

Estado de São Paulo
CINQUENTA E SEIS
Entrada em 1/1/19

ANO XXXIV—N.º 3

BOLETIM PECUÁRIO

1966

ENSAIOS SOBRE A PIGMENTAÇÃO
DA GEMA DO OVO

Por

JOAQUIM DA SILVA PORTUGAL

VASCO SALGUEIRO ANTUNES

LUIZ VIEIRA DE CASTRO

MARIA CACILDA CARVALHO DE ALMEIDA

A coloração da gema do ovo, dado o interesse que para a sua valorização comercial pode representar, tem sido objecto de numerosos trabalhos que estudam a influência sobre ela exercida pela ingestão de alimentos contendo substâncias pigmentantes naturais, ricas em xantofilas ou carotenoides de síntese.

Está provado que os carotenoides são os responsáveis pela coloração da gema do ovo e que esta depende da maior ou menor quantidade dessas substâncias presentes na dieta (1). A zeaxantina e a luteína encontram-se ali em muito maior quantidade que a criptoxantina e o caroteno, tendo-se verificado (2) que as xantofilas dos alimentos verdes (como, por exemplo, a zeaxantina e a luteína) se depositam na gema do ovo numa percentagem de 15 %, enquanto que as do milho amarelo o são em cerca de 26 %, facto que está de acordo com as observações de DAY e WILLIAMS (3) sobre a pigmentação da pele e dos tarsos nos frangos.

Nos alimentos naturais como a farinha de luzerna, o número de xantofilas presentes chega a atingir mais de 40 (4); no milho também existem em grande número (5) e isto justifica que muito pouco se conheça sobre as propriedades pigmentantes de muitas das xantofilas menos comuns.

A necessidade de elevar as qualidades pigmentantes de certos regimes despertou o interesse para o emprego de produtos de síntese e destes já numerosos hidroxil e carbonil carotenoides têm sido experimentados para obter a pigmentação da gema do ovo ou da pele dos galináceos.

Os trabalhos de STEINEGGER e LANETTI (5) e de STEINEGGER e outros (6) demonstram o efeito pigmentante sobre a gema do ovo da

ingestão de zeaxantina, cantaxantina, isozeaxantina, dipalmitato éster da zeaxantina, dimetil éster da isozeaxantina, diacetato de isozeaxantina, β -apo-8'-carotenal e metilbixina puras, bem como a sua deposição qualitativa na gema e características de coloração variáveis.

A existência no mercado de um produto de síntese à base do β -apo-8'-carotenal, o Carophyl 10 da Casa Roche, e o possível interesse da sua aplicação naqueles casos em que a dificuldade da aquisição de milho amarelo ou farinha de luzerna de boa qualidade não permita dispor de alimentos compostos com boas características pigmentantes, está na base da execução do presente trabalho.

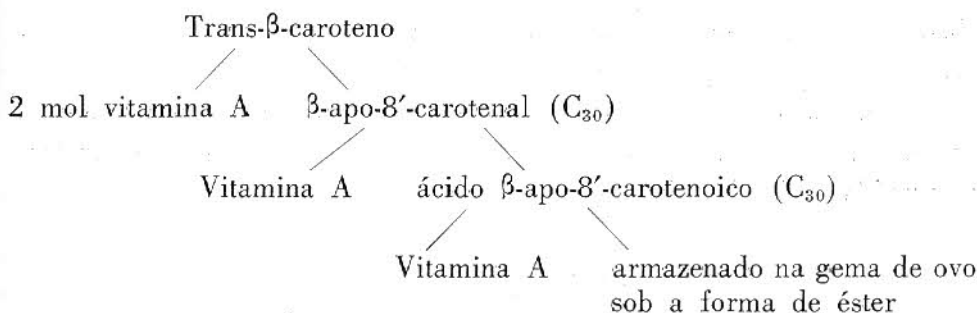
O Carophyl 10 contém, sob a forma estabilizada, 10 % de éster etílico do ácido β -apo-8'-carotenoico, o qual não possui senão 24 % da actividade vitamínica A do β -caroteno e é um derivado deste último composto.

Como se sabe, o β -caroteno, o pigmento mais comum no mundo vegetal e animal, só tem sido encontrado na gema do ovo em pequenas quantidades, mesmo quando adicionado à dieta em altas doses. Constituinto uma fonte essencial de vitamina A, a sua transformação nesta vitamina pode efectuar-se por dois processos diferentes (7): por cisão em duas metades da molécula do β -caroteno ou por degradação química oxidativa a partir das extremidades dessa molécula. É nessa degradação que se forma, entre outros aldeídos poliênicos, o β -apo-8'-carotenal.

Este é um composto que se encontra espalhado na natureza como produto do metabolismo do β -caroteno, embora em quantidade bastante fraca no estado natural. A sua transformação em vitamina A é evidenciada, entre outros, pelos trabalhos que demonstraram o armazenamento daquela vitamina no fígado de ratos sujeitos a uma dieta nela carenciada mas suplementada com β -apo-8'-carotenal (7).

A sua deposição na gema do ovo é evidenciada pela observação de BRUBACHER e outros (7), que verificaram, em galinhas sujeitas a um regime suplementado com β -apo-8'-carotenal, encontrar-se naquela um pigmento carotenoico que se constatou ser um éster do ácido β -apo-8'-carotenoico.

Segundo BRUBACHER (7) o processo de degradação do β -caroteno na galinha, processar-se-ia assim:



tudo concorrendo para demonstrar que β -apo-8'-carotenal se apresenta nos vegetais e animais como produto do metabolismo do β -caroteno.

MATERIAL E MÉTODOS (a)

A noventa galinhas de raça Plymouth Rock branca, de 14 meses de idade, forneceu-se, durante 54 dias, um alimento composto completo muito pobre em xantofilas, e não se lhes deu acesso a qualquer alimento verde (Quadro I, Grupo I).

Durante esta primeira fase do ensaio, como na que se seguiu, foram executadas, de três em três dias, determinações da coloração das gemas dos ovos produzidos, quer por comparação utilizando uma escala visual (6), quer pelo método espectrofotométrico (8).

Quando a descoloração das gemas atingiu o n.º 1 da escala visual, foram sacrificadas 6 galinhas para determinação dos teores de vitamina A, β -caroteno e xantofilas no soro sanguíneo e no fígado (Quadro IV).

Formaram-se então 6 grupos de 14 galinhas, dos quais o 1.º continuou com a mesma alimentação e os restantes foram alimentados, até ao final do ensaio, com as dietas cuja composição figura no Quadro I. No

(a) Alguns dos métodos descritos são modificações por nós introduzidas nos métodos originais. Todas as determinações espectrofotométricas foram executadas num espectrofotómetro Coleman, modelo A-11.

final sacrificaram-se três galinhas de cada grupo, executando-se as mesmas determinações que no fim da primeira fase.

Nos alimentos compostos completos foram também determinados a composição química (Quadro II) e os teores de vitamina A, β -caroteno e xantofilas (Quadro III).

1 — *Determinação da cor*

- a) *Pelo método visual* — A gema, depois de separada do albumen, é homogeneizada e a sua cor determinada por comparação com uma escala corada (6).
- b) *Pelo método espectrofotométrico* — Tomam-se 1 a 5 g de gema de ovo, conforme a intensidade da sua coloração, e determina-se a cor pelo método de MAYFIELD e HALBROOK (8).

Os resultados obtidos exprimem-se em microgramas de β -caroteno (5). Como os carotenoides não são depositados na gema do ovo sob a forma por que foram ingeridos, não há razão válida para não usar como padrão o β -caroteno, apreciando, numa base comum, o efeito resultante da ingestão dos diferentes carotenoides.

2 — *Determinações nos alimentos*

- a) *Doseamento do β -caroteno* — Pelo método de BOTH (9).

Os resultados obtidos exprimem-se em mg de β -caroteno por Kg de alimento, por comparação com uma curva padrão de β -caroteno.

- b) *Doseamento da vitamina A* — Pelo método da AOAC (10).
- c) *Doseamento das xantofilas* — Pelo método de BICKOFF (11).

3 — *Determinações no soro sanguíneo*

- a) *Doseamento do β -caroteno* — Pelo método de KOCH (12).

Os resultados exprimem-se em γ de β -caroteno em 100 ml de soro sanguíneo.

QUADRO I

COMPOSIÇÃO DOS ALIMENTOS

	GRUPO					
	I	II	III	IV	V	VI
Aveia	200	200	200	200	200	200
Milho branco	500	500	500	500	—	—
Milho amarelo	—	—	—	—	500	500
Sêmea de trigo	100	100	100	50	100	50
Bagaço de mendobi	90	90	90	90	90	90
Farinha de peixe	50	50	50	50	50	50
Farinha de luzerna	—	—	—	50	—	50
Fosfato bicálcio	14	14	14	14	14	14
Casca de ostra	40	40	40	40	40	40
Sal	5	5	5	5	5	5
Correctivo mineral vitamínico (a) ..	1	1	1	1	1	1
Carofil 10	—	0,010	0,020	—	—	—

(a) Continua por kg: 7 000 000 U. I. de vitamina A, 700 000 U. I. de vitamina D₃, 2 g de vitamina B₂, 2 mg de vitamina B₁₂, 4 g de ácido nicotínico, 3 g de pantotenato de cálcio e 70 g de sulfato de manganês.

b) *Doseamento da vitamina A* — Pelo método de KOCH (12).

O extracto em que se fez a determinação do β -caroteno é evaporado à secura no vácuo e em banho-maria a 30°C, nos próprios tubos para leituras espectrofotométricas, e o resíduo resultante da evaporação retomado com 1 ml de clorofórmio para cromatografia.

A concentração de vitamina A é determinada pela reacção de Carr-Price.

Como nem só a vitamina A dá aquela reacção corada com o tricloreto de antimónio, mas também os carotenoides, é necessário introduzir uma correcção nas leituras obtidas. Como a intensidade de coloração

produzida por γ de vitamina A é igual à obtida com 20 γ de β -caroteno, para realizar essa correcção usamos a fórmula:

$$\gamma \% \text{ vitamina A no soro sanguíneo} = A - \frac{c}{20} \text{ em que}$$

A = concentração de vitaminas A em γ %

c = » » β -caroteno em γ %

e os valores determinados convertidos em U. I. de vitamina A.

c) Doseamento das xantofilas

O método é semelhante ao descrito para os alimentos, com as modificações que a necessidade da sua adaptação ao soro sanguíneo e os pequenos volumes deste disponíveis impuseram.

Para um balão volumétrico de 25 ml, medem-se 5 ml de soro sanguíneo, 10 ml de uma mistura de hexano-acetona (7 + 3) e 0,25 ml de água destilada. Agita-se vigorosamente durante 15 minutos e deixa-se em contacto durante 16 horas a baixa temperatura e ao abrigo da luz. A agitação facilita a precipitação total das proteínas e a extracção dos pigmentos, à semelhança do que KIMBLE (13) aconselha na técnica de extracção do caroteno no soro sanguíneo.

QUADRO II

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS

GRUPOS	Matéria seca %	Proteína bruta %	Sub. éter-solúveis %	Extractivos não azotados %	Fibra bruta %	Cinzas %
I, II, III	90,1	15,8	3,4	52,9	8,0	10,0
IV	90,1	16,1	3,6	51,8	8,4	10,2
V	90,1	15,6	4,2	52,7	7,9	9,7
VI	90,6	16,6	4,0	51,9	8,5	9,6

QUADRO III

β — CAROTENO, VITAMINA A e XANTOFILAS NOS ALIMENTOS

GRUPOS	β -caroteno γ %	Vitamina A U. I. %	Xantofilas expressas em γ de β -caroteno %
I			
1.º período	90	1 650	N
2.º período	90	1 650	N
II	66	1 700	N
III	66	1 500	N
IV	900	2 850	1 330
V	102	1 500	530
VI	1 340	2 530	2 250

Completa-se o volume com hexano, agita-se para homogeneisar e tomam-se 10 ml que se adsorvem em colunas pelo método já descrito para os alimentos, eluindo primeiro o caroteno, depois as xantofilas.

A concentração de xantofilas é determinada multiplicando por 1,06 os valores obtidos em relação a uma curva padrão de β -caroteno.

4 — *Determinação no fígado*

a) *Doseamento do β -caroteno*

Para uma ampola de decantação, pesam-se 2 g de fígado triturado e homogeneizado, juntam-se-lhe 10 ml de água destilada e 10 ml de álcool etílico a 95 %, agita-se durante 3 minutos e deixa-se repousar 10 minutos. Adicionam-se 12 ml de éter de petróleo 40-60°, agita-se durante 15 minutos e procede-se como foi indicado para o soro sanguíneo.

b) *Doseamento da vitamina A*

Tomam-se 0,5 gramas de fígado e segue-se o método indicado para os alimentos, mas retomando o resíduo em

50 ml de clorofórmio e usando 1 ml para as leituras espectrofotométricas.

c) *Doseamento das xantofilas*

Pesam-se 2 g de fígado triturado e homogeneizado, tratando-os com 30 ml de uma mistura de hexano-acetona (7 + 3) e 0,5 ml de água destilada.

Agita-se durante 15 minutos e deixa-se macerar durante 16 horas, a baixa temperatura e ao abrigo da luz. Completa-se o volume a 50 ml com hexano, toma-se uma alíquota que se cromatografa, elue, etc., pela técnica já descrita.

QUADRO IV

TEORES MÉDIOS DE β — CAROTENO, VITAMINA A e XANTOFILAS NO SORO SANGUÍNEO e NO FÍGADO,

GRUPO	NO SORO SANGUÍNEO			NO FÍGADO		
	β -caroteno γ %	Vitamina A U. I. %	Xantofilas expressas em γ de β -caroteno %	β -caroteno γ %	Vitamina A U. I. %	Xantofilas expressas em γ de β -caroteno %
I						
1.º período	N	175	N	N	307 910	N
2.º período	N	114,3	N	75	131 250	N
II	30	191	80	188	272 500	364
III	32	111	119	237	166 660	309
IV	56	130	181	270	320 000	518
V	35	81	170	301	237 500	806
VI	64	152	484	1 188	327 500	1 159

DISCUSSÃO

Na fase inicial do ensaio verificou-se que a descoloração da gema do ovo se processava rapidamente de início, para se tornar mais lenta depois. Assim, enquanto foram necessários, em média, cerca de 24 dias para que

a coloração baixasse ao número 2 da escala visual, decorreram, em média, mais 30 dias até que atingisse o número 1 daquela escala.

Na segunda fase do ensaio constatou-se uma rápida subida da coloração até um nível variável com a riqueza em xantofilas ou Carophyl 10 do alimento fornecido. Esse aumento de coloração começava a verificar-se três dias após a mudança da dieta para atingir o seu máximo cerca de 24 dias depois (Fig. 1).

No grupo II, a acção de 10 g/t de Carophyl não originou senão uma muito pequena melhoria na coloração da gema do ovo.

No grupo III, a influência da adição de 20 g/t de Carophyl 10 foi bem mais acentuada, determinando a elevação da cor n.º 1 da escala visual para o n.º 4.

No grupo IV, a incorporação de 50 Kg de farinha de luzerna por tonelada de alimento melhorou nitidamente a coloração da gema do ovo, o mesmo se verificando, mas mais acentuadamente, no grupo V, pela simples substituição do milho branco por milho amarelo.

O grupo VI foi aquele em que o aumento de coloração foi mais intenso, pela acção pigmentante conjunta de milho amarelo e de farinha de luzerna.

As determinações executadas nos alimentos revelaram teores de β -caroteno mais elevadas nos alimentos dos grupos IV e VI, consequência da presença da farinha de luzerna e teores da vitamina A semelhantes, o que é natural dada a identidade de suplementação naquela vitamina.

No que respeita às xantofilas só os alimentos contendo milho amarelo, farinha de luzerna e ou os dois simultâneamente, apresentavam teores elevados (Quadro III).

Das determinações feitas no soro sanguíneo e no fígado resultou:

- a) Os teores de β -caroteno foram nulos no grupo I e máximos no grupo VI (Quadro IV).
- b) Os teores de vitamina A apresentam os seus valores máximos nos grupos IV e VI em que os alimentos continham farinha de luzerna.
- c) Que a percentagem de xantofilas, nula no grupo I, atingia o seu máximo no grupo VI.

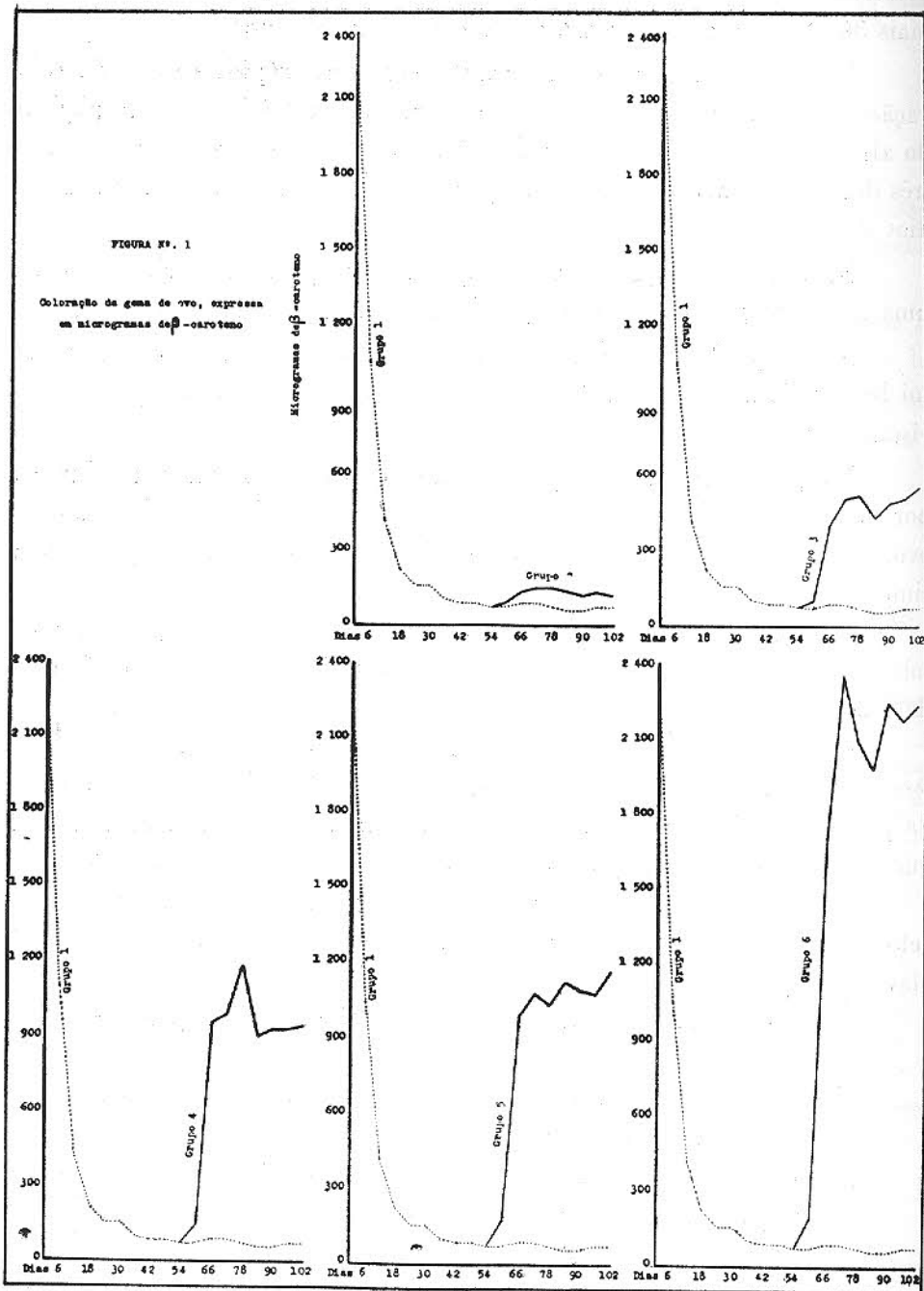


Fig. 1

CONCLUSÕES

Do ensaio efectuado pode concluir-se:

- a) Que a dose de 10 g de Carophyl 10 por tonelada de alimento composto é insuficiente para proporcionar uma melhoria significativa da coloração da gema de ovo em galinhas submetidas a um regime muito pobre em xantofilas.
- b) Que da adição de 20 g por tonelada de Carophyl 10 ao mesmo regime resulta uma melhoria na cor da gema do ovo.
- c) Nas condições do ensaio, do emprego de alimentos compostos contendo milho amarelo ou farinha de luzerna de boa qualidade resultou uma melhor coloração da gema do ovo do que a determinada pelo Carophyl 10, que mais se acentuou pela associação daqueles dois alimentos simples.
- d) Que a associação milho amarelo-farinha de luzerna no alimento composto determina uma nítida elevação dos teores médios de β -caroteno e xantofilas no soro sanguíneo e no fígado.
- e) Os teores médios de vitamina A no soro sanguíneo e no fígado não apresentam variações significativas em regimes alimentares como os empregados, todos eles suplementados com vitamina A estabilizada.

E. Z. N., 1963

RESUMO

Os autores estudaram, em regimes muito pobres em xantofilas, a acção pigmentante do Carophyl 10 sobre a gema de ovo e concluíram que, nas condições do ensaio, ela se revelou inferior à obtida com o milho amarelo e a farinha de luzerna.

SUMMARY

The influence of Carophyl 10 on egg yolk colour was studied in hens fed a low xanthophyl diet and was found that its action was lower than of yellow corn and alfalfa meal.

SOMMAIRE

L'influence du Carophyl 10 sur la coloration du jaune de l'oeuf est étudiée dans des poules pondeuses soumises à un régime pauvre en xanthophyles et il est vérifié que, dans les conditions de l'essai, son action est inférieure à la du maïs jaune et de la farine de luzerne.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — PALMER, L. S. e H. L. KEMPSTER, 1919 — *The influence of specific feeds and certain pigments on the color of the egg yolk and body fat of fowls* — J. Biol. Chem. 39:331-337.
- 2 — PETERSON, W. J., J. S. HUGHES e L. F. PAYNE, 1939 — *Avian Carotenoids*. Kansas State Agr. Bull. 46.
- 3 — DAY, E. J. e W. P. WILLIAMS, JR., 1958 — *A study of certain factors that influence pigmentation in broilers*. Poultry Sci. 37:1373 — 1381.
- 4 — BICKOFF, E. M., A. L. LIVINGSTON, A. F. BAILEY e C. R. THOMPSON, 1954 — *Alfafa carotenoids — xanthopylls in fresh and dehydrated alfafa*. J. Agr. Food Chem. 2:563-567.
- 5 — MARUSICH, W., E. DE RITTER e J. C. BAUERNFEIND, 1960 — *Evaluation of Carotenoid Pigments for Coloring Egg Yolks*. Poultry Science 39:1338-1345.
- 6 — STEINEGGER, P., K. STEIFF e P. ZELLER, 1957 — *Pigmentation of egg yolks and broilers by the addition of synthetic carotenoids to the poultry feed*. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 48:445.
- 7 — FERRANDO RAYMOND, 1962 — *Le β -apo-8' caroténal et la coloration du jaune d'oeuf*. Recueil de Médecine Vétérinaire, 138:547.
- 8 — MAYFIELD, H. L. e E. R. HALBROOK, 1949 — *Measurement of egg yolk color by means of the colorimeter*. Poultry Science 28:462-464.
- 9 — BOTH, V. H., 1945 — *Extraction and Estimation of Carotene from foodstuffs*. J. Soc. Chem. Ind. 63-162.
- 10 — Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists — 1950 7.^a Edição — 767.
- 11 — BICKOFF, E. M., A. L. LIVINGSTON, G. F. BARLEY e C. R. THOMPSON, 1954. — *Xanthophyll determination in dehydrated alfafa meal*. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists. 37:894-902.
- 12 — KOCH, F. C. e M. E. HANKE — *Practical methods in Biochemistry*. 1953-6.^a Edição — 414.
- 13 — KIMBLE, M. S. 1939 — J. Lab. Clin. Med., 24:1055.
- 14 — HAWK, P. B., B. L. OSER e W. H. SUMMERSON — *Practical Physiological Chemistry* — 1950-12.^a. Edição — 1047.