

**DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE TOCOFEROIS E RETINOL EM OVOS DE
GALINHAS ALIMENTADAS COM *Bixa orellana* L.**

CAROLINE S. TREVISANI¹; PAULO R. de CARVALHO²; PAULO R. N. CARVALHO³;
ENIELUCE S. B. PARRA⁴; MARTA G. da SILVA⁵;

Nº 12211

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os teores de tocoferol e retinol em gemas obtidas de poedeiras, alimentadas com sementes de urucum com concentrações de 0%, 0,45% e 0,90% e com coletas nos períodos de 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 56 dias. O método validado apresentou-se específico, linear para a faixa avaliada, com limite de quantificação para tocoferóis entre 0,07 mg 100g⁻¹ e 0,15 mg 100g⁻¹, boa precisão e exatidão. O valor médio encontrado nos tratamentos, não considerando o período de coleta 56 dias, foi 3,04 mg 100g⁻¹ para α -tocopherol e 3,04 mg 100g⁻¹ para γ -tocopherol. Os teores de retinol mantiveram-se ao longo dos períodos e tratamentos, sendo observada diminuição em torno de 30% no período de 56 dias para o tratamento 0% de adição de semente de urucum.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the levels of tocopherol and retinol in yolk obtained from laying hens fed with annatto seeds at concentrations of 0%, 0.45% and 0.90% added to the feed and eggs were collected every seven (7) days for fifty-six (56) days. The validated method was specific, showed linear range, limit of quantification for tocopherols of 0.07 mg 100g⁻¹ and 0.15 mg 100g⁻¹, and good precision and accuracy. The average value found in the treatments, excluding the collection period of 56 days was 3.04 mg 100g⁻¹ to α -tocopherol and 3.04 mg 100g⁻¹ for γ -tocopherol. The concentration of retinol remained stable independent of the time period and treatment, and a decrease was observed of around 30% in the period of 56 days for treatment with no addition of annatto seed.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Ciências dos Alimentos, USP, Piracicaba-SP, carolinetrevisani@gmail.com

² Colaborador: Pesquisador, APTA, Bauru-SP

³ Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP

⁴ Colaborador: Assistente Técnico a Pesquisa, CCQA/ITAL, Campinas-SP

⁵ Orientadora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP

INTRODUÇÃO

O ovo é um alimento de grande valor nutritivo, contém proteínas e vitaminas importantes e pode ajudar na prevenção de certas doenças. Além disso, é um produto de baixo custo e consumido por grande parte da população em geral. Em 2009, segundo estimativas da FAO (Embrapa), o Brasil ocupava a posição do 7º maior produtor mundial de ovos. No mesmo ano, ocupava a 68ª posição de consumo per capita em uma lista de 168 países. A análise da qualidade de ovos normalmente se dá através da alimentação introduzida às galinhas poedeiras, que estaria vinculado com rações a base de milho amarelo. O milho amarelo apresenta pigmentos como a xantofila zeaxantina, por exemplo, que são responsáveis pela cor alaranjada das gemas. Na elaboração dessas rações, há a possibilidade de se ter a substituição total ou parcial do milho amarelo por diversas matérias primas, que causam uma diferença na coloração das gemas. Essa diferença de cor causa certa recusa por parte do consumidor na hora de adquirir o produto. Devido a esse problema, são adicionados pigmentos sintéticos nas rações de poedeiras para que se tenha um produto final bem atrativo. Porém, como em alguns países a legislação não permite a adição de pigmentos sintéticos em rações para animais, a opção de se adicionar pigmentos naturais vem aumentando. Atualmente, como fonte de pesquisas se encontra o pigmento natural bixina, extraído da semente de urucum. O uso desse pigmento tem sido muito importante, pois ao ser adicionado às rações de poedeiras confere uma coloração adequada, podendo conferir teores diferentes de vitaminas como A e E. Baseado nessas informações, o projeto teve como objetivo avaliar os teores de tocoferóis e retinol em gemas obtidas de poedeiras alimentadas com 0%, 0,45% e 0,90% de sementes trituradas de urucum na ração. As análises ocorreram nos ovos coletados nos períodos de 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 56 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

Foram utilizadas galinhas poedeiras da linhagem Hisex White que foram submetidas à alimentação basal composta de milho branco com adições de semente de urucum trituradas. Essas adições foram feitas em três níveis: 0%; 0,45% e 0,90%. Esse estudo foi realizado no Biotério experimental de aves do Laboratório Animal de Bauru, em pesquisas conduzidas entre outubro de 2007 a janeiro de 2008. Os ovos coletados foram enviados ao laboratório, as gemas foram separadas das claras e mantidas congeladas até o momento da análise. Todas as análises foram realizadas

em triplicata.

Método Analítico

Cerca de 2,0g \pm 0,2g de gemas foram pesados em tubos, adicionados 10mL de solução de pirogalol 0,05% etanólica, 5mL de solução de hidróxido de potássio 50%, homogeneizados, e saponificados em banho-maria com temperatura entre 80-90°C por aproximadamente 20 minutos. A extração dos analitos foi realizada com 4 porções de 10 mL, de forma sequencial, com solução composta de éter etílico : éter de petróleo : acetato de etila (60:30:05, v/v/v) em banho de ultra som por cerca de 2 minutos. As 4 porções de 10 mL foram combinadas em funil de separação e lavada até pH neutro com 3 porções de água destilada, 10 mL de solução de cloreto de sódio 10%, 2 porções de água destilada, 10 mL de solução de etanol 10%, seguido de água destilada. O pH da solução de lavagem foi avaliado com solução de fenolftaleína 1% etanólica. Após o pH neutro, o extrato foi transferido para tubo de ensaio, acrescentado BHT (butilhidroxi tolueno), seco sob fluxo de nitrogênio e diluído em 10mL de hexano. Por final, a amostra foi filtrada em membrana de celulose regenerada com poro de 0,45 μ m.

Validação

O método foi validado segundo os parâmetros do INMETRO (2010) e Quattrocchi et al. (1992), sendo considerada a seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão.

Seletividade: avaliada pela média da resposta dos analitos em amostras com matriz gema e sem a matriz (branco dos reagentes), com faixa semelhante de concentração. O efeito da matriz foi avaliado, estatisticamente, com o teste *t-student*, Equações 1 e 2.

$$t = \frac{|\overline{X_1} - \overline{X_2}|}{\sqrt{s^2 (1/n_1 + 1/n_2)}} \quad (1) \quad s^2 = \frac{[(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2]}{(n_1+n_2-2)} \quad (2)$$

Onde: $\overline{X_1}$ e $\overline{X_2}$, média da resposta do analito em amostras com matriz e sem matriz; s_1 e s_2 , estimativas de desvios-padrão da resposta desse analito; n_1 e n_2 , tamanhos das amostras 1 e 2.

Sensibilidade: avaliada com a construção de uma curva analítica composta pelos analitos com seis concentrações considerando a origem. Na linearidade para o retinol foram utilizadas concentrações entre 0,13 e 0,84 μ g mL⁻¹ e para os tocoferóis concentrações entre 0,35 e 2,19 para α -tocol, 0,75 e 7,76 μ g mL⁻¹ para β -tocol, 0,74 e 4,67 μ g mL⁻¹ para γ -tocol e 0,70 e 4,45 μ g mL⁻¹ para δ -tocol, respectivamente. As

estimativas de limites de detecção (LQ) e quantificação (LQ) foram determinadas com curvas suplementares, com três concentrações inferiores a menor concentração dos analitos, injetadas em triplicata. A linearidade da curva analítica e os LD e LQ foram obtidos com a aplicação das equações 3, 4 e 5, respectivamente.

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (3)$$

$$\text{Limite de detecção} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (4) \quad \text{Limite de quantificação} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

Onde: t_r , valor *t-student* calculado; r , correlação linear; n , número de medidas; 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.

Precisão: do sistema foi obtida com cinco injeções, consecutivas, de um ponto da curva analítica, e do método foi avaliada com dez repetições analíticas, simultâneas e independentes. O coeficiente de variação (CV) encontrado entre as repetições foi avaliado segundo Horwitz (1982) (Equação 6).

$$CV(\%) = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (6)$$

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

Exatidão: avaliada com recuperação na amostra em triplicata e em um nível de adição. A exatidão foi determinada estatisticamente pela Equação 7.

$$t_{cal} = \left(\frac{X - \bar{X}}{s} \right) \sqrt{n} \quad (7)$$

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.

Robustez: avaliada com o teste de Youden onde foram avaliados 7 fatores: tomada de amostra, volume de etanol + pirogalol, uso de BHT, tempo de saponificação, volume de solução extratora, volume final de diluição de amostra, volume de hidróxido de potássio 50%. A matriz utilizada foi conforme descrito na Tabela 01 e a combinação dos resultados obtidos foram calculados conforme Tabela 2.

Tabela 1: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método.

Fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	A
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	B
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	C
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	G
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Tabela 2: Cálculo da diferença de resposta para cada fator.

Fatores	Diferenças
A/a	$1/4(s+t+u+v)-1/4(w+x+y+z)$
B/b	$1/4(s+t+w+x)-1/4(u+v+y+z)$
C/c	$1/4(s+u+w+y)-1/4(t+v+x+z)$
D/d	$1/4(s+t+y+z)-1/4(u+v+w+x)$
E/e	$1/4(s+u+x+z)-1/4(t+v+w+y)$
F/f	$1/4(s+v+w+z)-1/4(t+u+x+y)$
G/g	$1/4(s+v+x+y)-1/4(t+u+w+z)$

A influência do fator no método foi avaliada pelo teste *t*-student conforme as equações 8 e 9.

$$t = \frac{|R|}{SR} \quad (8) \quad SR = \sqrt{\frac{\sum R^2}{n}} \quad (9)$$

Onde: *t*, valor *t*-student calculado; *R*, cada um dos resultados dos ensaios; *n*, número de fatores (A–G).

Condições Cromatográficas

A quantificação foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência. Utilizou-se o comprimento de onda de excitação 325 nm e de emissão 480 nm para retinol e de 292 nm e 326 nm para tocoferol. A coluna analítica utilizada era de Si, 125 x 4mm, 5µm (Merck, Alemanha), para retinol e tocoferol e alça amostradora de 250 µL. A fase móvel para vitamina A era constituída de n-hexano:iso-propanol (98:02, v/v) e a fase móvel para análise de vitamina E era n-hexano:acetato de etila:iso-propanol (98,8:1,2:0,2, v/v/v) com vazão de 1,5 mL min⁻¹ para as duas condições. Os resultados foram avaliados através da comparação do tempo de retenção dos analitos da amostra com o do padrão e a quantificação foi com uso de padrão externo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação

Seletividade: os dados utilizados na avaliação do efeito da matriz e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. Os valores t calculados foram comparados com o valor t -student tabelado com $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade para uma probabilidade de 95% (t tabelado $_{95\%,4}$) igual a 2,78). Os resultados indicaram que a matriz não interfere na análise e o método apresenta seletividade adequada.

Tabela 3: Valores utilizados na avaliação da seletividade, efeito da matriz

Retinol		α -tocol		γ -tocol	
$n_1^a=3$	$n_2^b=3$	$n_1^a=3$	$n_2^b=3$	$n_1^a=3$	$n_2^b=3$
$\bar{X}_1^a=135,8$	$\bar{X}_2^b=143,7$	$\bar{X}_1^a=1,04$	$\bar{X}_2^b=1,16$	$\bar{X}_1^a=0,43$	$\bar{X}_2^b=0,51$
$s_1^a=60,84$	$s_2^b=23,43$	$s_1^a=0,01$	$s_2^b=0,04$	$s_1^a=0,002$	$s_2^b=0,002$
$t_{cal}=0,84$		$t_{cal}=0,65$		$t_{cal}=1,55$	

^a, amostra com a matriz, com adição dos isômeros tocois; ^b, amostra sem a matriz

Sensibilidade: os valores obtidos no teste podem ser observados na Tabela 4. O valor t -student para $n - 2$ graus de liberdade com 95% de probabilidade ($t_{tab(95, 4)}$) é 2,78 e os valores t calculados para a linearidade foram 81,63 para o retinol, 99,98 para α -tocol, 89,42 para β -tocol, 75,57 para γ -tocol e 75,57 para δ -tocol, respectivamente. Baseado nos valores obtidos, a correlação foi significativa para a faixa avaliada.

Tabela 4: Parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), e valores de LD e LQ calculados.

Dados	Retinol	α -tocol	β -tocol	γ -tocol	δ -tocol
RL: Curva analítica ($\mu\text{g } \text{área}^{-1}$)	Área=2470933 c + 24529	Área=1394536 c - 14882	Área=773827c - 17907	Área=941238c - 21925	Área=1039836 c - 47998
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9994	0,9996	0,9995	0,9993	0,9993
RL: Curva LD e LQ ($\mu\text{g } \text{área}^{-1}$)	Área=2679867 c - 2974	Área=4709484 c - 11809	Área=2714164 c - 27490	Área=3246619 c - 22448	Área=3657290 c - 33168
RL: Curva LD e LQ ($\mu\text{g } \text{s}^{-1}$)	Área=85569c - 485	Área=957920c - 30282	Área=565775c - 43977	Área=674596c - 47590	Área=726060c - 49928
LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,24E-03	0,04	0,12	0,10	0,10
LD ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$)	0,62E-03	0,08	0,06	0,41	0,05
LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,53E-03	0,02	0,06	0,05	0,30
LQ ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$)	1,26E-03	0,07	0,17	0,15	0,15

RL, equação de regressão linear; c, concentração; s, estimativa de desvio padrão das áreas obtidas nas três injeções de cada concentração.

Precisão: os coeficientes de variação encontrados nos testes (Tabela 5) foram menores que os obtidos com a equação de Horwitz (1982), portanto o sistema e o método apresentaram precisão adequada.

Tabela 5: Valores encontrados na precisão do sistema e método para o retinol e tocoferóis.

Analito	Precisão	Valor médio	s	CV (%)	CV Max (%)
Retinol	Sistema (n, 5; área)	1080532	19595	2	13
	Método (n, 10; mg 100g ⁻¹)	364	18	5	
α-tocol	Sistema (n, 5; área)	1706354	13454	1	10
	Método (n, 10; mg 100g ⁻¹)	3,09	0,13	4	
γ-tocol	Sistema (n, 5; área)	2435193	23164	1	11
	Método (n, 10; mg 100g ⁻¹)	1,06	0,02	2	

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

Exatidão: com os valores obtidos no teste (Tabela 6) foi calculado o valor *t-student* e comparado com o valor *t* tabelado com (n – 1) graus de liberdade para uma probabilidade de 95% (*t* tabelado_(95%,2) é igual a 4,30 para tocoferóis e retinol). Os valores *t* calculados foram menores que o *t* tabelado, logo, o método apresentou exatidão adequada com 95% de confiança.

Tabela 6: Valores encontrados na exatidão do método para retinol e tocoferóis.

Analito	Nível adição	A	B	C	Rec. \bar{X}	CV (%)	<i>t</i> cal
α-T	1,18	1,45	1,12	1,34	96	13	0,49
γ-T	1,67	1,39	1,48	1,61	89	7	0,86
Retinol	522	547	579	567	108	3	1,43

α-T, alfa-tocoferol (mg 100g⁻¹); γ-T, gama-tocoferol (mg 100g⁻¹); Retinol, retinol (μg 100g⁻¹); Rec., recuperação; \bar{X} , média; *t* cal, valor *t-student* calculado.

Robustez: As condições ensaiadas estão apresentadas nas Tabelas 7, os resultados obtidos no teste e o valor *t-student* calculados estão na Tabela 8. O valor *t-student* tabelado para n-1 grau de liberdade com 95% de confiança é 2,45 e não foi encontrado valor de *t*-calculado superior ao tabelado. Foram considerados como pontos críticos os fatores A, D, E e F, sendo considerados tomada de amostra de 2g, tempo de saponificação de 20 minutos, volume de extração de 10mL seguido de mais 3 extrações de 10mL (sequencial) e volume final do extrato de 10mL.

Tabela 7: Condições ensaiadas: fatores e descrições dos níveis.

Letra	Fator	Nível -	Nível +
A	Tomada amostra	1g	2g
B	Etanol + pirogalol	10mL	20mL
C	Amostra + BHT	Sem	Com
D	Tempo saponificação	20 min	30 min
E	Sol. extratora	10+(3x10)	20+(3x20)
F	Volume final	4mL	10mL
G	KOH 50%	5mL	10mL

Tabela 11: Resultados obtidos no teste de robustez nas condições ensaiada e o valor *t-student* calculado.

Analito		Fatores						
		A/a	B/b	C/c	D/d	E/e	F/f	G/g
α -T	Resultados	0,79	-0,04	0,25	-1,04	-0,26	0,68	-0,21
	<i>t</i> cal.	1,37	-0,07	0,42	-1,79	-0,45	-1,18	0,36
γ -T	Resultados	0,40	-0,06	-0,04	-0,01	0,60	-0,06	0,00
	<i>t</i> cal.	-1,47	0,23	-0,14	-0,03	2,17	0,21	0,01
Retinol	Resultados	-25,16	-38,58	-15,20	18,81	-146	22,55	-5,92
	<i>t</i> cal.	1,17	-1,79	-0,71	0,87	-0,07	-1,05	0,27

Resultados, resultados s, t, u, v, w, x, y, z; *t* cal, *t-student* calculado.

Tocoferóis e retinol

Os resultados encontrados nos tratamentos avaliados e nos ovos comerciais (OC) estão apresentados na Figura 1 para tocoferóis e Figura 2 para retinol.

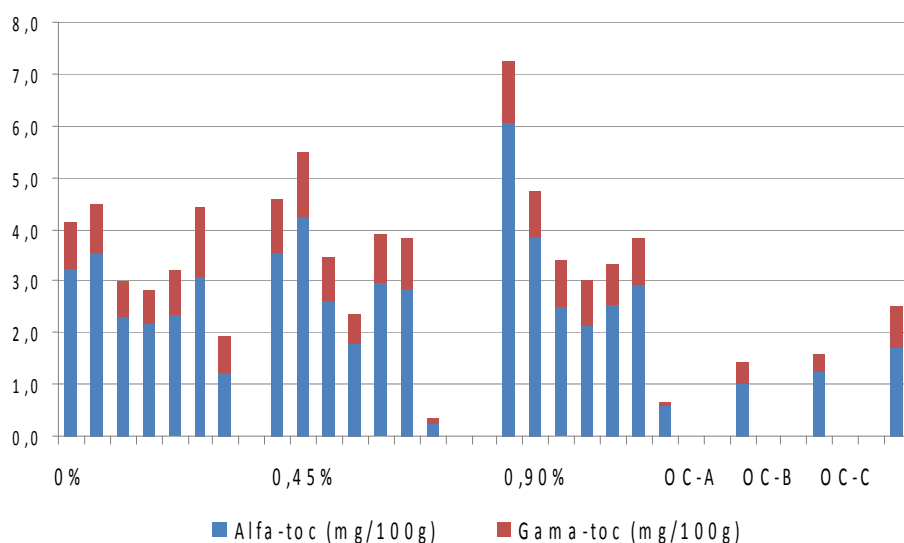


Figura 1: Teores de alfa-tocoferol e gama-tocoferol encontrados nos tratamentos e ovos comerciais.

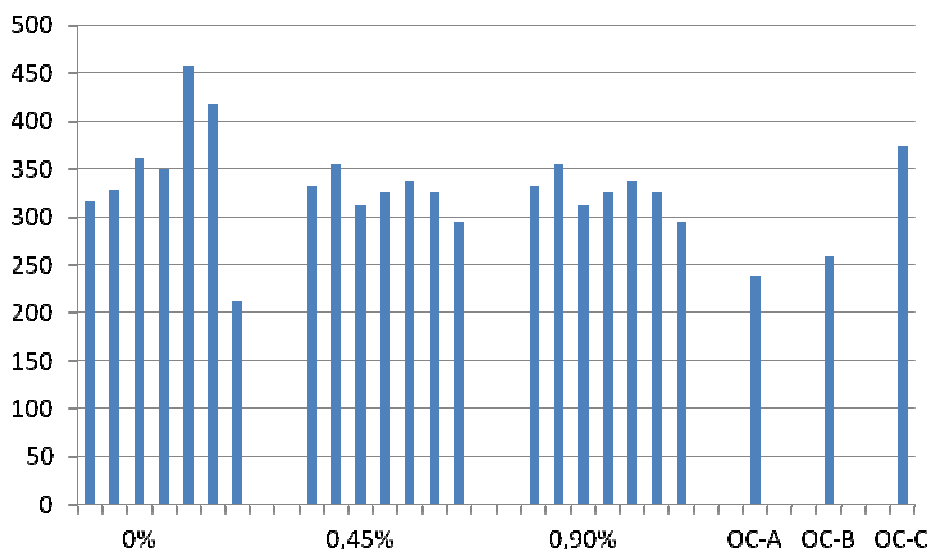


Figura 2: Teores de retinol encontrados nos tratamentos e ovos comerciais.

Os teores médios de tocoferol (Figura 1) foram superiores as amostras comerciais. Nos ovos comerciais os teores de α -tocopherol variaram de $1,00 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ a $1,70 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ enquanto o valor médio nos tratamentos, não considerando o período de coleta 56 dias, foi $3,04 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$. O isômero γ -tocopherol nos ovos comerciais variaram entre $0,42 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $0,83 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e o valor médio nos tratamentos foi $0,92 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, não considerando o período 56 dias. O valor médio superior ao observado nos ovos comerciais, sugere que as perdas de tocoferóis durante o longo período de estocagem (gemas congeladas desde 2007) foram mínimas, mas levanta a dúvida quanto ao teor inicial dos nutrientes. De acordo com a Figura 1, ocorreu diminuição nos teores de tocoferóis nos tratamentos, sendo muito acentuado no último período (56 dias).

A análise estatística dos resultados de retinol indicou que entre os períodos de 7 e 42 dias não houve diferença significativa ao nível de confiança de 95%. No período 56 dias foi observado diminuição ao redor de 30% para o tratamento com 0% de adição de semente de urucum e de 11% para os tratamentos 0,45% e 0,90% da mesma adição. O valor médio de retinol encontrados nos tratamentos foi de $334 \text{ } \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ sendo superior ao relatado por FONSECA (1985) ($175,5 \text{ } \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$) e inferior relatado por FRANCO (2001) ($816 \text{ } \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$). Os valores apresentados por ANDERSON et. al (1988) ($1180 \text{ } \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$) e MAHAN et al. (1998) ($2900 \text{ } \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$) diferem dos valores apresentados, talvez devido aos teores de urucum terem sido 2%. Segundo HARDER (2005), a linhagem da poedeira também pode influir no resultado do estudo.

CONCLUSÃO

O método validado para determinar os teores de tocoferóis e retinol mostrou-se robusto, com boa seletividade para a matriz gema e linear na faixa avaliada. Os limites de detecção e quantificação determinados foram $0,08 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $0,26 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para α -tocopherol, $0,06 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $0,17 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para β -tocopherol, $0,41 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $0,61 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para γ -tocopherol, $0,05 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $0,15 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para δ -tocopherol e $0,62\text{E-}03 \text{ } \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ e $1,26 \text{ } \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ para retinol, respectivamente. O valor médio encontrado nos tratamentos, não considerando o período de coleta 56 dias, foi $3,04 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para α -tocopherol e $3,04 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para γ -tocopherol. Os teores de retinol mantiveram-se ao longo dos períodos e tratamentos, sendo observada diminuição em torno de 30% no período de 56 dias para o tratamento 0% de adição de semente de urucum.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, L.; DIBBLE, M.V.; TURKKI, P.R.; MITCHELL, H.S.; RYNBERGEN, H.J. **Nutrição**. 17. Ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1988. 737 p.

Embrapa. Disponível em:
http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=15&Itemid=17. Acesso em 02 de jul 2012.

FONSECA, W. **Carne de aves e ovos: vademecum**. 2. Ed. São Paulo: Ícone, 1985.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. 303 p.

HARDER, Marcia Nalesso Costa. **Efeito do urucum (*Bixa Orellana*) na alteração de características de ovos de galinhas poedeiras**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

HORWITZ, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 1, pg. 67A – 76A, 1982.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9. ed. Pailo: Roca, 1998. 1179 p.

Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008, 2010. Disponível em:
http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf. Acesso em 2 jul 2012.

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.