

AVALIAÇÃO DOS TEORES DE CAROTENOIDES TOTAIS EM OVOS DE GALINHAS POEDEIRAS ALIMENTADAS COM *Bixa orellana* L.

JANAÍNA S. MARTINS¹; MURILO P. MARTINS²; MARTA G. da SILVA³; PAULO R. de CARVALHO⁴; PAULO R. N. CARVALHO⁵; ENIELUCE S. B. PARRA⁶

Nº 11212

Resumo

Foram adicionadas sementes trituradas de urucum com concentrações entre 0% e 1,8% em dietas de poedeiras, que proporcionou um aumento linear na coloração das gemas, com teores de carotenoides entre 0,23 e 1,04 mg 100g⁻¹. O método validado para avaliar os teores de carotenoides apresentou-se seletivo, com boa precisão e exatidão, e incerteza expandida (K=2) de 9%.

Abstract

Ground annatto seeds were added with concentrations between 0% and 1.8% in diets of laying hens, which provided a linear increase in the color of egg yolks, with levels of carotenoids between 0.23 and 1.04 mg 100g⁻¹. The validated method presented is selective in terms of analysis, had a good precision and accuracy, and it had the expanded uncertainty (K=2) of 9%.

Introdução

O ovo é considerado um alimento de alto valor nutricional, completo¹, com preço acessível, e mundialmente consumido. Em 2005, o Brasil ocupava o 7º lugar mundial como produtor de ovos e a 68ª posição quanto ao consumo *per capita*², sendo que 72,8% das aves alojadas para postura são de linhagens produtoras de ovos brancos, e o estado de São Paulo participa da produção nacional com 31%³. A pigmentação das gemas é fornecida pelo milho amarelo, fonte de xantofilas zeaxantina e luteína, derivados oxigenados dos carotenos^{4, 5}, e substituições do milho por outras fontes energéticas pode resultar em gemas com coloração que não atende as expectativas dos consumidores.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia Química, UNICAMP, Campinas-SP, janainamartins93@hotmail.com

² Bolsista CNPq: Graduação Química, UNICAMP, Campinas-SP

³ Orientadora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP

⁴ Colaborador: Pesquisador, APTA, Bauru-SP

⁵ Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP

⁶ Colaborador: Assistente Técnico a Pesquisa, CCQA/ITAL, Campinas-SP

A semente de urucum é recoberta por uma camada denominada arilo, onde 30% dos seus constituintes é o apocarotenoide bixina⁶, responsável pela cor vermelha característica do urucum, e representa cerca de 80%⁷ dos carotenoides presentes. Segundo Carvalho *et al.*⁸ a produção de semente de urucum no Brasil foi estimada em 9.000 T/ano e a produção mundial chegou a 14.000 T/ano. Do montante de sementes produzidas no Brasil, 25% das sementes são destinadas à produção de corantes lipossolúveis e hidrossolúveis e os 75% restantes à fabricação de colorífico que é destinado ao mercado interno.

O estudo acompanhou a estocagem do pigmento em gemas de poedeiras, alimentadas com ração adicionada de sementes integrais trituradas de urucum, através da avaliação do teor de carotenóides expressos como bixina por espectrofotometria, considerando-se que este é o principal carotenoide do urucum.

Material e Métodos

Amostra

O estudo foi desenvolvido no Biotério experimental de aves do Laboratório Animal de Bauru. Poedeiras da linhagem Hisex White, arrançadas em delineamento experimental inteiramente casualizado, com oito tratamentos e três repetições de oito aves, sendo que a dieta com milho branco e soja foi suplementada com semente integral moída de urucum (SIMU) com níveis de 0%, 0,45%, 0,90%, 1,35% e 1,80%. Em dietas com milho amarelo e soja foram adicionados SIMU com concentrações de 0,45%, 0,90% e 1,35%. A semente de urucum utilizada no estudo apresentava um teor de carotenóides expressos como bixina de $3,12 \pm 0,05 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, determinado segundo da Silva⁹.

Método analítico

Para a análise de carotenoides foi pesado entre 0,5 e 1,3 g de amostra, de acordo com a coloração das gemas, em frasco para centrífuga. Foram adicionados 1 mL de etanol 95% e 2 mL de solução tampão fosfato (137mM de NaCl, 2,7 mM KCl, 7,3 mM de Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,2), e homogeneizado em agitador de tubos cerca de um minuto. A extração foi realizada, de forma seqüencial, com 5 mL da solução de acetato de etila:acetonitrila (9:1, v/v), em tubo de centrífuga e banho ultra som por cerca de 3 minutos, até o sobrenadante ficasse incolor. O extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio e diluído em éter de petróleo. A quantificação foi em espectrofotômetro, marca Varian, modelo Cary 50, com comprimento de onda de 456 nm e coeficiente de absorção de 4.200. Todos os ensaios foram realizados em

triplicata analítica e os resultados obtidos foram avaliados pela análise de variância, utilizando-se o teste da Diferença Mínima Significativa (D.M.S.) de Tukey, considerando-se um nível de confiabilidade de 95%.

Validação

A seletividade foi avaliada pelas médias das respostas do analito em amostras com a matriz gema colorida e com a matriz gema sem coloração (0% SIMU), respectivamente, com faixa semelhante de concentrações. O efeito da matriz foi avaliado, estatisticamente, com o teste *t-student*¹⁰, equação 1 e 2.

$$t = \frac{|\overline{X1} - \overline{X2}|}{\sqrt{s^2(1/n1 + 1/n2)}} \quad (1) \quad s^2 = \frac{[(n1-1)s^2_1 + (n2-1)s^2_2]}{(n1 + n2 - 1)} \quad (2)$$

Onde: $\overline{X1}$ e $\overline{X2}$, média da resposta do analito em amostras com a matriz gema colorida e com a matriz gema incolor, respectivamente, sendo ambas adicionadas do analito; s_1 e s_2 , estimativas de desvio-padrão da resposta do analito; n_1 e n_2 , tamanhos das amostras 1 e 2.

Avaliou-se a sensibilidade com a construção da curva analítica composta pelos carotenoides com concentrações entre 0,84 e 2,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluídos em éter de petróleo. As estimativas de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidas com curvas analíticas suplementares com três concentrações inferiores a primeira concentração do analito na curva analítica. A avaliação do LD e LQ foi com a aplicação das Equações 3 e 4^{11, 12}, respectivamente.

$$\text{Limite de detecção} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (3) \quad \text{Limite de quantificação} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

Onde: Y_{bl} , estimativa da resposta do branco (coeficiente linear obtido na equação da curva concentração área⁻¹); S_{bl} , estimativa de desvio do padrão do branco (coeficiente linear obtido na equação da curva concentração s⁻¹); b , coeficiente angular da curva analítica.

A precisão do sistema foi obtida com dez leituras consecutivas do padrão e o coeficiente de variação foi comparado com o valor encontrado no teste de precisão do método. A precisão do método foi avaliada com nove repetições analíticas de uma amostra de gema. De acordo com a Equação 4 de Horwitz¹³, para a precisão ser considerada adequada o coeficiente de variação encontrado precisa ser menor que o máximo permitido.

$$CV(\%) = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (5)$$

Onde: C , concentração estudada expressa como potência de 10 (ex. 1mg 1000g⁻¹ (ppm) = 10⁻⁶, $CV = 2^4 = 16\%$).

A exatidão do método foi avaliada pela recuperação, em triplicata, do analito adicionado na amostra e na gema incolor (T1) em dois níveis de concentração, e a exatidão determinada estatisticamente^{11, 12} pela Equação 6.

$$t_{cal} = \frac{|X - \bar{X}|}{s} \sqrt{n} \quad (6)$$

Onde: t_{cal} , t -student calculado; X , corresponde a 100%; \bar{X} , recuperação média; s , estimativa de desvio padrão das recuperações; n , número de medidas.

As fontes de incertezas foram determinadas pelo diagrama de causa e efeito¹⁴, onde estão relacionadas as principais fontes de incertezas associadas a cada etapa analítica. Na determinação por espectrofotometria o resultado, concentração de carotenoides em $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$, foi fornecida pela Equação 7, e a incerteza combinada foi fornecida pela raiz quadrada da soma das incertezas ao quadrado, Equação 8.

$$C_{car} = \left(\left(\frac{Abs_{am}}{CoefAbs} \right) / \left(\frac{M_{am}}{Dil_{am}} \right) \right) * 1000 \quad (7) \quad \mu C_{car} = C_{car} \sqrt{\left(\frac{\mu Abs_{am}}{Abs_{am}} \right)^2 + \left(\frac{\mu CoefAbs}{CoefAbs} \right)^2 + \left(\frac{\mu M_{am}}{M_{am}} \right)^2 + \left(\frac{\mu Dil_{am}}{Dil_{am}} \right)^2} \quad (8)$$

Onde: C_{car} concentração de carotenoide na amostra; Abs_{am} , Absorbância da amostra; $CoefAbs$, Coeficiente de Absorção; M_{am} , massa da amostra; Dil_{am} , diluição da amostra.

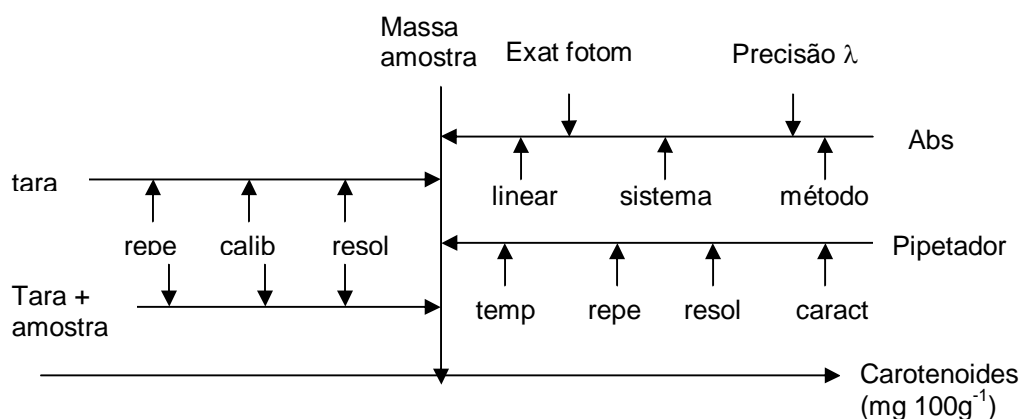


Figura 4: Diagrama de causa e efeito com os dados utilizados no cálculo de incerteza na determinação por espectrofotometria de carotenoides em gema de ovos. linear = linearidade, calib = calibração; repe = repetitividade, caract = característica; temp = temperatura; resol = resolução, exat fotom = exatidão fotométrica, precisão λ = precisão do comprimento de onda.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão apresentados os dados utilizados para calcular o efeito da matriz na avaliação da seletividade. Os valores t calculados foram comparados com o valor tabelado (t -student) com $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade para uma probabilidade de 95% (t tabelado _(95; 4) igual a 2,78)¹⁵. O valor t calculado foi 0,61, que indica seletividade adequada do método para a matriz.

Tabela 1: Valores utilizados na avaliação da seletividade, efeito da matriz.

Carotenoides ^a	Carotenoides ^b
n1 = 3	n2 = 3

$\bar{X}1 = 0,24$	$\bar{X}2 = 0,22$
$s1 = 0,03$	$s2 = 0,03$

^a, amostra com a matriz gema de ovos colorida, com adição de carotenoides; ^b, amostra com a matriz gema de ovos incolor, com adição de carotenoides; $n1$ e $n2$, tamanho das amostras 1 e 2; $\bar{X}1$ e $\bar{X}2$, médias da resposta do analito; $s1$ e $s2$, estimativas de desvio-padrão da resposta do analito.

A linearidade apresentou coeficiente de correlação igual a 1,0000, considerado uma correlação perfeita para a faixa avaliada¹¹. Para a determinação dos limites de detecção e quantificação considerou-se a diluição de 0,8 g de gemas em 5 mL. O limite de detecção calculado para carotenoides foi $21 \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ e para quantificação foi $70 \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$. As regressões obtidas nas curvas estão na Tabela 2.

Tabela 2: Dados obtidos na curva analítica e nas curvas utilizadas no LD e LQ para Carotenóides

Analito	Dados	Curva analítica ($\mu\text{g Abs}^{-1}$)	Curva LD e LQ ($\mu\text{g Abs}^{-1}$)	Curva LD e LQ ($\mu\text{g s}^{-1}$)
Carotenoides	Coeficiente angular	0,42	0,42	-0,0113
	Coeficiente linear	-	-	0,0082
	Correlação linear (r^2)	1,0000	1,0000	0,8229

Abs = Absorbância; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação; s = estimativa de desvio padrão.

Nos testes de precisão do sistema e método, os coeficientes de variação encontrados foram 0,44% e 8% (Tabela 3), menores que os valores obtidos pela equação de Horwitz, portanto, o sistema e o método apresentaram precisão adequada.

Tabela 3: Valores encontrados na precisão do sistema e do método.

Dados	Precisão do sistema	Precisão do método
Valor médio	0,6818	0,81
s	0,0030	0,06
CV (%)	0,44	8
CV Max (%)	12	

n , número de replicatas; s , estimativa de desvio padrão; CV, coeficiente de variação; CV Max, coeficiente de variação obtido pela equação de Horwitz.

Para a exatidão, os teores médios obtidos estão na Tabela 4. Os valores calculados de t foram 3,28 para gema incolor e 3,88 para gema colorida, respectivamente. Esses valores foram comparados com o valor t -student tabelado com $n-1$ graus de liberdade para uma probabilidade de 95% (t tabelado $_{(95, 5)}$ igual a 2,57)¹⁵. Os resultados indicaram que o método apresentou exatidão adequada com 95% de confiança.

A incerteza combinada para carotenoides, para uma concentração de $\text{mg } 0,86 \text{ } 100\text{g}^{-1}$, foi de $4 \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ e a incerteza expandida foi de $8 \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$, utilizando-se um fator de abrangência K igual a 2, que corresponde a uma incerteza expandida de 9%

da concentração estudada. Na determinação dos carotenóides por espectrofotometria, o pipetador contribuiu com 80% da incerteza total (Figura 5), fato também observado por Alves e colaboradores¹⁶.

Os teores de carotenoides encontrados nas gemas avaliadas estão apresentados na Tabela 11. Os tratamentos com milho branco e adições de 0,45, 0,90, 1,35 e 1,80% de SIMU e os tratamentos com milho amarelo e adições de 0,45, 0,90 e 1,35% de SIMU, apresentaram variações nos teores de carotenoides nos períodos mostrados, mas com tendência a teores maiores de carotenoides com o aumento da adição de SIMU na dieta das poedeiras, conforme relatos anteriores^{17, 18, 19, 20}.

Tabela 4: Valores utilizados na avaliação da exatidão para determinação de carotenoides.

Dados	Carotenoides											
	Gema colorida						Gema incolor					
Adicionado	0,17			0,22			0,15			0,23		
Recuperado	0,17	0,15	0,15	0,25	0,25	0,21	0,14	0,15	0,15	0,21	0,20	0,25
Média	0,16			0,24			0,15			0,22		
s	0,01			0,03			0,01			0,03		
CV (%)	9			10			3			12		
Rec. (%)	108			14			96			99		
Rec.média	109						97					
s	1						2					
CV (%)	1						2					

s = estimativa de desvio padrão; CV = coeficiente de variação; Rec. = recuperação.

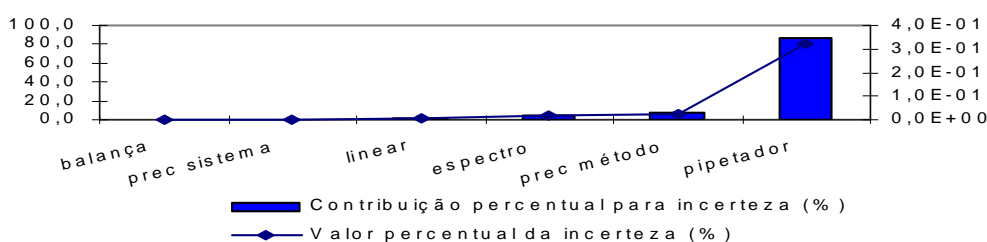


Figura 5: Contribuição percentual de cada incerteza na determinação de carotenóide.

Conclusão

A adição de semente integral triturada na ração de poedeiras proporcionou um aumento linear na coloração das gemas, com teores de carotenoides semelhantes no início e final do estudo, sendo as alterações nos períodos provavelmente devido ao metabolismo diferente de cada ave. O método utilizado para avaliação dos carotenos apresentou uma incerteza expandida de 9%.

Tabela 10: Média e estimativa de desvio padrão dos valores encontrados na avaliação de carotenoides em gemas nos períodos e tratamentos avaliados.

Tempo (dias)	Carotenoides totais expressos como bixina (mg 100g ⁻¹)							
	Tratamentos (% sementes integral de urucum moída)							
	Milho branco					Milho amarelo		
	0%	0,45%	0,90%	1,35%	1,80%	0,45%	0,90%	1,35%
7	0,33 ^a ± 0,06	0,34 ^{ab} ± 0,08	0,46 ^a ± 0,06	0,43 ^a ± 0,07	0,44 ^a ± 0,03	0,61 ^{abc} ± 0,12	0,73 ^a ± 0,01	1,11 ^c ± 0,18
14	0,31 ^{ab} ± 0,10	0,48 ^{ab} ± 0,08	0,44 ^a ± 0,14	0,58 ^{ab} ± 0,05	0,99 ^b ± 0,36	0,66 ^{bc} ± 0,18	0,89 ^{ab} ± 0,24	1,06 ^c ± 0,43
28	0,32 ^a ± 0,02	0,32 ^a ± 0,03	0,37 ^a ± 0,01	0,46 ^{ab} ± 0,09	0,41 ^a ± 0,02	0,55 ^{ab} ± 0,02	1,45 ^d ± 0,25	0,35 ^a ± 0,11
35	0,13 ^{bc} ± 0,00	0,65 ^b ± 0,01	0,54 ^b ± 0,04	0,62 ^b ± 0,04	0,61 ^{ac} ± 0,04	0,73 ^{bc} ± 0,05	1,09 ^c ± 0,06	1,32 ^d ± 0,16
42	0,11 ^c ± 0,01	0,57 ^b ± 0,01	0,71 ^b ± 0,08	0,53 ^{ab} ± 0,03	0,69 ^c ± 0,03	0,46 ^a ± 0,06	1,1 ^c ± 0,03	0,69 ^b ± 0,02
56	0,17 ^{abc} ± 0,09	0,29 ^a ± 0,01	0,45 ^{ab} ± 0,05	0,51 ^{ab} ± 0,11	0,81 ^{bc} ± 0,02	0,79 ^c ± 0,02	0,98 ^{bc} ± 0,02	1,24 ^{cd} ± 0,09
Média por tratamento	0,23 ^A	0,44 ^B	0,50 ^{BC}	0,52 ^B	0,66 ^C	0,63 ^C	1,04 ^D	0,96 ^D

Para cada tratamento, médias com letras minúsculas distintas na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste D.M.S. de tukey ao nível de confiabilidade de 95%. Para cada tratamento, médias dos tempos dos tratamentos com letras maiúsculas na linha, diferem estatisticamente ao nível de 95%.

Agradecimentos

À CNPq - PIBIC pela bolsa de iniciação científica.

Referências Bibliográficas

1. KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n° 22, p. 8421 – 8431, 2005.
2. SANTOS FILHO, J.I.; SCHLINDWEIN, M.M.; SCHEURMANN, G.N. Fatores determinantes do consumo de ovos no Brasil. **Rev. de Economia Agrícola**, São Paulo, v. 56, n° 2, p. 37-46, jul./dez. 2009.
3. Associação Paulista de Avicultura – Disponível em: <http://www.avisite.com.br/noticias>. Acesso em: 03/09/09.
4. SIRI, F.; IAFFALDANO, N.; MINELLI, G.; MELUZZI, A.; ROSATO, M. P.; FRANCHINI, A. Comparative pigmentation efficiency of high dietary levels of apo-ester and marigold extract on quality traits of whole liquid egg of two strains of laying hens. **J. Appl. Poult. Res.**, Champaign, v. 16, p. 429-437, 2007. Disponível em: <http://japr.fas.org/cgi/16/3/429>. Acesso em: 28 jun. 2011.

5. SAJILATA, M.G.; SINGHAL, R.R.; KAMAT, M.Y. The carotenoid pigment zeaxanthin – a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 7, p. 29-49, 2008.
6. CARVALHO, P. R. N.; CARVALHO, C. R. L.; MANTOVANI, D. M. B. Estudo da composição de sementes, cachopas, folhas e galhos do urucueiro. In: II SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTO, II, 1991, Campinas. **Anais...** Campinas: ITAL, 1991.
7. MERCADANTE, A. Z.; PFANDER, H. Caracterização de um novo carotenóide minoritário de urucum. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 21(2): 193-196, 2001.
8. CARVALHO, P. R. N.; TAVARES, P. E. R.; FABRI, E. G. I Reunião Nacional da Cadeia Produtiva do Urucum - Livro de Resumos. Campinas, 2007. 107p.
9. da SILVA, M. G. Análises de pigmentos em sementes de urucum. In: I REUNIÃO NACIONAL DA CADEIA PRODUTIVA DO URUCUM, Campinas. **Anais...** Campinas: ITAL, 2007. p. 79-83.
10. **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, revisão 02 de 06/2007.
11. BRITO, N.M.; AMARANTO JUNIOR, O.P.; POLERE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, jan./dez. 2003.
12. Quattrocchi, O. A. Andrizzi, S.A., Laba, R.F. **Introdución a la HPLC Aplicación y Práctica**. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro SA, 1992, p.301-328.
13. HORWITZ, W. Evalution of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Anal. Chem.** v.54, n. 1, p. 67A-76A, 1982.
14. ELLISON, S.L.R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A.. **Guia EURACHEM / CITAC: Determinando a Incerteza na Medição Analítica**. 2. ed. QUAM: 2002 – Versão Brasileira, 1974. 168 p.
15. Rodrigues, M.I.; LEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Caritá, 2009. 358 p.
16. ALVES, A.B.; da SILVA, M.G.; CARVALHO, P.R.N.; VISSOTTO, L.C. Validação e estimativa da incerteza de método para análise de licopeno e β -caroteno em polpa de tomate por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 33, nº 9, p. 1962-1966, 2010.

17. da SILVA, J.H.V.; ALBINO, L.F.T.; GODÓI, M.J.S Efeito do extrato de urucum na pigmentação da gema dos ovos. **Rer. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 29, nº 5, p. 1435-1439, 2000.
18. BRAZ, N. M.; FUENTES, M. F. F.; FREITAS, E. R.; SUCUPIRA, F. S.; MOREIRA, R. F.; LIMA, R. C. Semente residual do urucum na alimentação de poedeiras comerciais: desempenho e características dos ovos. *Acta Sci. Anim. Sci.*, Maringá, v. 29, n. 2, p. 129-133, 2007.
19. de CARVALHO, P. R.; CIPOLLI, K. M. A. B.; ORMENESE, R. C. S. C.; CARVALHO, P. R. N.; SILVA, M. G. Efeito da semente moída de *Bixa orellana* L. tipo IAC na ração de galinhas poedeiras sobre a performance produtiva e cor da gema de ovos. . In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 45, 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: SBZ 2008, p. 1-3.
20. GARCIA, E.A.; MOLINO, A.B.; GONÇALVES, H.C.; JUNQUEIRA, O.M.; PELÍCIA, K.; OSERA, R.H.; DUARTE, K.F. Ground annatto seeds (*Bixa orellana* L.) in sorghum – based commercial layer diets and their effects on performance ,egg quality, and yolk pigmentation. **Braz. J. Poultry Sci.**, Campinas, v. 12, nº 4, p. 259-264, oct/dec 2010.