16±0,35bc	53,36±0,20abc
30	17,92±0,12a	20,72±0,16ab	12,96±0,15a	13,52±0,10a	2,96±0,51a	3,20±0,10a	54,40±0,74bc	56,08±0,56bcd
40	16,96±0,18a	22,40±0,12ab	13,12±0,16a	15,44±0,04a	3,44±0,51a	3,76±0,10a	46,72±0,35b	48,32±0,33ab
50	16,88±0,16a	19,12±0,10a	12,32±0,16a	15,44±0,04a	1,76±0,51a	2,88±0,10a	26,24±0,64a	46,88±0,54a
F	1,2	0,96	0,61	0,94	0,42	0,56	5,49	2,85
Significancia	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	***	**

Diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas entre los diferentes días de almacenamiento para cada tocoferol. ***: P<0,001; **: P<0,01; N.S.: no significancia.

acetato de α -tocoferol durante el almacenamiento de la yema de huevo, tanto a temperatura ambiente ($F= 5,49$; $P\leq 0,001$) como en refrigeración ($F= 2,85$; $P\leq 0,01$). Hemos de destacar que existe un mayor descenso de acetato de α -tocoferol en los huevos almacenados a temperatura ambiente, que se produce de una manera acusada a partir del día 40 de almacenamiento.

En el cuadro 2 se muestran las medias aritméticas de cada tocoferol en función del tipo de conservación (huevos almacenados a temperatura ambiente y en refrigeración). El análisis estadístico realizado indica que las cantidades de α -tocoferol ($F=21,70$; $P\leq 0,001$), δ -tocoferol ($F=7,27$; $P\leq 0,01$) y acetato de α -tocoferol ($F=7,90$; $P\leq 0,01$) han sido mayores en aquellos huevos que fueron conservados en frío. Por el contrario, la cantidad de $\beta+\gamma$ -tocoferol no difiere significativamente en los huevos almacenados a temperatura ambiente y en refrigeración.

El análisis bifactorial realizado no indica que haya interacción entre los dos factores de estudio (días de almacenamiento y tipo de almacenamiento) en ninguno de los tocoferoles.

DISCUSIÓN

En primer lugar, hemos de señalar que la existencia en la yema de huevo de mayores concentraciones de acetato de α -tocoferol que del resto de tocoferoles es totalmente lógico, ya que se ha añadido en la dieta.

Los cambios observados en el contenido de los distintos tocoferoles en los diferentes días de almacenamiento pensamos que pueden ser debidos a diferencias individuales, ya que todos los huevos fueron obtenidos el mismo día de gallinas de la misma raza y estirpe, que habían permanecido en idénticas condiciones de manejo.

En relación con el contenido en los distintos tocoferoles el día 0 (cuadro 1) resulta llamativo que haya diferencias tan grandes para todos, entre la columna de T. Ambiente y Refrigeración, ya que en este momento todavía el efecto de la temperatura de almacenamiento no puede acusarse. Este resultado lo que probablemente indica es una variabilidad natural de estos compuestos.

Los resultados obtenidos por CHERIAN et al. (1996), en un estudio realizado para co-

Cuadro 2.- Contenido de tocoferoles (mg/g de yema de huevo) según el tipo de conservación.

Tipo de conservación	Tocoferoles			
	α -tocoferol	$\beta+\gamma$ -tocoferoles	δ -tocoferol	acetato de α -tocoferol
Tª ambiente (n= 72)	18,56 \pm 0,48a	12,62 \pm 0,33a	2,80 \pm 0,24a	50,00 \pm 1,20a
Refrigeración (n= 72)	21,76 \pm 0,48b	13,68 \pm 0,33a	3,68 \pm 0,24b	54,88 \pm 1,20b
F	21,70	2,49	7,27	7,90
Significance	***	N.S.	**	**

***: $P\leq 0,001$; **: $P\leq 0,01$; N.S.: no significancia.

Cada resultado corresponde a la media aritmética, para cada tocoferol, de todos los huevos analizados.

nocer los cambios en el contenido de tocoferoles en huevos almacenados procedentes de gallinas alimentadas con distintas dietas, coinciden con los nuestros en que no existe variación del contenido de α y γ -tocopherol durante el almacenamiento del huevo. Al igual que en nuestro estudio, estos autores sí observaron un descenso significativo de δ -tocopherol a partir del día 40 de almacenamiento, día a partir del cual también observamos nosotros una disminución en el contenido de acetato de α -tocopherol. Hemos de señalar que CHERIAN y col. no determinaron este compuesto.

De los resultados obtenidos, extraemos dos conclusiones que podrían ser de interés al conocimiento científico y de aplicación directa en la conservación "nutritiva" de los huevos. En primer lugar, pensamos que la cáscara del huevo es una barrera protectora muy eficaz a la hora de conservar los nutrientes de este alimento y, más concretamente, la vitamina E. En segundo lugar, creemos que los propios ácidos grasos de la yema protegerían a la vitamina, y ésta, a su vez, evitaría la oxidación de dichos ácidos grasos. No obstante, para evitar una pérdida parcial de esta vitamina, sí creemos conveniente mantener los huevos en refrigeración.

BIBLIOGRAFÍA

- BLIGH E.G., DYER W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- CHERIAN G., WOLFE F.H., SIM J.S. 1996. Feeding dietary oils with tocopherols: Effects on internal qualities of eggs during storage. *J. of Food Sci.*, 61(1):15-18.
- DEL CERRO I. 1995. Estudio bromatológico de huevos sometidos a distintas condiciones de procesado. Tesina de Licenciatura, Universidad de Murcia.
- GREENBERG E.R., BARON J.A., TOSTESON T.D., FREEMAN D.H., BECK G.J., BOND J.H., COLACCHIO T.A., COLLER J.A., FRANKI H.D., HAILE R.W., MANDEL J.S., NIEREMBERG D.W., ROTHSTEIN D.C., STEVENS M.M., SUMMER R.W., VAN STOLK R.U. 1994. A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. *N. Engl. J. Med.* 331: 141-147.
- HORWITT M.K. 1986. Interpretations of requirements for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Tryptophan and Vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B6. *Am. J. Clin. Nutr.* 44: 973-985.
- HORWITT M.K. 1993. Natural-source and synthetic vitamin E compared. *Veris, Lagrange, Illinois. U.S.A.*
- HUANG M., BURCKART G.J., VENKETARAMANAN R. 1986. Sensitive high-performance liquid chromatographic analysis of plasma vitamin E and vitamin A using amperometric and ultraviolet detection. *J. of Chromatography*, 380: 331-338.
- JENDRYCZKO A., DROZDZ M., WOJCIK A. 1992. Retinol, carotenoids and tocopherols in relation to malonaldehyde in serums of women with breast cancer. *Rev Roum Biochim* 29:13-17.
- LEONHARDT M., GEBERT S., WENK C. 1996. Stability of α -Tocopherol, Thiamin, Riboflavin and Retinol in pork muscle and liver during heating as affected by dietary supplementation. *J. Food Sci* 61: 1048-1051.

- MAJIMA A. 1992. Retinopathy of prematurity and lipid peroxide. *Kassei Sanso, Furi Rajikaru* 3: 435-443.
- MURCIA M.A., MARTÍNEZ-TOMÉ M., DEL CERRO I., SOTILLO F., RAMÍREZ A. 1999. Proximate composition and vitamin E levels in egg yolk: losses by cooking in a microwave oven. *J. Sci Food Agric* 79:1550-1556.
- PARKINSON STUDY GROUP 1993. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 328: 176-183.
- RADER D.J., BREWER H.B. Jr. 1993. Abetalipoproteinemia. New insights into lipoprotein assembly and vitamin E metabolism from a rare genetic disease. *J. Am. Med. Assoc* 270: 865-869.
- SAS Institute, Inc. 1985. *User's Guide: Statistics*. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- TAPPEL A.L. 1993. Combinations of vitamin E and other antioxygenic nutrients in protection of tissues. *Vitamin E in health and disease*. Ed. Parcker L., Ruchs T.; Deckker, M.
- TAYLOR P. 1994. Effects of nutrition intervention on intermediate endpoints in esophageal carcinogenesis. Second international conference on antioxidant vitamins and beta-carotene in disease prevention.
- WANG Y.J., WATSON R.R. 1994. Ethanol, Immune Responses and Murine AIDS-The Role of vitamin E as an immunostimulant and antioxidant. *Alcohol* 11 (2): 75-84.
- WILLIAMS A.T.R. 1985. Simultaneous determination of serum vitamin A and E by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 341: 198-201.