

**Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA
Departamento de Ciência de Alimentos**

**COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE**

**Milene Martins Berbel
Médica Veterinária**

**Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado
Orientador**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos**

**Campinas – SP
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B45c Berbel, Milene Martins
Composição nutricional e determinação simultânea de
vitaminas lipossolúveis em rações para frango de corte /
Milene Martins Berbel. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Marcelo Alexandre Prado
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Vitaminas. 2. Frango de corte – Alimentação e
rações. 3. Composição nutricional. 4. Cromatografia
líquida de alta eficiência (CLAE). I. Prado, Marcelo
Alexandre. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Nutritional composition and simultaneous fat soluble vitamin determination
in rations for cut chicken

Palavras-chave em inglês (Keywords): Vitamins, Broilers (chickens) – Feeding and feeds,
Nutritional composition, High Performance Liquid
Chromatography (HPLC)

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Marcelo Alexandre Prado

Helena Teixeira Godoy

Juliana Lima Pallone

Severino Matias de Alencar

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Marcelo Alexandre Prado
FEA – UNICAMP
PRESIDENTE

Helena Teixeira Godoy
FEA – UNICAMP
MEMBRO

Juliana Lima Pallone
PUC- CAMPINAS
MEMBRO

Severino Matias de Alencar
ESALQ - USP

Campinas, 2007

Dedico este trabalho à minha mãe,
Maria, ao meu padrasto, Naerso, e ao
meu marido, Henrique. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcelo Alexandre Prado, pela orientação e amizade.

À professora Helena Teixeira Godoy, pelo apoio.

À Universidade Estadual de Campinas, à Faculdade de Engenharia de Alimentos, ao Departamento de Ciência de Alimentos, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro e pela oportunidade de aprimoramento.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos e do Laboratório de Bioquímica de Alimentos.

À minha família, pelo apoio, paciência, e confiança que em mim depositam.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO 1.....	3
IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DAS VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS PARA A AVICULTURA DE CORTE E AS PRINCIPAIS METODOLOGIAS DE ANÁLISE – UMA REVISÃO.....	4
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
Revisão Bibliográfica.....	6
Vitamina A.....	6
Vitamina A para a nutrição de aves.....	7
Vitamina D.....	8
Vitamina D para nutrição de aves.....	9
Vitamina E.....	10
Vitamina E para a sanidade das aves.....	11
Relação entre vitamina E e produção e eclodibilidade dos ovos.....	13
Relação entre vitamina E e qualidade da carne.....	14
Vitamina K.....	15
Vitamina K para nutrição de aves.....	16
Níveis de Suplementação de Vitaminas Recomendados para Aves.....	17
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS.....	18
MÉTODOS DE ANÁLISE DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
Capítulo 2.....	34
DETERMINAÇÃO DE MACRONUTRIENTES EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
Determinação do teor de umidade.....	41
Determinação do teor de cinzas.....	42
Determinação do teor de lipídeos.....	42
Determinação de proteína.....	43
Determinação de fibras.....	43
Estimativa do valor de carboidratos.....	44

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
Umidade.....	44
Cinzas.....	45
Proteína.....	46
Lipídeos.....	47
Fibra bruta.....	48
Carboidratos.....	49
CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
Capítulo 3.....	54
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS A, D, E, K EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	55
RESUMO.....	55
ABSTRACT.....	56
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	58
Material.....	58
Equipamentos.....	59
Métodos.....	59
Validação da metodologia.....	61
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
Capítulo 4.....	69
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS EM AMOSTRAS DE RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	70
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
INTRODUÇÃO.....	71
MATERIAL E MÉTODOS.....	72
Materiais.....	72
Equipamentos.....	72
Métodos.....	73
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
CONCLUSÃO.....	82

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
CONCLUSÕES GERAIS.....	85

RESUMO GERAL

A avicultura está inserida em um mercado altamente competitivo, onde a alimentação equilibrada das aves é necessária para a máxima expressão do potencial genético e, conseqüentemente, para uma maior produtividade. Nesse contexto, a importância das vitaminas lipossolúveis, além de outros nutrientes, deve ser considerada, já que têm influência direta sobre o desenvolvimento da ave e sua sanidade. Neste trabalho, primeiramente foram avaliados os níveis de umidade, cinzas, lipídeos, proteína bruta e fibra bruta de 31 amostras de rações para frangos de corte, destinadas a diversas fases de crescimento. Para as análises de lipídeos, proteína bruta e fibra bruta, foram utilizados os métodos de Bligh & Dyer, Kjeldahl e fibra em detergente ácido, respectivamente. Para a análise simultânea das vitaminas lipossolúveis palmitato de retinila, *all-trans*-retinol, colecalciferol, ergocalciferol, α -tocoferol, δ -tocoferol, menadiona e filoquinona em rações para frangos, foi utilizado um método de extração simples (sólido-líquido) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a detecção foi utilizado um detector de arranjo de diodos (DAD), e os comprimentos de onda de 250nm para as vitaminas menadiona e filoquinona, 265nm para as vitaminas colecalciferol e ergocalciferol, 290nm para α -tocoferol, 300nm para δ -tocoferol, e 325nm para palmitato de retinila e *all-trans*-retinol. Os limites de detecção encontrados variaram de 0,105 $\mu\text{g/g}$ a 1,968 $\mu\text{g/g}$, e os coeficientes de variação, de 0,8% a 13,7%. As recuperações foram determinadas em rações para frangos, e os valores encontrados estavam entre 70,7% e 99,0%. Nas 31 amostras de rações para frangos de corte foram realizadas as quantificações das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, em suas diferentes formas, e, nenhuma das amostras apresentou resultado satisfatório. O método utilizado mostrou-se simples e de fácil aplicação para a análise de vitaminas lipossolúveis sintéticas adicionadas às rações, entretanto, não se mostrou eficiente para a análise das formas naturalmente presentes destas vitaminas.

ABSTRACT

The aviculture is inserted in a competitive market, where the correct poultry nutrition is necessary to the maximum expression of the genetic potential, and to increase the production, consequently. In this context, the importance of the fat-soluble vitamins, must be considered because its influence in development and health of animals. In this work, at first it was analyzed the levels of humidity, mineral, fat, crude protein and fibers in 31 samples of feed destined to poultry production. For the analysis of fat, crude protein, and fibers, it was used the Bligh & Dyer, Kjeldahl, and fiber in acid detergent, respectively. For the simultaneous analysis of the fat-soluble vitamins retinil palmitate, all-*trans*-retinol, cholecalciferol, ergocalciferol, α -tocopherol, δ -tocopherol, menadione and filoquinone in poultry feeds, it was used a solid-liquid method of extraction and a high performance liquid chromatography (HPLC) method. For the detection, it was used a DAD detector, and the wavelengths 250nm for vitamins filoquinone and menadione, 265nm for vitamins cholecalciferol and ergocalciferol, 290nm for α -tocopherol and 325nm for retinil palmitate and all-*trans*-retinol. Minimum amounts detectable were between 0,105 μ g/g and 1,968 μ g/g, and the variation coefficients values were between 0,8% and 13,7%. The recovery was determined in poultry feeds, and the values were between 70,7% and 99,0%. It was determined the vitamins A, D, E and K, and none of the samples showed values according to that recommended, for all vitamins analyzed simultaneously. The method used in this work is easily applicable and efficient for the vitamins retinil palmitate, cholecalciferol, α -tocopherol and menadione, however, the extraction method used for the vitamins all-*trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocopherol and filoquinone needs more studies.

Capítulo 1

IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DAS VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS PARA A AVICULTURA DE CORTE E AS PRINCIPAIS METODOLOGIAS DE ANÁLISE – UMA REVISÃO

Berbel, M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciência de Alimentos

Capítulo 1

IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DAS VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS PARA A AVICULTURA DE CORTE E AS PRINCIPAIS METODOLOGIAS DE ANÁLISE – UMA REVISÃO

Berbel, M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciência de Alimentos

RESUMO

Vários trabalhos demonstram a importância da utilização correta das vitaminas na nutrição avícola. Isto ocorre principalmente pela avicultura estar inserida em um mercado altamente competitivo, onde a alimentação equilibrada é necessária para a máxima expressão do potencial genético e, conseqüentemente, para uma maior produtividade. Nesse contexto, a importância das vitaminas lipossolúveis deve ser considerada, já que tem influência direta sobre o desenvolvimento da ave e sua sanidade. Diversos são os métodos para a determinação de vitaminas em alimentos. Entretanto, para a detecção das vitaminas lipossolúveis, a extração com solventes orgânicos seguida da determinação pela cromatografia líquida de alta eficiência, é uma das técnicas mais utilizadas.

ABSTRACT

Countless papers show the importance of the utilization of correct vitamins levels in the poultry nutrition. This occurs mainly because the poultry production is insert in a competitive market, where the well-balanced nutrition is necessary to the maximum expression of the genetic potential, and, consequently, to an improved production. In this context, the importance of the fat-soluble vitamins must to be

considered, because they influence the poultry development and the sanitary. The methods to determine vitamins of foods are several. However, the extraction of fat-soluble vitamins with organic solvents, and their determination with high-performance liquid chromatography, are the more used techniques.

INTRODUÇÃO

A produção de carne de frango no Brasil, em 2006, foi de 9,4 milhões de toneladas, sendo que 2,6 milhões de toneladas foram exportadas. O consumo per capita foi de 36,0 kg por pessoa, e espera-se que em 2007 seja de 37,5 kg por pessoa (Quevedo, 2006). O enorme crescimento na produção de frangos, proporcionando a oferta de carne de qualidade a baixo custo, somente foi possível devido à evolução da avicultura nas áreas de genética, sanidade, manejo, ambiência e nutrição. Quanto à nutrição, houve um grande avanço, principalmente em relação às necessidades nutricionais das aves em diferentes idades e frente a diferentes desafios, e sabe-se que a suplementação vitamínica auxilia para que o máximo desenvolvimento das aves seja alcançado.

As vitaminas são nutrientes essenciais para o desenvolvimento animal, não porque são fontes de energia, mas sim, por participarem como cofatores em reações metabólicas e permitir a maior eficiência dos sistemas de síntese no organismo animal. As vitaminas são classificadas em hidrossolúveis e lipossolúveis, sendo que a deficiência das mesmas na dieta pode causar distúrbios irreversíveis para o crescimento e desenvolvimento animal. As aves têm capacidade de síntese de algumas vitaminas, no entanto, a adição dos complexos vitamínicos nas dietas de frangos garante o bom desenvolvimento, e respostas importantes para a sanidade animal, como, por exemplo, a resposta imune (Macari *et al.*, 2002).

Os processos tecnológicos para a fabricação de rações são extremamente agressivos (mistura, temperatura e pressão), o que causa uma grande perda de vitaminas: de 5% a 50% na peletização (Coelho, 1996), e 12% a 100% na extrusão (Schulde, 1986). As formas sintéticas das vitaminas lipossolúveis

possuem maior estabilidade; entretanto, sua biodisponibilidade é reduzida (Annonier, *et al.*, 1995; Villamide *et al.*, 1999).

A suplementação extra com vitaminas para melhorar a resposta imunológica, ou reduzir os efeitos do estresse calórico, pode ser considerada no contexto de condições ambientais adversas presentes nos sistemas intensivos de produção. Quando se utiliza uma grande suplementação como tentativa de melhorar a qualidade dos produtos, a taxa entre o custo da vitamina e o lucro adicional deve ser avaliada para se decidir pelo nível ótimo de vitaminas na ração. Em alguns casos isto implica na adição de algumas vitaminas separadamente do premix (Villamide *et al.*, 1999).

A adição de uma ou mais vitaminas é muito variável para uma mesma classe animal, ocorrendo variações em função da temperatura ambiente, manejo geral e estado sanitário do plantel. Há ainda que se considerar outros fatores externos importantes que afetam a estabilidade das vitaminas, tais como temperatura ambiente, umidade relativa do ar, umidade da ração, tempo de armazenagem, forma física da ração, entre outros. São comuns as recomendações de aumento dos níveis de vitaminas quando as rações são submetidas a processos de granulação ou extrusão (Faria e Junqueira, 2000).

Revisão Bibliográfica

Vitamina A

A vitamina A, ou retinóides, são sensíveis à oxidação e peroxidação, particularmente na presença de metais do grupo de transição. Devido ao seu sistema de duplas-conjugadas, os retinóides podem ser caracterizados e quantificados pelo seu espectro de absorção no ultra-violeta e, frequentemente por sua fluorescência. São alguns retinóides que ocorrem naturalmente: retinol (**Figura 1**), retinal, ácido retinóico e palmitato de retinila. Os retinóides são, geralmente, lipofílicos, muito mais solúveis em solventes orgânicos do que em sistemas aquosos (De Leenheer, 2000).

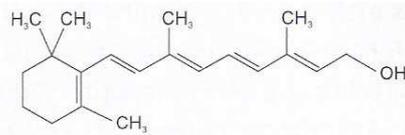


Figura 1 - Estrutura química do retinol.

Devido à instabilidade química dos retinóides, os padrões estão frequentemente contaminados com seus produtos de degradação. Além disso, os retinóides geralmente estão presentes em pequenas quantidades em amostras biológicas. Por isso, as soluções padrões devem ser quantificadas por sua absorvância (De Leenheer, 2000).

Vitamina A para a nutrição de aves

A vitamina A não está presente nos produtos de origem vegetal, no entanto, seus precursores, os carotenos, estão presentes nas mais diferentes formas. Esses compostos são denominados pró-vitaminas, uma vez que o organismo das aves é capaz de transformá-los na vitamina A ativa. O β -caroteno é composto por duas moléculas de vitamina A, porém, existem compostos ainda no grupo dos carotenóides que não se transformam em vitamina A. Sob condições normais, as aves obtêm o equivalente a uma molécula de vitamina A, para cada molécula de β -caroteno (Faria e Junqueira, 2000).

A vitamina A apresenta papel importante na visão, reprodução, manutenção do tecido epitelial, síntese de mucopolissacarídeos, controle da estrutura de membranas celulares, síntese de corticosteróides, utilização de proteínas, pressão do fluido cérebro-espinhal, síntese de DNA e RNA, e desenvolvimento do tecido ósseo. Com exceção das funções de visão e reprodução, o ácido retinóico executa todas as funções da vitamina A. O retinol e o retinal são essenciais para a visão e reprodução, tanto em machos como em fêmeas. O ácido retinóico auxilia no crescimento de animais jovens (Macari *et al.*, 2002).

Nas rações dos animais, a vitamina A é usada nas formas de ésteres como acetato, propionato ou palmitato, apresentando-se com uma coloração clara e solúvel em gordura. Apesar de ser apresentada em forma protegida, a vitamina A é sensível aos ácidos, à luz, ao calor e ao oxigênio. A presença de umidade e traços minerais pode reduzir sua atividade nas rações (Faria e Junqueira, 2000).

Os sinais clínicos de deficiência de vitamina A são similares entre as espécies de aves. No entanto, a exigência diária é diferente entre e dentro das espécies. A apresentação clínica de hipovitaminose A depende da quantidade de vitamina A presente na dieta e das reservas hepáticas da ave. A deficiência dessa vitamina resulta em retardo no crescimento, sonolência, debilidade nas patas, diminuição da resistência às doenças, e incoordenação muscular. Paralelamente, ocorrem distúrbio no aparelho respiratório, acompanhado de lacrimejamento excessivo e acúmulo de exsudato purulento nos olhos (Faria e Junqueira, 2000; Macari *et al.*, 2002).

Vitamina D

A vitamina D pertence a um grupo de compostos químicos lipossolúveis que possuem a propriedade de prevenir ou curar a osteopenia. De todos esses compostos, somente um, o colecalciferol (vitamina D₃) possui efeito curativo em aves. O colecalciferol é produzido na pele por irradiação do 7-desidrocolesterol, por ação dos raios ultravioleta do sol, ou pode ser adicionado na dieta na forma sintética (Macari *et al.*, 2002).

Outro composto denominado de ergocalciferol (vitamina D₂) é produzido por irradiação do ergosterol e possui propriedades muito limitadas como fator anti-osteopenia para aves. A vitamina D na forma D₃ se encontra em elevadas concentrações em óleos de peixe e, em especial, no fígado. Na maioria dos ingredientes, a vitamina D aparece em concentrações relativamente baixas (Macari *et al.*, 2002). As estruturas das vitaminas D₂ e D₃ e suas pró-vitaminas podem ser observadas na **Figura 2**.

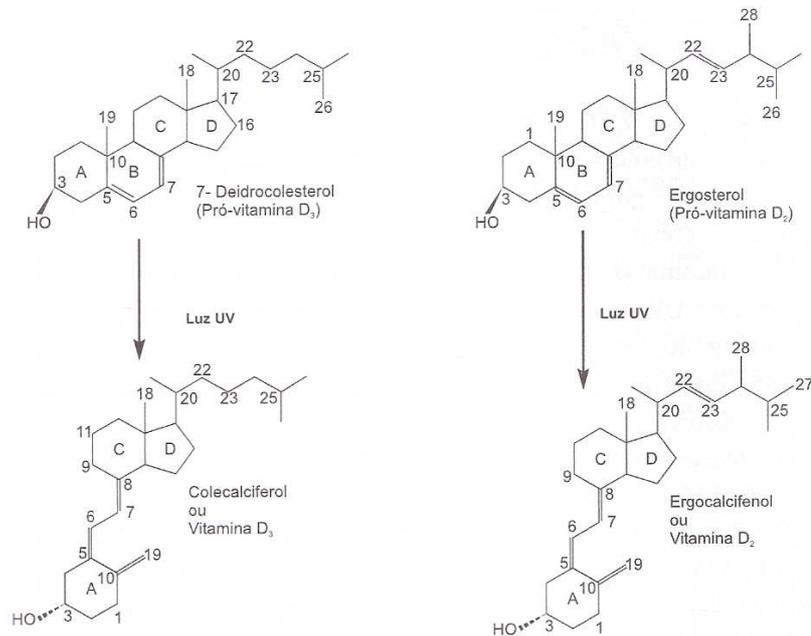


Figura 2 – Estruturas da vitamina D e suas pró- vitaminas.

Vitamina D para nutrição de aves

A vitamina D atua basicamente em três locais: no intestino, nos ossos e nos rins. A vitamina D atua no intestinal e, no duodeno participa da síntese da proteína transportadora de cálcio. A mesma proteína também foi encontrada nos rins. Além dessa proteína, a fosfatase alcalina e a adenosina trifosfato cálcica também respondem ao estímulo da vitamina D. No tecido ósseo, a mobilização do cálcio do osso para o fluido extracelular ocorre a partir de uma ação conjunta da 1,25-(OH)₂D₃ e do hormônio da paratireóide. Além disso, a vitamina D participa da biossíntese do colágeno (Macari *et al*, 2002).

Observações com vários animais indicam que infecções respiratórias são mais comuns em animais deficientes em vitamina D, ocorrendo suspensão imunológica e da resposta inflamatória. Além disso, a ativação de macrófagos, produção de citocinas e número de células pluripotentes são afetados adversamente em mamíferos deficientes em vitamina D (Macari *et al.*, 2002).

A deficiência de vitamina D em aves manifesta-se principalmente com sinais de debilidade, andar sobre os tarsos e em seguida ocorre a prostração, com sinais clínicos idênticos aos causados pela deficiência de cálcio ou de fósforo. Esse quadro é característico de raquitismo (Faria e Junqueira, 2000).

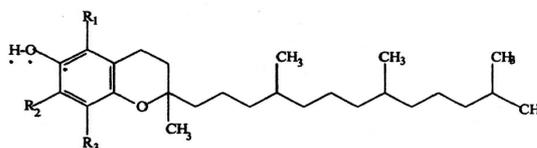
Vitamina E

Emerson *et al.* (1937) descreveram a existência de vários homólogos da vitamina E, que na natureza ocorriam em oito diferentes formas (α -, β -, γ - e δ -tocoferol e α -, β -, γ - e δ -tocotrienol), e variavam em suas atividades biológicas. Os tocoferóis têm sido estudados intensivamente quanto às suas características médicas, biológicas e físico-químicas (Pika e Sliwiok, 2001); sendo que as propriedades biológicas do α -tocoferol são de particular importância, devido à sua maior atividade (Hosomi *et al.*, 1997).

O tocoferol possui três carbonos assimétricos (2°, 4° e 8°), desse modo, aceitam-se oito estereoisômeros. A síntese orgânica pela reação de trimetilhidroquinona com isofitol resulta em uma mistura equimolar dos oito isômeros possíveis, conhecida como all-rac- α -tocoferol. Entretanto, em plantas, ocorre síntese de enantiômeros específicos e somente as formas RRR das 4 formas possíveis dos tocoferóis estão presentes em amostras de origem natural, sem adição de vitamina E sintética (Ruperéz *et al.*, 2001). A forma all-rac- α -tocoferol é a mais comumente utilizada como suplemento em rações animais (Scherf *et al.*, 1996).

Segundo Sebrell & Harris (1972) a atividade antioxidante dos tocoferóis e tocotrienóis se deve principalmente à habilidade de doar o hidrogênio fenólico ao radical livre. *In vivo*, a relativa atividade antioxidante dos tocóis está na ordem: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, mas a ordem é inversa quando a potência antioxidante é comparada em gorduras, óleos e lipoproteínas *in vitro* (Kamal-Elmin & Appelqvist, 1996). Algumas características físico-químicas dos tocoferóis podem ser observadas no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Estrutura, massa molar (M), coeficiente de partição segundo Rekker (log *P*) e atividade dos tocoferóis.



Composto	R ₁	R ₂	R ₃	M (g/mol)	Log <i>P</i>	Atividade (%)
DL- α -tocoferol	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	430.71	12.37	100
DL- β -tocoferol	-CH ₃	-H	-CH ₃	416.68	11.86	38.1 \pm 9.3
DL- γ -tocoferol	-H	-CH ₃	-CH ₃	416.68	11.86	8.9 \pm 0.6
DL- δ -tocoferol	-H	-H	-CH ₃	402.65	11.36	1.6 \pm 0.3

Fonte: Pyka e Sliwiok, 2001.

Em mamíferos, a vitamina E é transportada do intestino para os capilares linfáticos. Já nas aves, o tocoferol é transportado diretamente para o fígado, pela veia porta. A vitamina E circula pelo sangue ligada a todas as classes de lipoproteínas, e não há uma proteína transportadora conhecida que seja específica para o α -tocoferol (Scherf *et al.*, 1996).

Vitamina E para a sanidade das aves

Fatores relacionados à genética das aves, à frequência de exposição a patógenos, à virulência dos patógenos e à eficiência dos programas de vacinação são de extrema importância na incidência de doenças infecciosas no plantel. Entretanto, as características da dieta podem modular a susceptibilidade das aves

aos desafios infecciosos e, sendo assim, sutis influências devido aos níveis de nutrientes ou tipos de ingredientes podem ter grande importância (Klasing, 1998).

Os sistemas antioxidantes têm um importante papel no desenvolvimento embrionário da ave. Há três grandes níveis de defesa antioxidante. O primeiro inclui as enzimas superóxido-dismutase, glutathione peroxidase e catalase. Este nível é responsável pela prevenção da formação de radicais livres pela remoção do ânion superóxido, o principal radical livre formado durante o metabolismo celular (Jaeschke, 1995). Este primeiro nível de defesa antioxidante não é suficientemente efetivo para prevenir completamente a formação de radicais livres e a peroxidação lipídica. O segundo nível de defesa antioxidante, consiste de vitaminas lipossolúveis (principalmente vitamina E) e vitaminas hidrossolúveis (principalmente ácido ascórbico). O terceiro nível de defesa antioxidante consiste na produção de enzimas específicas para o reparo de danos e reconstrução de membranas. No embrião, a vitamina E e os carotenóides são acumulados no fígado durante a embriogênese, atingindo um nível máximo para a eclosão. Este acúmulo é considerado um mecanismo adaptativo para prevenir a peroxidação lipídica durante as condições de estresse da eclosão (Surai e Sparks, 2001).

Observações prévias indicam que a dieta da mãe e, subsequente, a composição da gema são responsáveis por um papel crucial no desenvolvimento e eficiência dos sistemas antioxidantes do embrião. A suplementação da dieta da mãe com vitamina E, carotenóides ou selênio, aumenta significativamente a atividade de sistemas antioxidantes do embrião, reduzindo a susceptibilidade à peroxidação lipídica dos tecidos (Surai e Sparks, 2001).

Os níveis de estoque da maioria das vitaminas e traços minerais na incubação estão altamente correlacionados aos níveis da dieta das matrizes. Estoques suficientes reduzem os danos aos pintinhos, ocasionados por uma possível deficiência na dieta, durante os primeiros dias de vida após a eclosão, quando o sistema imunológico e os intestinos estão se desenvolvendo. As vitaminas A, E e D têm funções regulatórias nas células do sistema imunológico. Em pintinhos, a vitamina E reduz a liberação de prostaglandinas e modula a

liberação de citocinas dos leucócitos estimulados (Romack *et al.*, 1993). Portanto, pode-se considerar a dieta da matriz tão importante quanto a dieta do pintinho.

A defesa local antioxidante é facilitada pela presença de quantidade adequada de vitamina E nas membranas celulares e por altos níveis de vitamina C no citosol. A deficiência de vitamina E ou selênio resulta na peroxidação de lipídios nas membranas celulares e aumento dos sinais de danos funcionais na resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo de *Salmonella minnesota* (Sword *et al.*, 1991).

Uma das mais importantes enfermidades das aves, particularmente frangos de corte, é a coccidiose. Assim, os efeitos dessa doença sobre o desempenho produtivo de frangos de corte podem ser intensificados quando se utilizam rações deficientes em vitamina E. Um exemplo é citado por Conalço *et al.* (1984), que inocularam oocistos de *Eimeria tenella* em frangos de corte com 25 e 32 dias de idade alimentados com ração com e sem adição de 100 UI/vitamina E/kg de ração. Os autores mostraram que a suplementação de vitamina E proporcionou respostas positivas no ganho de peso e redução de mortalidade das aves.

A deficiência de vitamina E em aves resulta em pelo menos três condições patológicas: diátese exudativa com sinais de edema subcutâneo, encefalomalácea e, quando a deficiência de vitamina E é acompanhada também por deficiência de metionina e cistina, as aves se apresentam com sérios problemas de distrofia muscular, principalmente no músculo do peito. A adição de selênio é efetiva para prevenir a distrofia muscular, porém isso só ocorre quando a ração contém certa quantidade, mesmo que insuficiente de vitamina E. A exigência da ave por selênio é maior quando a ração contém níveis insuficientes de vitamina E e aminoácidos sulfurosos (Back, 2002).

Relação da vitamina E com a produção e a eclodibilidade dos ovos

O estresse calórico crônico é conhecido por causar efeitos adversos em aves de postura como, redução na ingestão de alimentos (Miller e Sunde, 1975), redução no número e peso dos ovos produzidos (Smith, 1974) e redução da

espessura da casca (Ahvar *et al.*, 1981; Bollengier-Lee *et al.*, 1999). Diversos trabalhos mostraram tentativas de se reduzir as conseqüências do estresse calórico através de modificações na nutrição (Leeson, 1986). Uma deficiência prolongada de Vitamina E pode resultar em esterilidade permanente. A eclodibilidade dos ovos oriundos de galinhas que receberam rações deficientes em vitamina E é reduzida, com mortalidade embrionária alta após quatro dias de incubação (Faria e Junqueira, 2000).

Bollengier-Lee *et al.* (1998; 1999) e McIntosh *et al.* (1993), demonstraram que a suplementação com α -tocoferol pode aliviar os efeitos do estresse calórico crônico em aves de postura. A suplementação com vitamina E aumentou a produção de ovos em aves estressadas por um período de quatro semanas, além de fazer com que retornassem à produção normal mais rapidamente após o estresse. A suplementação com 250 mg/Kg de ração se mostrou suficiente para a obtenção desses resultados, e também para reduzir a queda na concentração de vitamina E do plasma e fígado durante o estresse. A proteção do fígado mediada pela vitamina E pode melhorar a produção e/ou exportação de precursores da gema do ovo, e assim aumentar a produção de ovos durante o estresse calórico.

A concentração de tocoferóis na gema do ovo depende do quanto é fornecido desta vitamina na dieta. Altos níveis de vitamina E nas dietas resultam em concentrações substanciais na gema do ovo (Surai e Sparks, 2001).

Relação entre vitamina E e qualidade da carne

A oxidação de lipídios é um determinante importante para a vida de prateleira de carnes e produtos cárneos. As mudanças bioquímicas após o abate, envolvidas na conversão do músculo em carne, são acompanhadas pela perda celular das defesas antioxidantes e um aumento na propensão dos lipídios das carnes a sofrerem oxidação (Morrissey *et al.*, 1994; O'Neill *et al.*, 1998). Isto contribui para mudanças indesejáveis em diversos parâmetros de qualidade, incluindo a perda da capacidade de reter água, textura e sabor. Em carnes processadas, a oxidação é ainda mais acelerada pelo rompimento das

membranas dos músculos, o que facilita muito a interação dos lipídios com pró-oxidantes (O'Neill *et al.*, 1998).

O α -tocoferol é depositado nas membranas subcelulares em posições adjacentes às cadeias de fosfolipídios, e é um eficiente seqüestrador de radicais livres (Buettner, 1993). A adição de α -tocoferol às dietas animais é um meio efetivo de melhorar a estabilidade das carnes quanto à oxidação, além de melhorar o sabor (Sheldon *et al.*, 1997; O'Neill *et al.*, 1998).

Vitamina K

Vitamina K é o nome utilizado para um grupo de moléculas que possuem a estrutura 2-metil-1,4-naftoquinona, mas com diferenças na cadeia de carbonos ligada à posição 3 da naftoquinona. O número de átomos de carbono desta cadeia é utilizado para caracterizar as diferentes moléculas (De Leenheer, 2000).

A vitamina K extraída dos vegetais é denominada filoquinona ou vitamina K₁. Quando sua síntese se dá através da fermentação microbiana, sua denominação é menaquinona ou vitamina K₂. A forma mais comum da vitamina K é a menadiona (K₃), obtida sinteticamente (Faria e Junqueira, 2000). As três formas da vitamina K podem ser observadas na **Figura 3**.

A vitamina K₁ é lentamente destruída pelo oxigênio atmosférico, mas rapidamente destruída pela luz. Ao contrário da vitamina K obtida de produtos naturais, a menadiona é sintética e hidrossolúvel. Devido a esta característica hidrossolúvel, a menadiona é absorvida mesmo em baixos níveis de gordura (Macari *et al.*, 2002).

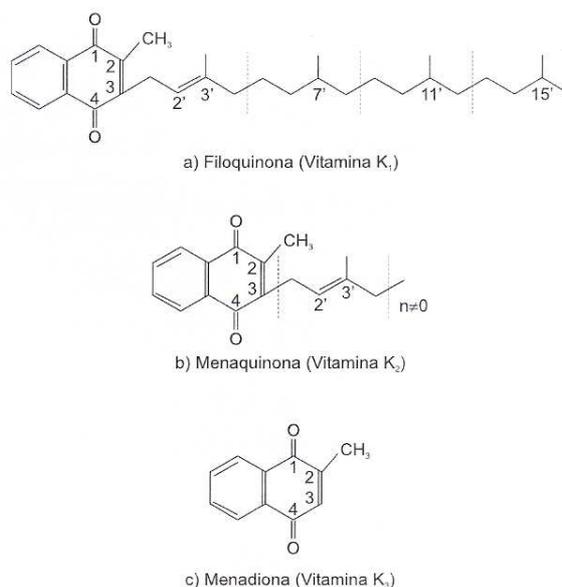


Figura 3 – Estruturas químicas da vitamina K: a) Filoquinona (Vitamina K₁); b) Menaquinona (Vitamina K₂); c) Menadiona (Vitamina K₃).

Vitamina K para nutrição de aves

Esta vitamina é denominada de vitamina anti-hemorrágica porque sua principal função é participar da síntese de pró-trombina. A vitamina K é indispensável para a formação de pelo menos 6 proteínas plasmáticas, quatro delas envolvidas no processo de coagulação sangüínea. O sinal clínico mais evidente na deficiência de vitamina K é o aumento do tempo de coagulação sangüínea, seguido da diminuição dos níveis sangüíneos de pró-trombina e hemorragia. As lesões hemorrágicas têm importância econômica, pois as carcaças podem ser total ou parcialmente condenadas no abatedouro (Macari *et al.*, 2002). Nas formas mais severas de deficiência, as hemorragias do tecido subcutâneo e das mucosas são seguidas de morte da ave (Faria e Junqueira, 2000).

Níveis de suplementação de vitaminas recomendados para aves

Os níveis recomendados de vitamina A são, na sua maioria, entre 1500 UI/Kg a 28000 UI/Kg da dieta. A influência dos níveis de vitamina A na dieta sobre a performance das aves tem sido pesquisada, e diferentes resultados têm sido obtidos. Aburto e Britton (1998) relataram que o peso corporal das aves reduziu quando a dieta foi suplementada com 80000 UI/Kg. Zhang *et al.*, (2000) demonstraram que o ganho de peso reduziu significativamente quando a dieta foi suplementada com 8800 UI/Kg em contraste a 2700 UI/Kg na dieta controle. Abawi e Sullivan (1989) demonstraram que a eficiência de dietas para frangos foi afetada significativamente pela suplementação com vitamina A nos níveis 1000, 10000 e 100000 UI/Kg. A melhor eficiência foi obtida com a suplementação de 1000 UI/Kg. Song e Lin (2004) relataram que a performance das aves foi melhor quando utilizada uma suplementação de 12000 UI/Kg de ração.

Quanto à vitamina D₃, seu fornecimento em quantidade 100 vezes maior que a recomendação provoca retardo no crescimento, eriçamento das penas e poliúria. Caso a vitamina seja oferecida em níveis 1000 vezes mais elevados do que o recomendado haverá um retardamento marcado no crescimento, eriçamento de penas, poliúria, desidratação, incoordenação de movimentos e debilidade nas patas. Pode ocorrer mortalidade elevada caso a intoxicação perdure por várias semanas (Macari *et al.*, 2002).

O National Research Council (1994) recomenda 200 UI de vitamina D₃ por Kg de ração para frangos que tenham até 21 dias de idade. Entretanto, estudos conduzidos em ambientes sem luz UV, indicaram que os requerimentos de vitamina D₃ para aves jovens são superiores aos recomendados pelo NRC (Kasim e Edwards, 2000). Fritts e Waldroup (2003) observaram uma redução na incidência e severidade de discondroplasia tibial quando as aves receberam suplementação de 4000 UI D₃/Kg de ração. Mais recentemente, McCormack *et al.* (2004) relataram que 10000 UI D₃/Kg de ração previne quase que completamente a discondroplasia tibial.

A suplementação com vitamina E recomendada para aves varia de 14 UI/Kg de ração a 35 UI/Kg de ração, de acordo com as Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (Rostagno *et al.*, 2005). Entretanto, esses níveis podem ser aumentados em situações de estresse das aves ou quando se deseja melhorar a qualidade da carne, como citado anteriormente.

A vitamina K, em sua forma natural, é praticamente atóxica, mesmo quando oferecida em níveis elevados. Entretanto, o contrário ocorre com a forma sintética, que pode provocar alta mortalidade de pintos (Macari *et al.*, 2002).

No **Quadro 2** pode-se observar os níveis de vitaminas lipossolúveis recomendados pelas Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos para frangos de corte e aves de reposição.

Quadro 2 – Níveis de suplementação de vitaminas lipossolúveis para rações de aves (quantidade por kg de ração).

Vitamina	Fase de desenvolvimento das aves		
	Inicial	Crescimento	Retirada
A (UI)	10000	8000	4000
D ₃ (UI)	2000	1600	800
E (UI)	35	28	14
K ₃ (mg)	1,7	1,4	0,7

Fonte: Rostagno *et al.*, 2005.

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS

A determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos e fármacos, que normalmente são amostras sólidas ou semi-sólidas, envolve uma extração prévia normalmente com solventes orgânicos. As vitaminas D e E são extraídas individualmente com diversos solventes como: diclorometano, dietil-éter, e hexano, ou misturas destes. A vitamina E também tem sido extraída de alimentos com etanol ou hexano, utilizando o método de Soxhlet, que é recomendado como método oficial. Misturas de 2-propanol e hexano tem sido utilizada para a extração de vitamina K de várias matrizes. A vitamina A tem sido extraída com a utilização

de hexano, dietil-éter e CHCl_3 -acetona, entre outros (Luque-Garcia e Castro, 2001).

A extração simultânea de vitaminas de alimentos é muito comum. Li *et al.* (1996) utilizaram um método de extração combinado, para a extração seqüencial das vitaminas lipossolúveis A, α -E, D_3 e K_3 de alimentos. Qian e Sheng (1998) desenvolveram um método para a extração de vitaminas lipossolúveis em rações, sem a utilização da saponificação, onde foram avaliados diferentes solventes, tamanho de partícula da amostra, proteção das vitaminas e tempo de contato com os solventes. Foram obtidos resultados consistentes em comparação aos resultados obtidos com o método da AOAC.

A vitamina E extraída da amostra, em muitos casos, precisa ser concentrada. Entretanto, se condições adequadas não forem utilizadas para liberar as vitaminas da matriz, a recuperação pode ficar prejudicada. As amostras podem ser tratadas com solventes orgânicos, para que se possam romper estruturas com as quais a vitamina E possa estar associada (membranas, lipoproteínas ou gotículas de gorduras), para eliminar a interferência de moléculas grandes como as proteínas ou carboidratos, que são insolúveis em fases orgânicas, e para fornecer um meio no qual a vitamina E esteja livre e em solução. Como solvente orgânico, quase sempre se utiliza o etanol, mas o metanol também pode ser utilizado. O dodecil sulfato de sódio pode ser utilizado como modificador previamente à extração. O tratamento da amostra para a análise de vitamina E freqüentemente inclui a saponificação de toda a matriz, ou da fração lipídica isoladamente. Os solventes mais utilizados para a extração de vitamina E são: clorofórmio-metanol (2:1), acetona, dietil-éter, e para a extração por Soxhlet pode ser utilizada uma grande variedade de solventes. O hexano, adicionado ou não de pequenas quantidades de solventes mais polares, como etanol, acetato de etila, ou éter diisopropílico (quantidade inferior a 5%), é o solvente mais utilizado para a extração (Ruperéz *et al.*, 2001; Ruperéz *et al.*, 1998).

Silva (2003) avaliou diferentes procedimentos para a extração de tocoferóis de macadâmia. A extração de lipídeos foi avaliada pelo método de Soxhlet, Bligh-Dyer, e extração com solventes orgânicos, com e sem desintegração,

saponificação a quente em amostra enriquecida. Para a extração de lipídeos, notou-se maior eficiência na utilização de acetona com desintegração. O método Bligh-Dyer também se mostrou eficiente, entretanto houve grande formação de emulsão. Para a extração dos tocoferóis, se notou maior eficiência na utilização de acetona (50mL + 2 x 30 mL), com duração de 1 minuto cada extração.

Alguns trabalhos utilizam a hidrólise enzimática para a extração de vitaminas lipossolúveis. O uso de algumas lipases específicas é uma alternativa atraente para a extração das formas esterificadas das vitaminas A e E, embora dificilmente se estabeleça a exaustão na hidrólise causada, principalmente, pelas diferenças de fonte enzimática e sua bioatividade (Paixão e Stamford, 2004).

Uma outra opção para a extração de vitaminas lipossolúveis de matrizes complexas é o uso de fluidos supercríticos. O uso desta técnica demonstrou ser uma alternativa interessante na substituição dos solventes orgânicos. As principais vantagens na utilização dos fluidos supercríticos em vez dos solventes orgânicos convencionais são: a redução no consumo de solventes orgânicos, a ausência de oxigênio durante a extração e a redução na temperatura de extração (Turner *et al.*, 2001).

MÉTODOS DE ANÁLISE DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS

Desde o surgimento da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a maioria dos pesquisadores tem utilizado esta técnica para a análise dos mais diversos compostos. A CLAE tem substituído a Cromatografia Gasosa (CG) devido à facilidade no preparo da amostra e a temperatura utilizada na coluna, que é menos severa em relação à temperatura utilizada na CG, prevenindo, desse modo, a degradação das substâncias analisadas (Abidi, 2000; Silva, 2003). Também são vantagens da CLAE sua grande flexibilidade e aplicabilidade a diferentes matrizes, como produtos farmacêuticos, alimentos, fluidos e tecidos biológicos e tabletes multi-vitamínicos (De Leenheer *et al.*, 1992, Silva, 2003).

As colunas utilizadas em CLAE apresentam características polar (fase normal), ou apolar (fase reversa). As colunas de fase normal são, freqüentemente,

de sílica, ou sílica modificada com grupos polares como CN ou NH₂. Utiliza-se muito o hexano com pequenas quantidades de 2-propanol ou clorofórmio como fase móvel. As colunas de fase reversa são, normalmente, ODS (C₁₈) ou C₈, e, mais recentemente, C₃₀. A cromatografia de fase reversa é preferida por sua maior estabilidade e robustez em relação à de fase normal. As colunas de fase normal são muito sensíveis a pequenas mudanças na fase móvel e necessitam de um longo período de estabilização antes de sua utilização. Entretanto, sua utilização é interessante para amostras que contêm grande quantidade de lipídeos (Gundersen e Blomhoff, 2001).

A CLAE é muito utilizada para a análise de *all-trans*-retinol. Colunas C₁₈ com fases móveis de metanol:água ou acetonitrila:água são muito eficientes para a análise de retinóides extraídos de amostras biológicas (De Leenher, 1979; De Leenher, 2000).

Os retinóides nas formas de ésteres, com longas cadeias de ácidos graxos são as principais formas de estoque da vitamina A, especialmente no fígado e outros tecidos. A cromatografia de fase-reversa é, geralmente, eficiente na separação desses homólogos, que diferem pelo seu comprimento de cadeia. O oleato de retinila e o palmitato de retinila são os compostos que apresentam maior dificuldade na separação. Em geral, fases móveis contendo metanol como principal solvente (com ou sem modificadores como tetraidrofurano ou tolueno), separam bem retinil laureato, miristato, palmitato, e estereato, mas não o retinil oleato do palmito (Dawson e Hobbs, 1994; Frickel, 1984).

Cia *et al.* (1999) desenvolveu um método para a separação de isômeros de retinol. Para isso utilizou um sistema isocrático, com duas colunas Vydac C₁₈ em série, com acetato de amônio-acetonitrila (40:60 v/v) como fase móvel.

Um método rápido para a determinação de vitamina A em leite materno foi desenvolvido por Strobel *et al.* (2000), utilizando uma coluna Grom-Sil-CN-2PR, 250 x 4,6 mm, com 3 µm de diâmetro de partícula, e n-hexano-2-propanol (98:2 v/v) como fase móvel.

Colunas Microbore de 250 x 2,1 mm são ideais para a análise de microquantidades de metabolitos de vitamina D, com a utilização de UV para a

detecção, mas não são as ideais para a análise de 25-OH-D₃ em plasma humano. Colunas com partículas de 3µm são ideais para a análise de amostras biológicas, desde que tolerem grande quantidade de amostras injetadas (De Leenher, 2000). Iwase (2000a) desenvolveu um método simples, rápido, e de boa reprodutibilidade, para a análise de vitamina D₂ em suplementos nutricionais, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, com coluna Intersil ODS-2, 5 µm diâmetro de partícula 15 x 0,46 cm, e fase móvel composta por metanol e etanol.

As propriedades químicas da vitamina K, como sua característica lipofílica e neutra, permite a utilização de diversos sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto, o principal problema na análise de vitamina K é sua baixa concentração em matrizes biológicas complexas, e a presença de um grande número de compostos lipídicos (De Leenheer, 2000). Iwase (2000b) desenvolveu um método altamente seletivo para a determinação de vitamina K₁ em amostras com alto teor de lipídeos, com coluna Intersil ODS-2, e metanol e etanol como fase móvel.

Para a vitamina E, uma grande variedade de métodos tem sido descritos. A cromatografia líquida de alta eficiência, com coluna de fase normal ou reversa, e detectores de fluorescência ou UV, tem sido amplamente utilizados.

Em relação à coluna cromatográfica, a de fase reversa é preferida para a determinação de vitamina E pela excelente reprodução do tempo de retenção, rápido equilíbrio e robustez da coluna, além de permitir melhores ajustes para a separação dos interferentes. Na fase reversa, o α -tocoferol é primeiramente eluído, sendo seguido pelos β - e γ - tocoferol, e por último, o δ -tocoferol (Ake *et al.*, 1998; Sobczac *et al.*, 1999; Gimeno *et al.*, 2000; Mendonza *et al.*, 2003). Tem sido reportada a separação dos homólogos β - e γ - tocoferol em coluna de fase reversa C₃₀ (Schieber *et al.*, 2002), pentafluorofenil (PFPS) e octadecil polivinil álcool (ODPVA) (Abidi e Mounts, 1997; Kamal-Eldin *et al.*, 2000).

Quando a separação dos compostos β - e γ -tocoferol não é o objetivo do trabalho, normalmente as colunas de fase reversa são as preferidas. Em alguns

métodos, temperaturas maiores que a temperatura ambiente tem sido utilizadas para se obter uma separação satisfatória dos tocoferóis (Gimeno et al., 2000).

Para a separação de tocoferóis em colunas de fase reversa, a fase móvel mais empregada é o metanol puro ou misturas de metanol-água contendo até 10% de água. Alguns analistas trabalham com misturas de água-acetonitrila-metanol, acetato de etila e clorofórmio em várias proporções (Gimeno *et al.*, 2000; Gómez-Coronado *et al.*, 2004; Gliszczynska-Swiglo e Sikorska, 2004).

Em coluna de fase normal, usualmente são utilizados na separação de vitâmeros, eluentes compostos por um alcano como hexano, heptano, iso-octano, com uma pequena quantidade de modificador polar que pode ser um álcool, um éter, ou um clorohidrocarbono (Carpenter, 1979; Speek *et al.*, 1985; Coors, 1991; Yao *et al.*, 1992; El-Shami e El-Negoumy, 1993; Shin e Godber, 1993; Hewavitharana *et al.*, 2004).

As colunas de fase normal apresentam como vantagens, a capacidade de trabalharem com solventes orgânicos, permitindo uma alta solubilidade de lipídeos, suportarem alta concentração de lipídeos, e também a habilidade de prover ampla faixa de seletividade com o uso de diferentes modificadores polares na fase móvel (Kamal-Eldin *et al.*, 2000; Silva, 2003; Hewavitharana *et al.*, 2004). Rupérez *et al.* (2001) compararam colunas de fase normal e de fase reversa para separação de tocoferóis e tocotrienóis, e concluíram que as colunas de fase normal apresentaram melhor separação dos compostos.

Silva (2003) avaliou a eficiência de algumas colunas (C₁₈ e sílica) com diferentes fases móveis, adequadas para cada uma delas. Todos os sistemas foram testados com eluição isocrática, com vazão de 0,5 a 1,5 mL/min. As colunas C₁₈ não apresentaram resolução dos isômeros β- e γ-tocoferol em nenhuma das fases móveis testadas; já as colunas de sílica apresentaram um desempenho melhor com o uso de fase móvel composta por n-hexano : acetato de etila : isopropanol (99,0 : 0,8 : 0,2), à vazão de 1,5 mL/min.

Hewavitharana *et al.* (2004) observaram que as primeiras injeções dos padrões de tocoferóis no cromatógrafo produziram nenhum pico ou picos pequenos, desse modo houve um desvio na linearidade da curva de calibração. A

adição de 0,02mg/L de α -tocoferol à fase móvel, e a injeção e eluição de 2 alíquotas de 200 μ l de 2000mg/L de α -tocoferol eliminou este problema. Suspeitou-se da ocorrência de adsorção irreversível dos tocoferóis à coluna de sílica. Com o bloqueio desses sítios antes da análise das amostras, foi possível corrigir as áreas dos picos dos cromatogramas.

Diversos pesquisadores desenvolveram métodos cromatográficos para a separação de diferentes vitaminas lipossolúveis simultaneamente. Em 2002, Wang e Huang desenvolveram um método de separação de vitaminas lipossolúveis extraídas de soro bovino, utilizando coluna de fase-reversa, e como fase móvel, acetonitrila, diclorometano e metanol, em sistema isocrático. Houve uma eficiente separação das vitaminas: menadiona, retinol, acetato de retinila, menatrenona, colecalciferol, tocoferol, acetato de tocoferol, filoquinona e retinil palmitato. No mesmo ano, Mathiasson *et al.* determinaram as vitaminas A, E e β -caroteno em alimentos processados, utilizando C₁₈ como fase estacionária, e, acetato, metanol, acetonitrila e diclorometano como fase móvel. As vitaminas foram separadas em um sistema isocrático, e o tempo total de análise variou entre 25 a 30 minutos.

Burri *et al.* (2003), utilizaram um sistema de gradiente com os solventes acetonitrila, tetrahidrofurano, metanol e sulfato de amônio, e coluna Prodigy, C₁₈, 250 x 4,6 mm, ODS 3, com 5 μ m de diâmetro de partícula, para a separação de retinol, α -tocoferol, β -caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina.

Mendonza *et al.*(2003), utilizou coluna ODS 2, C₁₈, 250 x 4,6 mm, com 5 μ m de diâmetro de partícula, e metanol como fase móvel, para avaliar dois métodos distintos de extração de vitaminas A e E em alimentos destinados a crianças. Qian e Sheng (1998) utilizaram a mesma fase móvel (metanol), e coluna Novapak C₁₈, 150 x 3,9 mm, para separação das vitaminas A, D, E e pró-vitamina D₂, extraídas de ração animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, A.; BRITTON, W.M. Interaction of vitamin A, D₃, E and K in the diet of broiler chicks. *Poultry Science*, v.68, p. 1490-1498, 1989.
- ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 197-216, 2000.
- ABIDI, S.L.; MOUNTS, T.L. Reversed-phase high performance liquid chromatographic separations of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, v. 782, p. 25-32, 1997.
- ABURTO, A.; BRITTON, W.M. Effects of different levels of vitamin A and E on the utilization of cholecalciferols by broiler chickens. *Poultry Science*, v.77, p. 570-577, 1998.
- AHVAR, F.; PETERSEN, J.; HORST, P.; THEIN, H. Changes in egg quality during the first laying period affected by high ambient temperature. *Archiv für Geflügelkunde*, v. 46, p. 1-8, 1981.
- AKE, M.; FABRE, H.; MALAN, A.K.; MANDROU, B. Column liquid chromatography determination of vitamins A and E in powdered milk and local flour: a validation procedure. *Journal of Chromatography A*, v. 826, p. 183-189, 1998.
- ANNONIER, C.L.; UZU, G.; CHMITELIN, F. Influence of physico-chemical characteristics of vitamin on premix, feed and nutritional properties. *Proceedings of the 10th European Symposium on Poultry Nutrition*, Turkey, p. 74-85, 1995.
- BACK, A. Doenças Nutricionais, In: Manual de Doenças de Aves. Cascavel. Ed. Alberto Back. p.207-208, 2002.
- BOLLENGIER-LEE, S.; WILLIAMS, P.E.V.; WHITEHEAD, C.C. Optimal dietary concentration of vitamin E for alleviating the effect of heat stress on egg production in laying hens. *British Poultry Science*, v. 40, p. 102-107, 1999.
- BOLLENGIER-LEE, S.; MITCHELL, M.A.; UTOMO, D.B.; WILLIAMS, P.E.V.; WHITEHEAD, C.C. Influence of high dietary vitamin E supplementation on the

- egg laying response of hens subjected to heat stress. *British Poultry Science*, v. 39, p. 106-112, 1998.
- BOURGEOIS, C. *Determination of Vitamin E: tocopherols and Tocotrienols*. London: Elsevier Science Publishers LTD, 162p, 1992.
- BRUNI, R.; MEDICI, A.; GUERRINI, A.; SCALIA, S.; POLI, F.; ROMAGNOLI, C.; MUZZOLI, M.; SACCHETTI, G. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. *Food Chemistry*, v. 77, p. 337-341, 2002.
- BUETTNER, G.R. The Pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 300, n. 1, p. 535-543, 1993.
- BURRI, B. J.; DOPLER-NELSON, M. NEIDLLINGER, T.R. Mesurements of the major isoforms of vitamins A and E and carotenoids in the blood of people with spinal-cord injuries. *Journal of Chromatograph A*, v. 987, p. 359-366, 2003.
- CARLUCCI, G.; MAZZEO, P.; Del GOVERNATORE, S.; Di GIACOMO, G.; Del RE, G. Liquid chromatography method for the analysis of tocopherols in malt sprouts with supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 935, p. 87-91, 2001.
- CARPENTER, A.P. Determination of tocopherols in vegetable oils. *Journal of the Amer. Oil Chem. Society*, v. 56. p. 668-671, 1979.
- CIA, D.; BONHOMME, B.; AZIM, E.; WADA, A.; DOLY, M.; AZAÏS-BRAESCO, V. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method to analyze retinal isomers. *Journal of chromatography A*, v. 864, p. 257-262, 1999.
- COELHO, M. Stability of vitamins affected by feed processing. *Feedstuffs*, v. 29, p. 9-14, 1996.
- CONALGO, G.L.; JENSEN, L.S.; LONG, P.L. Effect of selenium and vitamin E on the development of immunity to coccidiosis in chickens. *Poultry Science*, v. 63, p. 1136, 1984.
- COORS, Von U. Anwendung des Tocopherolmusters zur Erkennung von Fett – und Övermischungen. *Fat Science Technology*, vol. 93, n.4, p. 519-526, 1991.

- DAWSON M.I.; HOBBS, P.D. Synthetic chemistry of retinoids. New York: Raven Press, 1994, p 5-178.
- DE LEENHEER, A.P.; LAMBERT, W.E.; VAN BOCXLAER, J.F.. Modern Chromatographic Analysis of Vitamins. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000.
- DE LEENHEER, A.P.; LAMBERT, W.E.; NETIS, H.J. Modern Chromatographic Analysis of Vitamins. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992. 575 p.
- DE LEENHER, A.P.; DE BEVERE, V.O.R.C.; DE RUYTER, M.G.M.; CLAEYS, A.E. Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in human serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 162 p. 408-43, 1979.
- EL-SHAMI, S.M.; EL-NEGOUMY, S.I. Tocopherols and flavonoids of SOS-7 halophyte. *Grasas y Aceites*, v. 44, p. 249-252, 1993.
- EMERSON, O.H.; EMERSON, G.A.; MOHAMMED, A.; EVANS, H.M. The biochemistry of vitamin E – tocopherols from various sources. *J. Biol. Chem.* v.122, p.99-107, 1937.
- FARIA, D.E.; JUNQUEIRA, O.M. Enfermidades Nutricionais, Em: Doenças das Aves. Campinas: FACTA – Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 431-448, 2000.
- FRICKEL, F. Chemistry and physical properties of retinoids. Em: MB Sporn, AB Roberts, DS Goldman, eds. The retinoids. Vol. 1. Orlando, FL: Academic Press, 1984, pp7-145.
- FRITTS, C.A.; WALDROUP, P.W. Effects of source and level of vitamin D on live performance and bone development in growing broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 12, p. 43-52, 2003.
- GIMENO, E.; CASTOLLOTE, A.I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; de La TORRE, M.C. Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 251-254, 2000.
- GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A.; SIKORSKA, E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A*, v. 1048, p. 195-198, 2004.

- GÓMEZ-CORONADO, D.J.M.; IBAÑHEZ, E.; RUPÉREZ, F.J.; BARBAS, C. Tocopherol measurements in edible products of vegetable origin. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, p. 227-233, 2004.
- GUNDERSEN, T. E.; BLOMHOFF, R. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *Journal of Chromatography A*, v. 935, p.13-43, 2001.
- HEWAVITHARANA, A.K.; LANARI, M.C., BECU, C. Simultaneous determination of vitamin E homologues in chicken meat by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1025, p. 313-317, 2004.
- HOSOMI, A.; ARITA, M.; SATO, Y.; KIYOSE, C.; UEDA, T.; IGARSHI, O.; ARAI, H.; INOUE, K. Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Letters* v. 409, p. 105-108, 1997.
- IWASE, H. Determination of tocopherol acetate in emulsified nutritional supplements by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 243-249, 2000.
- IWASE, H. Determination of vitamin D₂ in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and column-switching high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, v. 881p. 189-196, 2000a.
- IWASE, H. Determination of vitamin K1 in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with postcolumn reduction on a platinum catalyst and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 261-266, 2000b.
- JAESCHKE, H.; Mechanisms of antioxidant stress-induced acute tissue injury. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 209, p. 104-111, 1995.
- KAMAL-ELDIN, A.; GÖRGEN, S.; PETTERSON, J.; LAMPI, A. Normal-phase high performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols –

- composition of different chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 217-227, 2000.
- KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L.A. The Chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, v. 31, p. 671-701, 1996.
- KASIM, A.B.; EDWARDS, H.M.; Evaluation of cholecalciferol sources using broiler chick bioassay. *Poultry Science*, v. 79, p. 1617-1622, 2000.
- KLASING, K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poultry Science*, vol. 77, p. 1119-1125, 1998.
- LEESON, S. Nutritional considerations of poultry during heat stress. *World Poultry Science Journal*, v. 42, p. 69-81, 1986.
- LAVEDRINI, F.; RAVEL, A.; POUPARD, A.; ALARY, J. Effect of geographic origin, variety and storage on tocopherol concentrations in walnuts by HPLC. *Food Chemistry*, v. 58, p. 135-140, 1997.
- LI, S.X.; CHERIAN, G.; AHN, D.U.; HARDIN, R.T.; SIM, J.S. Storage, heating, and tocopherols affect cholesterol oxide formation in food oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 3830-3834, 1996.
- LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Extration of fat-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*, v. 935, p. 3-11, 2001.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. Fisiologia Aviária Aplicada a frangos de Corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP; 2002. 375p.
- MATHIASSEN, L.; TURNER, C.; BERG, H.; DAHLBERG, L.; THEOBALD, A.; ANKLAM, E.; GINN, R.; SHARMAN, M.; ULBERTH, F.; GABERNIG, R. Development of methods for the determination of vitamins A, E and β -carotene in processed foods based on supercritical fluid extraction: a collaborative study. *Food Additives and Contaminants*, v. 19, p. 632-646, 2002.
- MCCOMARCK, H.A.; MCTEIR, L.; FLEMING, R.H.; WHITEHEAD, C.C. Prevention of tibial dyscondroplasia by high dietary concentrations of vitamin D₃. Pag. 55 in *XXII World's Poultry Congress*, Istambul, Turkey, 2004.
- MCINTOSH, M.K.; GOLDBARB, A.H.; CURTIS, L.N.; COTE, P.S. Vitamin E alters hepatic antioxidants enzymes in rats treated with dehydroepiandrosterone (DHEA). *Journal of Nutrition*, v. 123, p. 216-224, 1993.

- MELCHERT, H.U.; PABEL, E. Quantitative determination of α -, β -, γ - and γ -tocopherol in human serum by high performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry as trimethylsilyl derivatives with a two-step sample preparation. *Journal of Chromatography A*, v. 896, p. 209-215, 2000.
- MENDONZA, B.R.; PONS, S.M.; BARGALLÓ, A.I.C.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Rapid determination by reversed phase high performance liquid chromatography of vitamins A and E in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, v. 1018, p. 197-202, 2003.
- MILLER, P.C.; SUNDE, M.L. The effects of precise constant and cyclic environments on shell quality and other lay performance factor with Leghorn pullets. *Poultry Science*, v. 54, p. 36-46, 1975.
- MORRISSEY, P.A.; BUCKLEY, D.J.; SHEEHY, P.J.A.; FRIGG, M. Vitamin E and meat quality. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 53, p. 289-295, 1994.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of poultry. 9 ed. Washington: National Academy Press, 1994, 155p.
- O'NEILL, L.M.; GALVIN, K.; MORRISSEY, P.A.; BUCKLEY, D.J. Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat and meat products. *British Poultry Science*, v. 39, p. 365-371, 1998.
- OSUMA-GARCÍA, J.A.; WALL, M.M.; WADDELL, C.A. Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of New Mexican-Type Chile (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 5093-5096, 1998.
- PAIXÃO, J.A.; STANFORD, T.L.M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos - uma abordagem analítica. *Química Nova*, v. 27, p. 96-105, 2004.
- PIKA, A.; SLIWIOK, J. Chromatography separation of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, v. 935, 71-76, 2001.
- QIAN, H.; SHENG, M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D₂ in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 825, p. 127-133, 1998.

- QUEVEDO, A. 2007: o ano para corrigir as falhas. *Anuário da Avicultura Industrial*, 60-73, 2006.
- ROMACK, E.H.; KIDAO, S.; SANDERS, B.G.; KLINE, K. Effects of RRR-alpha-tocopherol succinate on IL-1 and PGE-2 production by macrophages. *Nutr Cancer*, v. 20, p. 205-214, 1993.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos – Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2 ed., 186 p., 2005.
- RUPERÉZ, F.J.; MARTÍN, D.; HERRERA, E.; BARBAS, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A*, v. 935, p. 45-69, 2001.
- RUPERÉZ, F.J.; BARBAS, C.; CASTRO, M.; MARTINEZ, S.; HERRERA, E. *Journal of Chromatography A*, v. 823, p. 483, 1998.
- SCHIEBER, A.; MARX, M.; CARLE, R. Simultaneous determination of carotenes and tocopherols in ATBC drinks by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, v. 76, p. 357-362, 2002.
- SCHULDE, M. The stability of vitamin in extrusion cooking, in: O'CONNOR, C. (Ed.) *Extrusion Technology for the Food Industry*. London, Elsevier Applied Science, p. 22-34 1986.
- SEBRELL, W.H.Jr; HARRIS, R.S. The Vitamins, Chemistry, Physiology, Pathology, Methods. New York: Academic Press, Inc., 1972. 422p.
- SHELDON, B.W.; CURTIS, P.A.; DAWSON, P.L.; FERKET, P.R. Effect of dietary vitamin E on the oxidative stability flavor, color and volatile profiles of refrigerated and frozen turkey breast meat. *Poultry Science*, v. 76, p. 634-641, 1997.
- SHIN, T.S.; GODBER, J. S. Improved High Performance Liquid Chromatography of vitamin E vitamers on normal μ -phase columns. *Journal Am. Oil Chem. Soc.*, v. 70, p. 1289-1291, 1993.

- SILVA, M.G. Macadâmia nacional: tocoferóis e caracterização físico-química. Campinas, 2003. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
- SMITH, A.J. Changes in the average weight and shell thickness of eggs produced by hens exposed to high environmental temperatures. A review. *Tropical Animal Health and Production*, v. 6, p. 237-244, 1974.
- SOBCZAC, A.; SKOP, B.; KULA, B. Simultaneous determination of serum retinol and α - and γ - tocopherol levels in type II diabetic using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, v. 730, p. 265-271, 1999.
- SONG Z.; LIN, H. Effect of dietary supplementation of vitamin A on growth performance and intestinal development of broilers at the age of week 3 under high temperature stress. In “*Proceedings of the 9th National Symposium on Animal Nutrition*”. Chongqing. p. 134. (Publishing House of Agricultural University of China).
- SPEEK, A.J.; SCHRIJVER, J.; SCHREURS, W.H.P. Vitamin E composition of some seed oils as determination by High Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Journal of Food Science*, v. 50, p. 121-124, 1985.
- STROBEL, M.; HEINRICH, F.; BIELSALSKI, H. Improved method for rapid determination of vitamin A in small samples of breast milk by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 898, p. 179-183, 2000.
- SURAI, P.F.; SPARKS, N.H.C. Comparative evaluation of the effect of two maternal diets on fatty acids, vitamin E and carotenoids in the chick embryo. *British Poultry Science*, v. 42, p. 252-259, 2001.
- SWORD, J.T.; POPE, A.L.; HOEKSTRA, W.G. Endotoxin and lipid peroxidation *in vivo* in selenium and vitamin E-deficient and – adequate rats. *J. Nutr.*, v. 121, p. 251-257, 1991.
- TURNER, C.; KING, J.W.; MATHIASSEN, L. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 936, p. 215-237, 2001.

- TURNER, C.; MATHIASSEN, L. Determination of vitamin A and E in milk powder using supercritical fluid extraction for sample clean-up. *Journal of Chromatography A*, v. 874, p. 275-283, 2000.
- VILLAMIDE, M.J.; FRAGA, M.J. Composition of vitamin supplements in Spanish poultry diets. *British Poultry Science*, v. 40, p. 944-652, 1999.
- WANG, L.H.; HUANG, S.H. Determinations of. Vitamins A, D, E and K in human and bovine serum, and β -carotene and vitamin A palmitate in cosmetic and pharmaceutical products, by isocratic HPLC. *Chromatographia*, v. 55, p. 289-294, 2002.
- YAO, F.; DULL, G.; EITENMILLER, R. Tocopherol quantification by HPLC in pecans and relationship to kernel quality during storage. *Journal of Food Science.*, v. 57, p. 1194-1197, 1992.
- ZHANG, C.S.; WANG, Q.D.; ZHAO, Z.G.; WEI, J.M. The influence of various dietary Zn and vitamin A on production performance, immunology competence, activity of Cu Zn-SOD, ALK and insulin concentration of serum broilers. *Acta Zoonutrimenta Sinica*, v.12, p. 57-62, 2000.

Capítulo 2

DETERMINAÇÃO DE MACRONUTRIENTES EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE

Berbel, M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciência de Alimentos

Capítulo 2

DETERMINAÇÃO DE MACRONUTRIENTES EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE

Berbel, M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciência de Alimentos

RESUMO

Atualmente, é de amplo conhecimento a importância de se avaliar os alimentos utilizados na avicultura, para que se possa utilizá-los adequadamente, de acordo com a genética, idade das aves, estado sanitário do plantel, e principalmente, para assegurar que este alimento seja de boa qualidade, não colocando a produção em risco. Neste trabalho foram avaliados os níveis de umidade, cinzas, lipídeos, proteína bruta e fibra bruta de 31 amostras de rações para frangos de corte, destinadas a diversas fases de crescimento. Todas as amostras apresentaram níveis de umidade próximos de 10%, sendo que os valores mínimo e máximo encontrados foram 9,7% e 11,5%, respectivamente. Os valores obtidos para porcentagens de cinzas variaram em função da idade das aves para as quais a ração é destinada. Também foram observadas diferenças nos resultados obtidos em rações da mesma marca e mesma fase em lotes diferentes. Os níveis de proteína bruta encontrados variaram de 12,4g/100g a 25,8g/100g. As amostras de rações para crescimento da marca D, lotes 1, 2 e 3, apresentaram resultados para proteína bruta abaixo dos níveis recomendados pela literatura. O lote 3, para fase inicial, marca D também apresentou teor de proteína bruta muito abaixo do recomendado. Os resultados obtidos para as 31 amostras, avaliadas quanto ao teor de lipídeos, variaram bastante, sendo que os valores mínimo e máximo encontrados foram, respectivamente, 1,04g/100g e 11,31g/100g. Foram

observadas diferenças entre amostras de mesma marca, mesma fase, mas de lotes diferentes. Os valores mínimo e máximo obtidos para teor de fibras foram, respectivamente, 2,86g/100g e 7,56g/100g. Também foram observadas variações do teor de fibras em amostras da mesma fase, mas de lotes diferentes. Em todas as marcas foram observadas variações nos níveis de nutrientes, de acordo com a fase para a qual as rações eram destinadas.

ABSTRACT

Nowadays, it's known the importance of to evaluate feed used in the poultry production, to adequate them to the age, sanitary conditions of the flock, genetic, and to guarantee the feed quality and the security of the production. This experiment verifies the levels of humidity, mineral, fat, crude protein, and fibers of 31 samples of feed to poultry production of average ages. Every samples presented levels of humidity near 10%, and the values minimum and maximum were 9.7% and 11.5%, respectively. The obtained values to the mineral averaged with the ages which the feed were destined. It was observed differences of the results of feeds made by the same maker, and destined to the same age, but from different batches. The crude protein levels average of 12.4g/100g to 25.8g/100g. The levels to growing age feeds, from D maker, batches 1, 2 e 3, presented crude protein results under the recommended levels. The batch 3, of initial phase feed, from maker D, also presented crude protein level lower then the recommended. The lipids level evaluation in 31 samples had a high variability, and the minimum and maximum values observed were 1.04g/100g and 11.31g/100g, respectively. Fibers values variability's were observed in samples of the same maker and same phase, but in different batches The minimum and maximum values observed for fibers were respectively 2.86g/100g and 7.56g/100g. In all makers, nutrient levels variability was find according to the phase the food were destined to.

INTRODUÇÃO

Atualmente, é de amplo conhecimento, a importância da alimentação correta das aves para seu desenvolvimento, produtividade, qualidade de carne e ovos, resistência do plantel a patógenos, além da maior eficiência dos programas de vacinação.

O custo dessa alimentação constitui cerca de 65% dos custos totais de produção do frango abatido. Sendo assim, o manejo da composição nutricional dos alimentos e a utilização de alimentos alternativos faz-se necessário para garantir maiores benefícios para a produção (Oviedo, 2005).

O conteúdo nutricional das dietas determina a taxa de crescimento e as características das carcaças dos frangos. Conseqüentemente, os níveis ótimos de nutrientes das dietas devem ser determinados de acordo com as metas de produção da empresa. Essas metas são atingidas através de programas nutricionais, baseados inicialmente nas recomendações das empresas fornecedoras de genética, com posteriores ajustes de acordo com dados de pesquisa acadêmica, ou resultados prévios das próprias empresas integradoras (Oviedo, 2005; Nascimento *et al.*, 2004).

Os nutrientes fornecidos e consumidos em cada fase alimentar têm influências diretas nas exigências nutricionais das fases seguintes, no resultado final de desempenho, e nas características das carcaças (Eits *et al.*, 2003; Wijjten *et al.*, 2004; Clemente-Hernández *et al.*, 2005). Quanto mais curto o período de fornecimento de cada dieta, mais próximo se pode estar das exigências das aves. Dessa forma é possível melhorar o desempenho, maximizar a produção de carne magra e diminuir o desperdício de nutrientes nos dejetos (Pope e Emmert, 2001; Pope *et al.*, 2004).

O valor nutritivo do alimento está diretamente relacionado com sua composição química e energética, importantes no balanceamento das rações. O desempenho das aves sofre ação direta do nível energético das dietas, pois a energia presente na dieta é um dos fatores limitantes do consumo, sendo

utilizadas nos diferentes processos que envolvem desde a manutenção até o máximo potencial produtivo (D'Agostini et al., 2004).

As dietas são normalmente formuladas para atenderem um desempenho pré-estabelecido, usando princípios de mínimo custo. Dentro desse aspecto, no que tange às proteínas, isso significa que uma dieta ideal deveria satisfazer exatamente as exigências de aminoácidos das espécies. Na prática, esse objetivo não é alcançado, em parte pela variação intrínseca nas necessidades dos animais, e, em parte, pela composição e disponibilidade desses nutrientes nas matérias primas utilizadas na formulação das dietas. Atualmente, esse inconveniente tem sido amenizado, uma vez que os quatro aminoácidos mais importantes para aves (metionina, lisina, triptofano e treonina) já se encontram industrialmente disponíveis para a adição em rações (Rutz, 2002).

A proteína é um dos mais importantes nutrientes na alimentação de frangos de corte, considerando que a produção industrial visa principalmente uma eficiente conversão de proteína da ração em proteína muscular (Costa *et al.*, 2001a). O atendimento das exigências protéicas para aves está associado ao custo da alimentação, uma vez que a proteína é o segundo nutriente mais caro da ração, e representa de 40 a 45% do custo total da ração. Por isso, a redução protéica tem sido vista como uma das vias de possível melhoria dos custos de produção, e o nível protéico da ração passou a ser definido como o nível ótimo para responder às necessidades da ave em aminoácidos, considerando o custo dos ingredientes usados na formulação, e o valor das carnes produzidas (Sabino *et al.*, 2004).

Sabino *et al.* (2004) observaram que o rendimento de carcaça, independentemente do sexo, é influenciado linearmente pelo nível de proteína bruta na dieta, mostrando que o aumento no teor de proteína bruta aumentou o rendimento de carcaça. Salmon *et al.* (1983) e Cahaner *et al.* (1997) observaram que o rendimento de carcaça total aumentou com o nível de proteína bruta na dieta final.

Sabino *et al.* (2004) recomendam para frangos de corte 21,7 e 19,0% de proteína bruta para a fase de crescimento para machos e fêmeas, respectivamente. Níveis de proteína abaixo desses valores diminuem o

desempenho, mesmo com a suplementação dos aminoácidos essenciais metionina, lisina, treonina e triptofano na ração.

Segundo Costa *et al.* (2001b), para frangos de corte da linhagem Ross, pode-se estimar uma exigência de 19,5 e 18,5% de proteína, respectivamente para machos e fêmeas, para a fase de 22 a 42 dias de idade. Para a fase inicial, 1 a 21 dias de idade, a exigência de proteína bruta é de 22,4% a 22,5%. A redução severa no nível de proteínas na dieta, mesmo sendo estas suplementadas com aminoácidos, não reconstitui o balanço de aminoácidos das mesmas, levando ao catabolismo de aminoácidos e conseqüente deposição de gordura na carcaça.

Quanto aos carboidratos, sua função nos animais é servir de fonte de energia nos processos metabólicos. Junto com a gordura, os carboidratos são as maiores fontes de energia para os animais. Entretanto, a importância dos carboidratos como fonte de energia é muito maior, pois quantitativamente a sua presença é maior nos grãos e, portanto, nas dietas. Grãos de cereais como milho, sorgo e trigo são os alimentos que contribuem com a maior parte dos carboidratos nas dietas para aves. Ainda que os carboidratos sejam os maiores componentes das dietas dos animais domésticos, não existe exigência nutricional específica de carboidratos. Isso se explica pelo fato de que a fonte de energia mais importante ao nível celular para os animais é a glicose, sendo então possível obtê-la de vários tipos diferentes de carboidratos e outros nutrientes (Vieira, 2002).

O requerimento de lipídeos nas dietas de galinhas, frangos de corte e outras espécies superiores, está relacionado com pequenas quantidades de ácidos graxos que não podem ser sintetizados pelo organismo, os chamados ácidos graxos essenciais. No entanto, a digestão e a absorção de lipídeos estão na dependência do hábito alimentar das aves. A adição de gorduras nas dietas das aves é um procedimento que vem sendo adotado para melhorar o desempenho, em especial do frango de corte. A reserva energética associada aos depósitos de gordura no organismo, não está também, necessariamente relacionada à ingestão de lipídeos. Nesse sentido, carboidratos e mesmo aminoácidos, podem servir como fonte de material para lipogênese (síntese de lipídeo no organismo da ave) (Furlan e Macari, 2002).

Crespo e Esteve-Garcia (2001) demonstraram melhor eficiência alimentar em aves com 21 a 49 dias de idade, alimentadas com dietas contendo 10% de lipídeos, em relação a aves da mesma idade alimentadas com rações contendo 6% de lipídeos. Já em relação à deposição de gordura em carcaça, esta varia em função não só da quantidade, mas também do tipo de gordura utilizada na ração. Rações ricas em ácidos-graxos polinsaturados produziram menor deposição de gordura abdominal.

Quanto aos minerais, tem-se buscado, constantemente, a quantidade e a forma ideal de sua suplementação na dieta, uma vez que a deficiência mineral pode causar grandes prejuízos para o organismo animal. De maneira geral, minerais são adicionados à dieta na sua forma inorgânica, entretanto, atualmente têm-se utilizado minerais complexados na suplementação, buscando-se uma maior biodisponibilidade desses nutrientes (Maiorka e Macari, 2002).

Segundo Underwood (1981), os minerais exercem três tipos de funções: são componentes estruturais de órgãos e tecidos, são constituintes dos fluidos corporais e dos tecidos envolvidos com a manutenção da pressão osmótica, balanço ácido-básico, permeabilidade das membranas e irritabilidade dos tecidos, e são também catalisadores dos sistemas enzimáticos e hormonal, no papel de componentes integrais ou específicos da estrutura das membranas.

Em relação à celulose, sua presença reduz o tempo de passagem do alimento através do trato digestivo, o que melhora a absorção dos nutrientes no intestino. A celulose também melhora a composição das fezes tornando-as mais sólidas (Patrik e Schaible, 1981).

Para se conhecer melhor as amostras de rações para frangos, utilizadas neste estudo, foram determinados seus níveis de proteína bruta, lipídeos, cinzas, umidade e fibra bruta. Assim, foi possível comparar os resultados obtidos com os níveis recomendados para cada idade do plantel.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 31 amostras de rações para frangos de corte, de quatro marcas diferentes, compostas por três lotes de cada fase. As análises foram realizadas em triplicata, exceto para a determinação de fibra bruta, em que foi realizada apenas uma análise por amostra, devido à necessidade de se realizar essa análise em outro laboratório. O fabricante da marca B forneceu apenas um lote devido à posterior paralisação da fábrica para reformas.

Aceitam-se que as rações para a fase inicial destinam-se a frangos de corte com 1 a 14 dias de idade, as rações para a fase crescimento destinam-se a aves com 15 a 29 dias, e as rações classificadas como para a fase final, destinam-se às aves de 30 dias, até o abate. Entretanto, muitas empresas trabalham com mais ou menos fases, de acordo com suas necessidades (Benício, 2001).

As análises de determinação de proteínas, lipídeos, cinzas e umidade foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. A análise de fibra bruta foi realizada no Iapar - Instituto Agronômico do Paraná.

Previamente às análises, todas as amostras foram moídas para que as partículas não ultrapassassem 1mm de diâmetro. Em seguida foram embaladas em pequenas porções e armazenadas a -10°C.

Para a comparação dos resultados obtidos para cada lote foi realizado o teste de Tukey. Esse teste não foi realizado para a marca B, pois o fabricante forneceu apenas 1 lote de cada fase.

Determinação do teor de umidade

Para a determinação de umidade foi utilizado o método de Rostagno *et al.* (2005). Para isso, foram pesados 2g da amostra em cadinhos de alumínio, mantidos em estufa a 105°C por 6 horas e, após esfriarem em dessecadores, foram realizadas as pesagens para os cálculos. Previamente ao início desta análise foi verificado se o tempo e temperatura eram eficientes para as amostras

estudadas, através de pesagens consecutivas das amostras, até a verificação de resultados constantes.

Determinação do teor de cinzas

Para a determinação da matéria mineral, 2g da amostra foram pesados em cadinhos de porcelana e em seguida foram incinerados em mufla a 600°C, durante 8 horas. Após a incineração foram resfriados em dessecador para que as pesagens fossem realizadas.

Determinação do teor de lipídeos

Para a determinação de lipídeos foi utilizado o método Bligh & Dyer (1959), que se baseia na extração da gordura a frio com uma mistura de três solventes: clorofórmio, metanol e água.

Em tubos de ensaio com tampa, 3g da amostra foram misturados a 20 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e 8 mL de água destilada, formando uma só fase com a amostra. Os tubos contendo a mistura foram deixados em ultra-som por 30 minutos, em seguida foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%. Os tubos foram agitados manualmente por mais 2 minutos e em seguida deixados em repouso para a separação das duas fases. A fase superior (aquosa) foi sugada utilizando-se sistema de vácuo ligado a um Kitassato para recolher o resíduo. Adicionou-se 1g de sulfato de sódio ao tubo e este foi submetido à agitação manual, e em seguida a mistura foi filtrada em papel de filtro utilizando-se mais 1g de sulfato de sódio. Adicionou-se a um béquer previamente pesado, 5mL do filtrado, que foi colocado em estufa a 100°C até que o solvente evaporasse. Em seguida o béquer foi resfriado em dessecador e pesado para o cálculo da porcentagem de lipídeos.

Determinação de proteína

Para a determinação do teor de proteínas foi utilizado o método de Kjeldahl (AOAC, 1997), no qual se determina o teor de nitrogênio total de origem orgânica. Utilizaram-se entre 0,2 a 0,4 g de amostra pesadas em tubos para Microkjeldahl. O procedimento baseou-se na digestão da amostra, com 3mL de ácido sulfúrico e uma mistura catalisadora contendo 4% de sulfato de cobre e 96% de sulfato de potássio para acelerar a reação, em que todo o carbono e hidrogênio foram oxidados a gás carbônico e água. O nitrogênio da proteína foi reduzido e transformado em sulfato de amônio. Destilou-se a amostra digerida em meio básico por adição de hidróxido de sódio 40%, para liberação da amônia. A amônia foi recolhida em solução de ácido bórico, formando borato de amônio. O borato de amônio formado foi quantificado por titulação com ácido clorídrico padronizado.

O resultado da quantidade de nitrogênio existente na amostra, foi obtido através da titulação ácido base, na qual, cada equivalente do ácido (HCl) corresponde a um equivalente da base $((\text{NH}_4)_3\text{BO}_3)$.

Para se calcular a porcentagem de proteína bruta, a partir da quantidade de nitrogênio orgânico existente nessa amostra, foi utilizado o fator de conversão de porcentagem de nitrogênio em porcentagem de proteína de 6,25.

Determinação de fibras

Neste trabalho foi utilizado o método de “Fibra em Detergente Ácido”, que é o método mais utilizado para ração animal. A amostra foi moída e utilizou-se 1g da amostra para a análise, que foi colocada em um frasco de refluxo do equipamento. À amostra adicionou-se 100mL da solução de detergente ácido, aqueceu-se até ebulição por 10 min e ,então, foi realizado o refluxo por 60 min. Em seguida a mistura foi filtrada utilizando-se vácuo. Após a filtração foi adicionada água quente a 90-100°C, até 2/3 do cadinho, e deixado em repouso por 30 segundos. Em seguida foram realizadas as lavagens com acetona até que não fosse mais removida nenhuma cor da amostra. Após a secagem, o cadinho foi pesado para o cálculo da porcentagem de fibras.

Estimativa do valor de carboidratos

Os teores de carboidratos das amostras foram estimados pela diferença entre o peso total da amostra e a somatória dos resultados obtidos para umidade, cinzas, proteína bruta, lipídeos e fibras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Umidade

Os resultados obtidos na determinação do teor de umidade das amostras podem ser observados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Teor de umidade das amostras de rações de frangos de corte.

MARCA DA RAÇÃO	FASE	TEOR DE UMIDADE (g/100g)		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
A	Crescimento	10,06 ± 0,06 ^a	10,52 ± 0,1 ^b	11,5 ± 0,1 ^c
	Final	9,58 ± 0,08 ^a	9,7 ± 0,1 ^a	10,54 ± 0,04 ^b
B	Pré-inicial	10,39 ± 0,06	-	-
	Inicial	10,94 ± 0,09	-	-
	Crescimento	10,35 ± 0,06	-	-
	Final	10,78 ± 0,07	-	-
C	Matriz	10,42 ± 0,03 ^a	10,15 ± 0,02 ^a	10,5 ± 0,2 ^a
	Pré-inicial	9,83 ± 0,03 ^a	10,32 ± 0,03 ^b	10,56 ± 0,02 ^c
	Inicial	10,24 ± 0,02 ^a	10,1 ± 0,2 ^a	10,82 ± 0,06 ^b
	Crescimento	10,49 ± 0,01 ^a	11,4 ± 0,1 ^b	10,62 ± 0,07 ^a
	Final	10,30 ± 0,01 ^a	10,4 ± 0,1 ^a	10,09 ± 0,02 ^a
D	Inicial	9,9 ± 0,1 ^a	10,59 ± 0,03 ^b	10,0 ± 0,1 ^a
	Crescimento	9,7 ± 0,1 ^a	10,8 ± 0,2 ^b	10,36 ± 0,07 ^c

Média e estimativa de desvio padrão de 3 determinações.

(a, b, c) demonstram diferença significativa numa mesma linha, obtida pelo teste de Tukey.

(-) Lote não fornecido.

Todas as amostras apresentaram níveis de umidade próximos de 10%, sendo que os valores mínimo e máximo encontrados foram 9,7% e 11,5% respectivamente. Os valores encontrados diferiram do valor citado por Rose (1997) de 14% de umidade, entretanto, nenhuma amostra apresentou elevada umidade, o que poderia comprometer sua qualidade microbiológica.

Após a realização do teste de Tukey entre os lotes analisados, foi possível verificar que apenas as amostras pertencentes à marca C, fases crescimento e final, não apresentaram diferenças significativas entre as médias dos três lotes.

Cinzas

Na **Tabela 2** podem-se observar os resultados de teor de cinzas obtidos para as amostras de rações para frangos de corte.

Tabela 2 – Teor de cinzas das amostras de rações para frangos de corte.

MARCA DA RAÇÃO	FASE	TEOR DE CINZAS (g/100g)		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
A	Crescimento	8,01 ± 0,06 ^a	7,6 ± 0,1 ^a	6,9 ± 0,1 ^b
	Final	6,96 ± 0,04 ^a	7,62 ± 0,01 ^b	6,84 ± 0,06 ^a
B	Pré-inicial	6,309 ± 0,001	-	-
	Inicial	5,7486 ± 0,001	-	-
	Crescimento	4,7712 ± 0,001	-	-
	Final	4,8262 ± 0,001	-	-
C	Matriz	9,5 ± 0,2 ^a	11,7 ± 0,1 ^b	11,88 ± 0,08 ^b
	Pré-inicial	5,51 ± 0,02 ^a	5,36 ± 0,02 ^a	5,66 ± 0,09 ^b
	Inicial	5,49 ± 0,03 ^a	5,20 ± 0,08 ^b	5,1 ± 0,1 ^b
	Crescimento	4,7 ± 0,1 ^a	4,79 ± 0,03 ^a	4,75 ± 0,04 ^a
	Final	4,7 ± 0,1 ^a	4,97 ± 0,06 ^a	5,64 ± 0,04 ^b
D	Inicial	11,6 ± 0,1 ^a	9,51 ± 0,09 ^b	7,1 ± 0,1 ^c
	Crescimento	10,8 ± 0,1 ^a	10,3 ± 0,4 ^b	10,0 ± 0,4 ^c

Média e estimativa de desvio padrão de 3 determinações.

(a, b, c) demonstram diferença significativa numa mesma linha, obtida pelo teste de Tukey.

(-) Lote não fornecido.

Os resultados obtidos para cinzas situaram-se próximos dos níveis estabelecidos por Rose (1997), que seria de 7% para rações para frangos de corte. Entretanto esta análise não determina quais são os minerais presentes na amostra, não sendo possível afirmar que as rações com quantidades menores de cinzas causariam alguma deficiência nas aves, já que vários minerais acrescentados às rações apresentam alta biodisponibilidade, como, por exemplo, os minerais quelatados (Patrick e Schaible, 1981).

Os valores obtidos para as porcentagens de cinzas variaram em função da idade das aves para as quais a ração é destinada. Também foram observadas

diferenças nos resultados obtidos em rações da mesma marca e mesma fase, mas de lotes diferentes. Somente as amostras pertencentes à marca C, fase crescimento, não apresentaram diferenças significativas entre os lotes.

Proteína

Na **Tabela 3** observam-se os resultados de proteína bruta, obtidos para as rações de frangos de corte em estudo.

Tabela 3 – Teor de proteína bruta em amostras de rações para frangos de corte.

MARCA DA RAÇÃO	FASE	PROTEÍNA BRUTA (g/100g)		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
A	Crescimento	24,44 ± 0,01 ^a	20,8 ± 0,4 ^b	20,5 ± 0,1 ^b
	Final	20,16 ± 0,08 ^a	20,5 ± 0,7 ^a	19,4 ± 0,6 ^a
B	Pré-inicial	24,2 ± 0,3	-	-
	Inicial	23,2 ± 0,6	-	-
	Crescimento	19,9 ± 0,2	-	-
	Final	19,1 ± 0,4	-	-
C	Matriz	18,5 ± 0,2 ^a	18,1 ± 0,1 ^a	18,4 ± 0,6 ^a
	Pré-inicial	24,8 ± 0,6 ^a	24,3 ± 0,7 ^a	23,3 ± 0,1 ^a
	Inicial	23,7 ± 0,3 ^a	22,9 ± 0,3 ^a	25,8 ± 0,2 ^b
	Crescimento	21,70 ± 0,09 ^a	21,1 ± 0,2 ^{ab}	20,7 ± 0,2 ^b
	Final	20,1 ± 0,4 ^a	19,6 ± 0,4 ^a	21,53 ± 0,05 ^b
D	Inicial	20,7 ± 0,4 ^a	19,93 ± 0,07 ^b	14,2 ± 0,1 ^c
	Crescimento	12,4 ± 0,6 ^a	14,8 ± 0,2 ^b	15,9 ± 0,4 ^c

Média e estimativa de desvio padrão de 3 determinações.

(a, b, c) demonstram diferença significativa numa mesma linha, obtida pelo teste de Tukey.

(-) Lote não fornecido.

Os níveis de proteína bruta encontrados variaram de 12,4g/100g a 25,8g/100g. As amostras de rações para crescimento da marca D, lotes 1, 2 e 3, e para fase inicial da marca D, lote 3, apresentaram resultados de proteína bruta abaixo dos níveis recomendados por Sabino *et al.* (2004) e por Costa *et al.* (2001b).

As amostras da marca C destinadas à alimentação de matrizes apresentaram resultados acima de 14%, valor mínimo recomendado pelas Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (Rostagno *et al.*, 2005).

Lisboa e Silva (1999) e Buyze *et al.* (1992) demonstraram que a redução dos níveis de proteína em rações para frangos causa o aumento nos teores de gordura abdominal. Conforme esses autores, as rações com menores teores protéicos podem se tornar deficientes no aminoácido essencial treonina, o que limita a síntese protéica e, desta maneira, os aminoácidos ficaram disponíveis para a síntese de gordura. O excesso de deposição de gordura na carcaça é prejudicial à produção de frango de corte, pois a gordura é vista de modo desfavorável pelo consumidor e representa perda no rendimento se for removida durante a industrialização (Leenstra, 1986).

Apenas as amostras da marca A, fase final, e a marca C, fases matriz e pré-inicial, não apresentaram diferenças significativas entre os lotes.

Lipídeos

Na **Tabela 4** podem-se observar os resultados obtidos para determinação de lipídeos em amostras de rações para frangos de corte.

Tabela 4 – Resultados obtidos para teor de lipídeos em rações de frangos de corte.

MARCA DA RAÇÃO	FASE	LIPÍDEOS (g/100)		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
A	Crescimento	4,295 ± 0,001 ^a	4,245 ± 0,002 ^a	3,9657 ± 0,0003 ^a
	Final	5,4090 ± 0,0003 ^a	4,699 ± 0,001 ^b	6,814 ± 0,003 ^c
B	Pré-inicial	5,766 ± 0,001	-	-
	Inicial	4,4083 ± 0,0001	-	-
	Crescimento	5,117 ± 0,001	-	-
	Final	8,573 ± 0,003	-	-
C	Matriz	6,8813 ± 0,0009 ^a	6,072 ± 0,002 ^b	5,8893 ± 0,0006 ^b
	Pré-inicial	5,5885 ± 0,0001 ^a	5,4373 ± 0,0002 ^a	11,308 ± 0,004 ^b
	Inicial	8,309 ± 0,006 ^a	9,4960 ± 0,0004 ^a	9,4283 ± 0,0002 ^a
	Crescimento	10,372 ± 0,003 ^a	9,480 ± 0,001 ^b	9,8701 ± 0,0005 ^{ab}
	Final	12,019 ± 0,001 ^a	10,357 ± 0,001 ^b	8,434 ± 0,001 ^c
D	Inicial	4,6238 ± 0,0005 ^a	4,286 ± 0,001 ^a	4,125 ± 0,001 ^a
	Crescimento	5,9356 ± 0,0003 ^a	5,2524 ± 0,0008 ^b	5,654 ± 0,001 ^c

Média e estimativa de desvio padrão de 3 determinações.

(a, b, c) demonstram diferença significativa numa mesma linha, obtida pelo teste de Tukey.

(-) Lote não fornecido.

Os resultados obtidos para as 31 amostras de rações utilizadas neste estudo apresentaram quantidades de lipídeos muito variadas, sendo que os valores mínimo e máximo encontrados foram, respectivamente, 3,97g/100g e 12,02g/100g.

Apenas 4 amostras obtiveram resultado acima do estabelecido por Esteve-Garcia (2001), que preconiza a utilização de 10g/100g de lipídeos na ração para melhorar a conversão alimentar.

Foram observadas diferenças nos teores de lipídeos de amostras de mesma marca, mesma fase, mas de lotes diferentes. As rações da marca A, fase crescimento, e marca C, fase inicial, não apresentaram diferença significativa entre os lotes.

Fibra bruta

Na **Tabela 5** podem-se observar os resultados obtidos para teor de fibra bruta das análises de rações para frangos de corte.

Tabela 5 – Teor de fibra bruta de amostras de rações para frangos.

MARCA DA RAÇÃO	FASE	FIBRA BRUTA (g/100g)*		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
A	Crescimento	3,797	2,7861	3,5063
	Final	3,5278	4,2394	3,8414
B	Pré-inicial	2,3621	-	-
	Inicial	3,159	-	-
	Crescimento	3,3998	-	-
	Final	3,0744	-	-
C	Matriz	4,2763	3,2482	2,8446
	Pré-inicial	3,1387	3,8241	3,8712
	Inicial	3,9009	3,4625	3,8591
	Crescimento	3,2265	3,3547	3,4628
	Final	2,9069	2,7492	3,1461
D	Inicial	3,9394	4,7938	6,6457
	Crescimento	6,5605	7,2244	7,5555

*Não há o desvio padrão, e não foi realizado o teste de Tukey, pois se realizou apenas uma análise de cada amostra.

(-) Lote não fornecido.

Os valores mínimo e máximo para teor de fibras, obtidos nas amostras analisadas foram, respectivamente, 2,86g/100g e 7,56g/100g. Também foram observadas variações do teor de fibras em amostras de mesmas marca e fase, mas de lotes diferentes.

Apesar das aves não aproveitarem nutricionalmente a celulose presente na fibra do alimento, sua presença na ração melhora a absorção dos nutrientes no intestino das aves.

Carboidratos

Na **Tabela 6** podem-se observar os valores estimados para o teor de carboidratos das amostras de rações. Os resultados foram obtidos pela diferença entre o peso total da amostra e a somatória dos resultados obtidos para umidade, cinzas, proteína, lipídeos e fibras.

Tabela 6 – Valores estimados para o teor de carboidratos das amostras estudadas.

MARCA DA RAÇÃO	FASE	CARBOIDRATOS (g/100g)		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
A	Crescimento	49,39	54,05	53,63
	Final	54,36	53,24	52,56
B	Pré-inicial	50,97	Lote não fornecido	Lote não fornecido
	Inicial	52,54	Lote não fornecido	Lote não fornecido
	Crescimento	56,46	Lote não fornecido	Lote não fornecido
	Final	53,65	Lote não fornecido	Lote não fornecido
C	Matriz	50,42	50,73	50,49
	Pré-inicial	51,13	50,7	45,3
	Inicial	48,36	48,84	50,01
	Crescimento	58,85	49,87	50,6
	Final	60,78	51,92	51,16
D	Inicial	49,24	50,89	57,93
	Crescimento	54,6	51,62	50,53

Os valores obtidos para carboidratos variaram de 48,36% a 60,78%. Ainda que os carboidratos sejam os maiores componentes das dietas dos animais domésticos, não existe exigência nutricional específica. Isso se explica pelo fato de que a fonte de energia mais importante para as células dos animais é a glicose,

sendo então possível obtê-la de vários tipos diferentes de carboidratos e outros nutrientes (Vieira, 2002).

CONCLUSÃO

Pode-se observar uma grande variação dos níveis dos nutrientes analisados, de acordo com fase de crescimento para a qual a ração era destinada, concordando com a literatura, que recomenda a adequação da ração à idade da ave.

Nenhuma das amostras apresentou umidade elevada, o que poderia comprometer a qualidade microbiológica da ração. Quanto ao teor de cinzas, os resultados obtidos estavam próximos do valor esperado, entretanto, amostras que tenham apresentado teor de cinzas mais baixo, não causarão necessariamente deficiências nas aves, pois dependendo do tipo de suplemento mineral utilizado, sua biodisponibilidade para a ave poderá ser maior ou menor. Quanto ao nível de proteínas, apenas a marca D apresentou amostras com níveis insatisfatórios. Das 31 amostras analisadas, somente 4 obtiveram teor de lipídeos acima de 10%, que seria a quantidade ideal para a melhor conversão alimentar das aves. Todas as amostras apresentaram fibra bruta, o que é importante no auxílio da absorção de outros nutrientes da ração.

As marcas A, C e D apresentaram falhas na padronização da quantidade de nutrientes, o que pôde ser observado pelas diferenças nos resultados entre lotes. Essa diferença entre lotes pode ter ocorrido em função da variedade de ingredientes utilizados na fabricação de rações. A variabilidade entre lotes não pôde ser observada na marca B devido à indisponibilidade de dois outros lotes para as análises.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analyses. 16. ed. Gaithersburg: AOAC, 1997.
- BLIGH, E.C.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v.37, p.911-917, 1959.
- BENÍCIO, L.S. Fatores que afetam a conversão alimentar. In: II Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó – SC, p.39, 2001.
- BUYZE, J.; DECUYPERE, L.; BERGHMAN, L.; KUHN, E. R., VANDESAND, F. Effect of dietary protein content on episodic growth hormone secretion and heat production of male broiler chickens. *British Poultry Science*, v.33, p.1101-1109, 1992.
- CAHANER, A.; PINCHASOV, Y.; NIR, I. Effects of dietary protein under high ambient temperature on body weigh, breast meat yield, and abdominal fat deposition of broilers stocks differing in growth rate and fatness. *Poultry Science*, v. 74, p.968-975, 1997.
- CECCHI, H.M. *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.
- CLEMENTE-HERNÁNDEZ, S.; SALVADOR, F.; OVIEDO-RONDÓN, E. O. Response to lysine levels over dynamic development of broilers. *Poultry Science* (Suppl. 1): 100 p.42, 2005.
- COSTA, F. G. P.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; TOLEDO, R. S.; VARGAS Jr. J. G. Níveis dietéticos de proteína bruta para frangos de corte de 1 a 21 e 22 a 42 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(5): 1498-1505, 2001a.
- COSTA, E. F.; MILLER, B. R.; HOUSTON, J. E.; PESTI, G. M. Production and profitability responses to alternative sources and levels in broiler rations. *Journal of Agricultural and Applied Economics* 33(3):567-581, 2001b.
- CRESPO, N.; ESTEVE-GARCIA, E. Dietary fatty acid profile modifies abdominal fat deposition in broiler chickens. *Poultry Science* 80: 71-78, 2001.

- D'AGOSTINI, P.; GOMES, P. C.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; SÁ, L. M. Valores da composição química e energética de alguns alimentos para aves. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.1, p.128-134, 2004.
- EITS, R. M.; KWAKKEL, R. P.; VERSTEGEN, M. W.; EMMANS, G. Responses of broiler chickens to dietary protein: effects of early life protein nutrition on later responses. *British Poultry Science* 44(3):398-409, 2003.
- FARIA, D.E.; JUNQUEIRA, O.M. Em: *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA – Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000, p. 431-448: Enfermidades Nutricionais.
- FURLAN, R. L.; MACARI, M. *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002, p.143: Lipídeos: Digestão e Absorção.
- LEENSTRA, F. R. Effect of age, sex, genotype and environment on fat deposition in broiler chickens: a review. *World's Poultry Science*, v.42, p.12-25, 1986.
- LISBOA, J. S.; SILVA, D. J. Rendimento de carcaças de três grupos genéticos de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes teores de proteínas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.28, p.548-554, 1999.
- MAIORKA, A.; MACARI, M. *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002, p.167: Carboidratos: Absorção de Minerais.
- NASCIMENTO, A. Pontos importantes na nutrição protéica de frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS – CBNA, Campinas, p.189-202, 2004.
- PATRICK, H.; SCHAIBLE, P. *Poultry: Feeds and Nutrition*. 2.ed. Westport: Avi Publishing Company, 1981, 661p.
- POPE, T.; LOUPE, L. N.; PILLAI, P. B.; EMMERT, J. L. Growth performance and nitrogen excretion of broilers using a phase-feeding approach from twenty-one to sixty-three days of age. *Poultry Science*, 83(4): 676-682, 2004.
- POPE, T. and EMMERT, J. L. Phase-feeding supports maximum growth performance of broiler chicks from forty-three to seventy-one days of age. *Poultry Science* 80(3): 345-352, 2001.

- OVIEDO, E. O. Formulação de rações para frangos de corte com base em alvos de desempenho. In: VII SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA e II SIMPÓSIO GOIANO DE SUINOCULTURA – AVESUI CENTRO-OESTE – SEMINÁRIOS TÉCNICOS DE AVICULTURA. Goiânia, 2005. p. 36-45.
- ROSE, S. P. *Principles of Poultry Science*. Wallingford: CAB International, 1997, p131.
- ROSTAGNO, H.S. *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos – Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais*. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2 ed., 186 p., 2005.
- RUTZ, F. *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002, p.135: Proteínas: Digestão e Absorção.
- SABINO, H. F. N.; SAKOMURA, N. K.; NEME, R.; FREITAS, E. R. Níveis protéicos na ração de frangos de corte na fase de crescimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 39, n.5, p.407-412, 2004.
- SALMON, R. E.; CLASSEN, H. L.; McMILLAN, R. K. Effect of starter and finisher protein on performance, carcass grade and meat yield of broilers. *Poultry Science*, v.62, p.837-845, 1983.
- UNDERWOOD, E.J. *The mineral nutrition of livestock*. 2 ed. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux; 1981. 177p.
- VIEIRA, S. L. *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002, p.129: Carboidratos: Digestão e Absorção.
- WIJJITEN, P. J. A.; LEMME, A.; LANGHOUT, D. J. Effect of different dietary ideal protein concentration on broiler performance. *British Poultry Science* 45:504-511, 2004.

Capítulo 3

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS A, D, E, K EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Berbel, M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciência de Alimentos

Capítulo 3

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS A, D, E, K EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Berbel, M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciência de Alimentos

RESUMO

Métodos seguros, sensíveis e rápidos, para a determinação de vitaminas lipossolúveis em rações, são essenciais para a pesquisa em nutrição animal e, também para o controle de qualidade nas indústrias de rações. A validação desses métodos é uma ferramenta importante para a qualidade e confiabilidade dos resultados laboratoriais. Este trabalho teve como objetivo adaptar um método para a determinação simultânea das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K adicionadas em rações para frangos, utilizando uma extração simples (sólido-líquido), análise por CLAE e validação da metodologia. Para a detecção foi utilizado um DAD, e os comprimentos de onda de 250nm para as vitaminas menadiona e filoquinona, 265nm para as vitaminas colecalciferol e ergocalciferol, 290nm para α -tocoferol, 300nm para δ -tocoferol, e 325nm para palmitato de retinila e all-*trans*-retinol. As recuperações foram determinadas em rações para frangos, e os valores encontrados estavam entre 70,70% e 99,02 %. As quantidades mínimas detectáveis foram menores que os valores recomendados para rações para frangos, e variaram de 0,35 μ g/ml a 15,13 μ g/ml. A repetibilidade foi avaliada através dos coeficientes de variação (CV) obtidos, que apresentou resultados entre 0,8% e 13,7%. O método utilizado neste estudo mostrou-se facilmente aplicável e eficiente para a determinação das vitaminas palmitato de

retinila, colecalciferol, α -tocoferol e menadiona em rações para frangos, entretanto, o método de extração utilizado não se mostrou eficiente para as vitaminas all-*trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocoferol e filoquinona.

ABSTRACT

Reliable, sensitive and rapid methods of determination of vitamins in animal feeds are essential for nutrition research and quality control in feed industries. The validation of this analytic methodology is a very important tool for the reliability and quality of laboratorial results. The objective of the present work was to adapt a method for simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D, E e K in poultry feeds by one-step extraction (solid-liquid) and HPLC analysis, and its validation. For detection of the vitamins it was used a DAD detector and the wavelengths 250nm for vitamins filoquinone and menadione, 265nm for vitamins cholecalciferol and ergocalciferol, 290nm for α -tocoferol and 325nm for retinil palmitate and all-*trans*-retinol. The recovery was determined in poultry feeds, and the values were between 70,70% and 99,02%. Minimum amounts detectable are smaller than the recommended values for the poultry feeds, and it was showed values between 0,35 μ g/ml and 15,13 μ g/ml. Repetibility was evaluated through the variation coefficients (CV), that showed values between 0,8% and 13,7%. The method used in this work is easily applicable and efficient for the vitamins retinil palmitate, cholecalciferol, α -tocoferol and menadione, however, the extraction method used is not efficient for the vitamins all-*trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocoferol and filoquinone.

INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira desempenha um papel significativo na economia, e também no fornecimento de alimentos de alta qualidade à população. Os números alcançados pela avicultura, no contexto nacional e internacional, refletem a alta qualidade genética dos plantéis, nutrição adequada às necessidades de crescimento, monitoramento, profilaxia e controle de doenças, e ambiência, o que permite melhorar as condições de manejo onde são criadas as aves (Bellaver, 2006).

Dentro desse contexto, a qualidade nutricional desempenha um importante papel, sendo que a suplementação vitamínica auxilia para que o desenvolvimento máximo das aves seja alcançado. A adição de uma ou mais vitaminas é muito variável para uma mesma classe animal, ocorrendo variações em função da idade das aves, temperatura ambiente, manejo geral, estado sanitário do plantel, entre outros fatores (Faria e Junqueira, 2000). Entre essas vitaminas, pode-se observar que as lipossolúveis são de extrema importância para o bom crescimento e desenvolvimento das aves, sua defesa contra patógenos, entre outras funções. Desse modo, para assegurar a qualidade nutricional das rações fornecidas a essas aves, principalmente quanto aos níveis de micronutrientes, tornou-se necessário o desenvolvimento de metodologias seguras de quantificação.

Diversos pesquisadores desenvolveram métodos cromatográficos para a separação de diferentes vitaminas lipossolúveis simultaneamente, em diferentes matrizes. Wang e Huang (2002), Mathiasson *et al.* (2002), Burri *et al.* (2003), e Mendonza *et al.* (2003) desenvolveram sistemas de análise multivitamínicos para diversas matrizes, utilizando colunas de fase reversa.

Métodos para análise de vitaminas lipossolúveis em diversos tipos de rações foram desenvolvidos, sendo que, para a detecção e quantificação dessas vitaminas, sua extração com solventes orgânicos, e a determinação pela cromatografia líquida de alta eficiência, são as técnicas mais utilizadas.

Cohen e Lapointe (1978) desenvolveram um método para determinação, em ração, das vitaminas lipossolúveis acetato de retinila, retinol, palmitato de

retinila, tocoferol, acetato de tocoferol, e vitamina D₃. Para isso utilizaram extração com os solventes dioxano-isoctano (20:80); para a separação cromatográfica utilizaram coluna C₁₈, fase móvel composta de metanol:água (95:5) e detector UV. Qian e Sheng (1998) também utilizaram C₁₈ como fase estacionária e metanol como fase móvel, para a determinação de acetato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol e pró-vitamina D₂ em rações, após a extração com hexano.

Surai e Sparks (2001) desenvolveram um trabalho sobre a influência de tocoferóis para frangos e analisaram sua dieta e também os ovos produzidos por essas aves. Para isto utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência, com coluna C₁₈, e metanol:água (97:3), como fase móvel.

Neste trabalho, o método cromatográfico utilizado e validado, adaptado de Cohen e Lapointe (1978), que utiliza coluna C₁₈, e como fase móvel, metanol e água, foi eficiente para a separação dos vitâmeros: palmitato de retinila, *all-trans*-retinol, colecalciferol, ergocalciferol, α -tocoferol, δ -tocoferol, menadiona e filoquinona. Para a extração das vitaminas, utilizou-se o método de Gomis *et al.* (2000), também adaptado.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Amostras de rações para frangos de corte, foram fornecidas por indústrias da região de Campinas, São Paulo.

Os padrões das vitaminas A (*all-trans*-retinol e palmitato de retinila), D (ergocalciferol e colecalciferol), E (α -tocoferol e δ -tocoferol) e K (filoquinona e menadiona) foram obtidos da marca Sigma.

Para a extração das vitaminas foram utilizados etanol e hexano de grau de pureza analítico. No processo de extração das vitaminas, e na preparação da fase móvel, utilizou-se água obtida de sistema Milli-Q (MILLIPORE). Para a fase móvel foi utilizado metanol grau cromatográfico, e, após a preparação da fase móvel, esta foi filtrada em membrana Millipore Fluoropore, com 0,5 μ m de poro, e, em seguida, degaseificada em aparelho de ultra-som.

Equipamentos

O equipamento de cromatografia líquida utilizado foi um Hewlett Packard Series 1050, composto por bomba isocrática, com injetor manual Reody, com alça de amostragem de 20µl, acoplado a detector de arranjo de diodo (DAD).

A coluna cromatográfica utilizada foi: Coluna Nova Pack C₁₈ , com 15 x 3,9 cm, com 5µm de diâmetro de partícula.

Métodos

Foram preparadas soluções dos padrões das vitaminas all-*trans*-retinol, palmitato de retinila, ergocalciferol, colecalciferol, α-tocoferol, δ-tocoferol, filoquinona e menadiona, em etanol, e suas concentrações determinadas por meio da absorbância medida em espectrofotômetro. As soluções padrões foram armazenadas em frascos envoltos em papel alumínio, e armazenados a -10°C. A manipulação dos padrões e das amostras durante a extração foi realizada sob condições mínimas de luz.

As amostras de ração foram previamente trituradas, e armazenadas, em pequenas quantidades, a -10° C. A metodologia analítica para a extração simultânea das vitaminas foi baseada em Gomis *et al.* (2000). Para a extração das formas vitamínicas das matrizes utilizou-se etanol com 0,25% de BHT, seguida de partição com hexano. A fração do hexano foi evaporada com nitrogênio e ressuspensa em metanol. A metodologia utilizada para a extração seguiu o fluxograma apresentado na **Figura 1**.

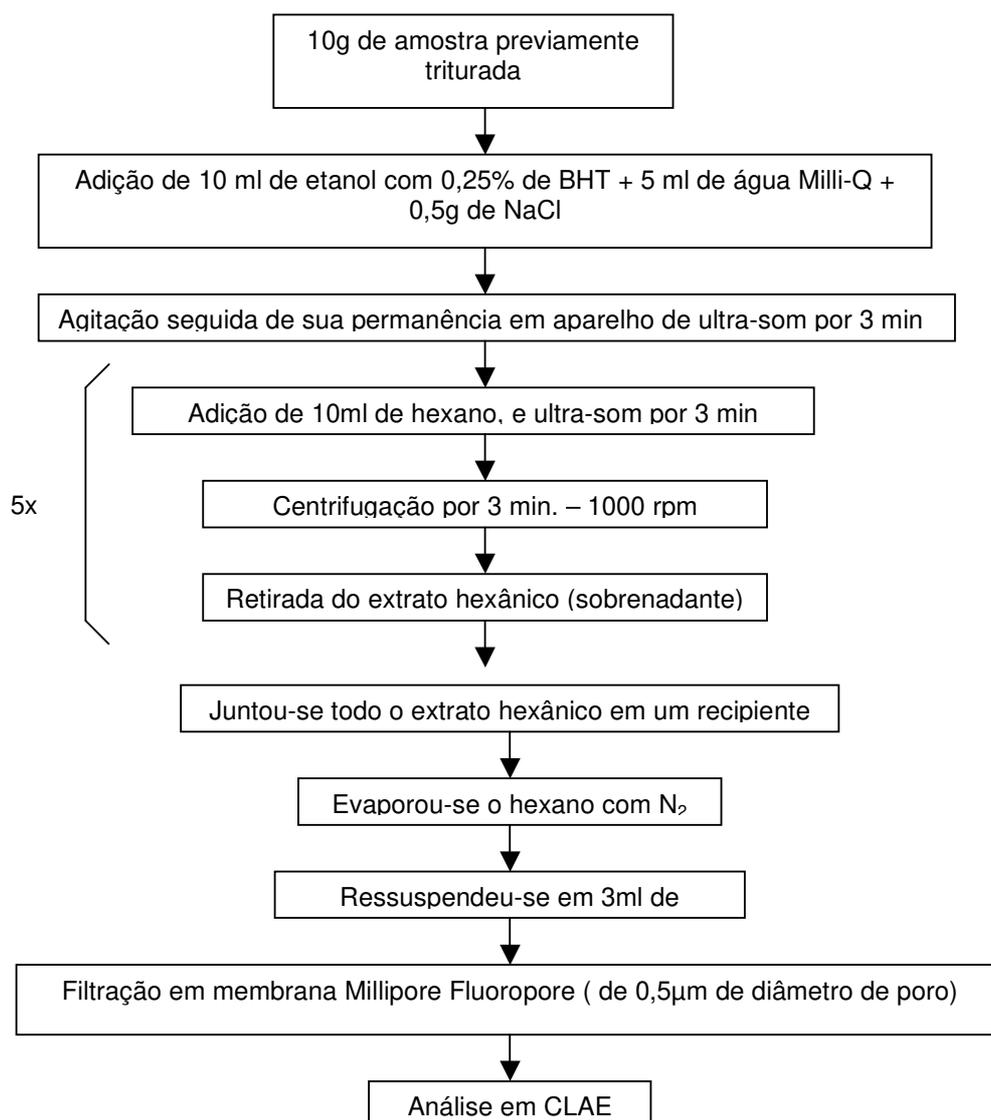


Figura 1 – Fluxograma da extração e determinação das vitaminas lipossolúveis adicionadas em rações para frangos.

Os extratos foram filtrados em membranas Millipore Fluoropore de 0,5 µm de poro, para serem, em seguida, injetados no cromatógrafo. Para separação das vitaminas foi utilizada coluna de fase reversa, e um sistema isocrático adaptado para troca de fase móvel durante a análise cromatográfica. Para a análise

cromatográfica foi utilizado o método de Cohen e Lapointe (1978) modificado. Como fase móvel, foi utilizado o sistema: 0-10 min metanol:água (95:5), 10-25 min metanol (100%), e 25-30 min metanol:água (95:5), à vazão de 1ml/min, sendo necessários 10 min de acondicionamento da coluna entre as injeções. Para a detecção foram utilizados os comprimentos de onda: 325nm para all-*trans*-retinol e palmitato de retinila; 265nm para ergocalciferol e colecalciferol; 290nm para α -tocoferol; 300nm para δ -tocoferol; e 250nm para filoquinona e menadiona.

Para identificação, utilizou-se a comparação dos tempos de retenção obtidos com os padrões nas mesmas condições cromatográficas, co-cromatografia, e os espectros de absorção obtidos no DAD. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa.

Validação da metodologia

Os valores adotados para os limites de detecção foram obtidos com o uso de soluções padrão, diluídas sucessivamente, analisadas sob as mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente, observando-se assim, a menor quantidade detectável. Esta menor quantidade detectável foi considerada aproximadamente duas a três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento (Prado e Godoy, 2002). Os limites de quantificação foram considerados 2 vezes o limite de detecção (Miranda, 2004).

A repetibilidade para os padrões foi determinada em 10 repetições, em dois níveis de concentrações vitamínicas. A repetibilidade para a matriz alimentar foi determinada em 5 repetições em duplicata, em dois níveis de concentração.

Testes de recuperação foram realizados com a adição das soluções padrão às amostras, em dois diferentes níveis de concentração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Figura 2** pode-se observar o cromatograma com a separação simultânea dos padrões.

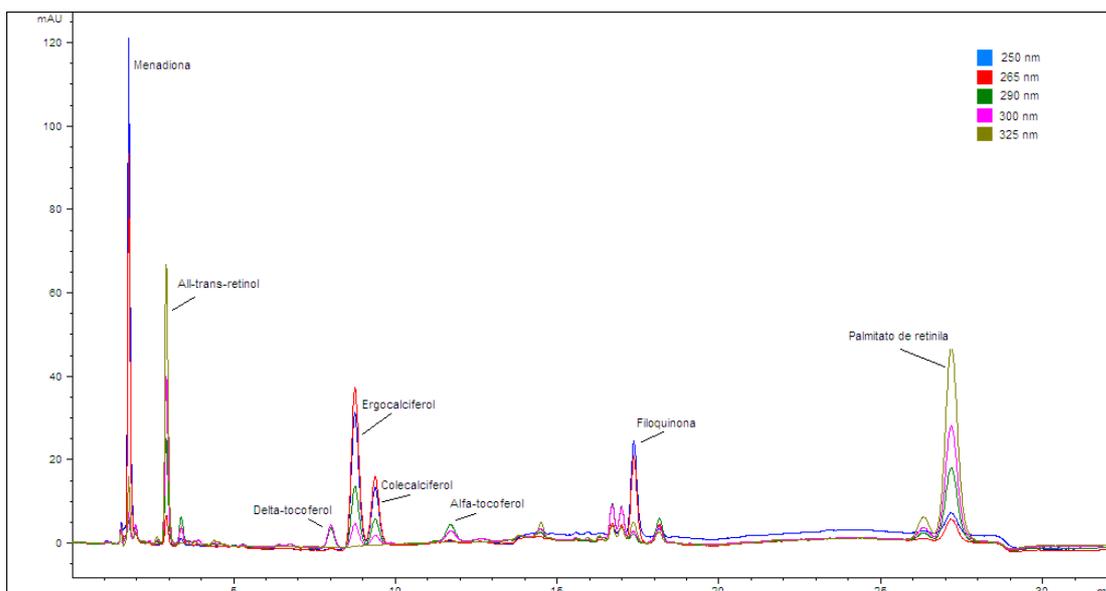


Figura 2 – Cromatograma dos padrões de vitamina A (palmitato de retinila e *all-trans*-retinol), D (ergocalciferol e colecalciferol), E (α -tocoferol e δ -tocoferol), e K (menadiona e filoquinona). Condições cromatográficas: coluna C_{18} com sistema de eluição isocrático, adaptado para troca de fase móvel: 0-10 min metanol:água (95:5); 10-25min metanol (100%); 25-30 min metanol:água (95:5). Vazão: 1ml/min. Detecção nos comprimentos de onda: 250nm, 265nm, 290nm, 300nm e 325nm.

As curvas analíticas de padronização externa das vitaminas apresentaram linearidade nas faixas de concentração estabelecidas. Isso pode ser verificado pelos valores dos coeficientes de correlação, pois são iguais ao, ou próximos do valor 1, o que demonstra maior probabilidade de existir uma relação linear definida pelas equações lineares apresentadas, onde $y = Ax + B$ (**Tabela 1**). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90. Os limites de detecção e quantificação podem ser observados na **Tabela 2**.

Tabela 1 - Equações lineares e coeficientes de correlação das curvas padrão das vitaminas all-*trans*-retinol, palmitato de retinila, ergocalciferol, colecalciferol, δ -tocoferol, α -tocoferol, filoquinona, e menadiona.

VITAMINA	FAIXA DE CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/ml}$)	A	B	R ²
All- <i>trans</i> -retinol	0,352 - 90	5083,6	-0,0352	1
Palmitato de retinila	0,664 - 170	7171,8	-1,1013	1
Ergocalciferol (D ₂)	1,031 - 264	2304,4	-0,7771	1
Colecalciferol (D ₃)	0,828 - 106	2361,6	-0,3502	0,9999
δ -tocoferol	6,563 - 210	403,33	-1,7845	0,9991
α -tocoferol	15,125 - 242	317,96	-3,8621	0,994
Filoquinona (K ₁)	0,641 - 82	3503	+0,2833	0,9997
Menadiona (K ₃)	0,391 - 100	5768,9	+0,2527	0,9999

A: coeficiente angular; B: coeficiente linear; R²: coeficiente de correlação.

Tabela 2 – Limites de detecção e limites de quantificação das vitaminas analisadas.

VITAMINA	LD		LQ	
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/g}$
All- <i>trans</i> -retinol	0,352	0,105	0,704	0,211
Palmitato de retinila	0,664	0,199	1,328	0,398
Ergocalciferol (D ₂)	1,031	0,309	2,062	0,618
Colecalciferol (D ₃)	0,828	0,248	1,656	0,496
δ -tocoferol	6,563	1,968	13,126	3,937
α -tocoferol	15,125	4,537	30,250	9,075
Filoquinona (K ₁)	0,641	0,192	1,282	0,384
Menadiona (K ₃)	0,391	0,117	0,782	0,234

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

Os limites de detecção encontrados para as vitaminas colecalciferol e α -tocoferol foram maiores que os encontrados por Qian e Sheng (1998), que obtiveram 10ng/g para essas vitaminas em rações. Mathiasson *et al.* (2002) obtiveram limites de detecção próximos de 0,1 $\mu\text{g/g}$ para as vitaminas all-*trans*-retinol, α -, β - e γ -tocoferol, e colecalciferol, extraídas de alimentos processados. Burri *et al.* (2003) encontraram 2 ng/ml para o α -tocoferol, e 0,6 ng/ml para o retinol, extraídos de soro humano. Cohen e Lapointe (1978) encontraram limite de detecção de 0,075 $\mu\text{g/g}$, para o acetato de retinila, 250 $\mu\text{g/g}$ para a vitamina D₃, e, para o α -tocoferol acetato, 0,005 $\mu\text{g/g}$.

Os resultados obtidos neste trabalho, para os limites de detecção, foram maiores, ou próximos dos valores citados anteriormente. Entretanto, os limites de

detecção e quantificação foram menores que os valores mínimos recomendados para rações para frangos, segundo as Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (**Quadro 1**), podendo, desse modo, se utilizar este método para a determinação das vitaminas palmitato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol e menadiona.

Quadro 1 - Níveis de suplementação de vitaminas lipossolúveis para rações de aves (quantidade por kg de ração).

Nutriente	Frangos de corte e aves de reposição		Frangos de corte retirada	Reprodutores
	Inicial	Crescimento		
Vitamina A (mg)	5,5	4,4	2,2	4,95
Vitamina D ₃ (µg)	50	40	20	62,5
Vitamina E (mg)	23,5	18,8	9,4	26,8
Vitamina K ₃ (mg)	1,7	1,4	0,7	2

Fonte: Rostagno et al., 2005.

A repetibilidade para os padrões vitamínicos em solução metanólica e adicionados à ração podem ser observados na **Tabela 3**. Na mesma tabela, pode-se observar a recuperação dos padrões adicionados à ração. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos Coeficientes de Variação (CV) de até de 20%, dependendo da complexidade da amostra (Ribani *et al.* 2004).

Tabela 3 - Repetibilidade e recuperação das formas vitamínicas: palmitato de retinila, all-*trans*-retinol, colecalciferol, ergocalciferol, α -tocoferol, δ -tocoferol, menadiona e filoquinona, em solução padrão, e adicionadas à ração.

Matriz	Forma Vitamínica	Concentração	Repetibilidade* (CV%)	Recuperação (%)	
Padrão	Palmitato de retinila	21,2 $\mu\text{g/ml}$	1,66	-	
		85 $\mu\text{g/ml}$	0,98	-	
	All- <i>trans</i> -retinol	11,25 $\mu\text{g/ml}$	1,92	-	
		45,00 $\mu\text{g/ml}$	0,90	-	
	Colecalciferol	13,25 $\mu\text{g/ml}$	1,60	-	
		53 $\mu\text{g/ml}$	1,30	-	
	Ergocalciferol	33,00 $\mu\text{g/ml}$	1,02	-	
		132,00 $\mu\text{g/ml}$	1,46	-	
	α -tocoferol	30,25 $\mu\text{g/ml}$	13,73	-	
		121 $\mu\text{g/ml}$	3,58	-	
	δ -tocoferol	26,25 $\mu\text{g/ml}$	6,29	-	
		105,00 $\mu\text{g/ml}$	2,97	-	
	Menadiona	12,5 $\mu\text{g/ml}$	0,77	-	
		50 $\mu\text{g/ml}$	0,99	-	
	Filoquinona	10,25 $\mu\text{g/ml}$	3,54	-	
		41,0 $\mu\text{g/ml}$	2,52	-	
	Ração	Palmitato de retinila	2,84 $\mu\text{g/g}$	7,70	83,87
			7,88 $\mu\text{g/g}$	4,29	82,48
All- <i>trans</i> -retinol		6,63 $\mu\text{g/g}$	6,97	73,88	
		21,95 $\mu\text{g/g}$	4,91	81,33	
Colecalciferol		14,47 $\mu\text{g/g}$	2,38	97,05	
		35,73 $\mu\text{g/g}$	7,29	99,02	
Ergocalciferol		20,69 $\mu\text{g/g}$	2,11	75,42	
		72,01 $\mu\text{g/g}$	6,27	89,81	
α -tocoferol		39,60 $\mu\text{g/g}$	2,59	98,22	
		73,14 $\mu\text{g/g}$	6,85	90,25	
δ -tocoferol		21,31 $\mu\text{g/g}$	3,86	75,18	
		62,40 $\mu\text{g/g}$	8,53	88,76	
Menadiona		861,61 $\mu\text{g/g}$	10,38	87,80	
		2889 $\mu\text{g/g}$	2,81	70,70	
Filoquinona		6,42 $\mu\text{g/g}$	3,54	83,92	
		23,50 $\mu\text{g/g}$	6,67	93,74	

* Repetibilidade determinada para os padrões em 10 repetições, em dois níveis de concentração, e para a ração, 5 repetições em duplicata.

Os níveis de recuperação dos padrões adicionados à ração situaram-se entre 70,70% e 99,02%. Os resultados mínimo e máximo para as repetibilidades dos padrões em metanol foram 0,90% e 13,73%, e para os padrões adicionados à ração foram 2,11% e 10,35%.

Segundo Ribani *et al.* (2004), a limitação do procedimento de recuperação, é a de que a substância adicionada não está necessariamente na mesma forma

que àquela presente na amostra. Isso pode implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor detecção, ocasionando avaliações excessivamente otimistas da recuperação. O método de extração utilizado neste trabalho se mostrou eficiente para a extração das vitaminas mais comumente adicionadas às rações para frangos de corte (palmitato de retinila, D₃, α -tocoferol e K₃). Entretanto, para a determinação de vitaminas que possam estar presentes naturalmente nos alimentos utilizados na formulação destas rações, seria necessário comparar o método de extração utilizado neste trabalho, com métodos mais eficientes para a extração de vitaminas em matrizes complexas, como, por exemplo, os métodos enzimáticos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas etapas de validação foram satisfatórios para as vitaminas estudadas. Os parâmetros de limite de detecção e limite de quantificação apresentaram valores inferiores aos mínimos recomendados para rações para aves. As taxas de repetibilidade obtidas foram inferiores a 14%. As faixas de linearidade para a quantificação das vitaminas mostraram-se amplas. Os valores de recuperação dos padrões adicionados à amostra foram superiores a 70%, chegando a 99%.

O método cromatográfico adaptado para a análise de rações para frangos demonstrou-se satisfatório para a análise das vitaminas palmitato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol e filoquinona, e sua simplicidade permite sua aplicação na rotina laboratorial, desde que revalidado para o local onde será utilizado. Para a análise das vitaminas *all-trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocoferol e filoquinona, seriam necessários maiores estudos a respeito da extração dessas vitaminas em matrizes complexas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003.*
- BELLAVER, C. O mito do hormônio na carne de frangos. *Avicultura Industrial*, n. 8, ed. 1148, p. 14-15, 2006.
- BURRI, B. J.; DOPLER-NELSON, M. NEIDLLINGER, T.R. Mesurements of the major isoforms of vitamins A and E and carotenoids in the blood of people with spinal-cord injuries. *Journal of Chromatograph A*, v. 987, p. 359-366, 2003.
- COHEN, H.; LAPOINTE, M. Method for extraction and cleanup of animal feed for the determination of lipossoluble vitamins D, A, and E by High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 26, p. 1210-1213, 1978.
- FARIA, D.E.; JUNQUEIRA, O.M. *Enfermidades Nutricionais, Em: Doenças das Aves.* Campinas: FACTA – Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 431-448, 2000.
- GOMIS, D. B.; FERNÁNDEZ, M. P.; GUTIÉRREZ ALVARES, M^a. D. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolm liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 891, p. 109-114, 2000.
- INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. *Orientações sobre validação de métodos de ensaio químico*, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- MATHIASSEN, L.; TURNER, C.; BERG, H.; DAHLBERG, L.; THEOBALD, A.; ANKLAM, E.; GINN, R.; SHARMAN, M.; ULBERTH, F.; GABERNIG, R. Development of methods for the determination of vitamins A, E and β -carotene in processed foods based on supercritical fluid extraction: a collaborative study. *Food Additives and Contaminants*, v. 19, p. 632-646, 2002.

- MENDONZA, B.R.; PONS, S.M.; BARGALLÓ, A.I.C.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Rapid determination by reversed phase high performance liquid chromatography of vitamins A and E in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, v. 1018, p. 197-202, 2003.
- MIRANDA, Lucilene Soares. *Estabilidade das vitaminas A e E em alimentos enriquecidos com diferentes fontes de ferro*. 2004, 119p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas.
- PRADO, M. A. E GODOY, H. T.; Validation of the methodology to determination synthetic dyes in foods and beverages by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 25, p. 2455-2472, 2002.
- QIAN, H.; SHENG, M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D₂ in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 825, p. 127-133, 1998.
- REBEL, J. M. J.; VAN DAM, J. T. P.; ZEKARIAS, B.; BALK, F. R. M.; POST, J.; FLORES MINAMBRES, A.; TER HUURNE, A. A. H. M. Vitamin and trace mineral in feed of breeders and their progeny: affects of growth, feed conversion and severity of malabsorption syndrome of broilers. *British Poultry Science*, v. 45, p. 201-209, 2004.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p.771-780, 2004.
- SURAI, P.F.; SPARKS, N.H.C. Comparative evaluation of the effect of two maternal diets on fatty acids, vitamin E and carotenoids in the chick embryo. *British Poultry Science*, v. 42, p. 252-259, 2001.
- WANG, L.H.; HUANG, S.H. Determinations of. Vitamins A, D, E and K in human and bovine serum, and β -carotene and vitamin A palmitate in cosmetic and pharmaceutical products, by isocratic HPLC. *Chromatographia*, v. 55, p. 289-294, 2002.

Capítulo 4

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS EM AMOSTRAS DE RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Berbel, M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciência de Alimentos

Capítulo 4

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS EM AMOSTRAS DE RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Berbel, M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciência de Alimentos

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a quantificação das vitaminas lipossolúveis palmitato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol e menadiona, e a detecção das vitaminas all-*trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocoferol e filoquinona, em amostras de rações para frangos de corte. Utilizou-se para a extração das vitaminas, o método de Gomis *et al* (2000). adaptado, e para a análise cromatográfica, o método de Cohen e Lapointe (1978) modificado. Para a quantificação e detecção das vitaminas utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado um DAD e os comprimentos de onda de 250nm para as vitaminas menadiona e filoquinona, 265nm para as vitaminas colecalciferol e ergocalciferol, 290nm para α -tocoferol, 300nm para δ -tocoferol, e 325nm para palmitato de retinila e all-*trans*-retinol. Nenhuma das amostras apresentou resultados igual ou acima do recomendado para frangos de corte de diferentes idades, para as vitaminas lipossolúveis quantificadas simultaneamente.

ABSTRACT

In this work was achieved the quantification of fat-soluble vitamins retinil palmitate, cholecalciferol, α -tocopherol and menadione, and the detection of vitamins all-*trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocopherol and filoquinone of poultry feed samples. For the extraction of the vitamins, was used the Gomis *et al* (2000). method, and for the chromatographic analysis it was used the Cohen and Lapointe (1978) method, both modified. For the quantification and detection of the vitamins was used HPLC connected for the DAD detector and the wavelengths 250nm for vitamins filoquinone and menadione, 265nm for vitamins cholecalciferol and ergocalciferol, 290nm for α -tocopherol and 325nm for retinil palmitate and all-*trans*-retinol. None of the samples showed values according to the recommended for poultry feeds of different ages, for the four vitamins analysed simultaneously.

INTRODUÇÃO

A relação entre nutrição e saúde animal é conhecida há muito tempo. Deficiências nutricionais aumentam a morbidade e mortalidade, o que pode ser explicado por sua relação com a resposta imunológica animal (Chew, 1996).

Em aves alimentadas com ração deficiente em vitamina A, houve queda na defesa em mucosas, e o peso de bursa e de timo foram afetados negativamente. Em aves alimentadas com rações deficientes em vitamina E houve redução no número de linfócitos na bursa e timo (Rebel *et al.*, 2004). A suplementação com vitaminas também interfere em outros fatores de grande importância como desenvolvimento da ave, produtividade e qualidade da carne. Por estas razões, a quantificação de vitaminas em suplementos e rações deve ser avaliada (Villamide e Fraga, 1999).

Algumas vitaminas contidas em premix perdem sua bioatividade devido à oxidação, iniciada por catalisadores como o ar, luz, calor, presença de ácidos, íons metálicos, ácidos-graxos insaturados e outros oxidantes. Tavčar-Kalcher e

Vengušt (2007) demonstraram que as vitaminas A, E e K₃ presentes em premix, armazenadas durante 12 meses em condições controladas, foram reduzidas em 53%, 59% e 80% respectivamente, de seu valor inicial. Dados sobre a instabilidade dessas vitaminas demonstram a necessidade de se desenvolver métodos rápidos e sensíveis para avaliação tanto de premixes como de rações prontas. Resultados precisos sobre as concentrações vitamínicas em produtos para a alimentação animal são essenciais para a pesquisa em nutrição e para a garantia da qualidade nas indústrias de alimentos para animais.

O método oficial da AOAC para as vitaminas lipossolúveis inclui ensaios separados para a detecção, baseados em colorimetria. A complexidade e o tempo para a execução dos métodos da AOAC tornam-nos de difícil uso na rotina laboratorial. Entretanto, novos procedimentos utilizando CLAE têm sido empregados e, então, simplicidade e rapidez tem sido melhoradas (Qian e Sheng, 1998). Cohen e LaPointe (1978) e Qian e Sheng (1998) desenvolveram métodos para a determinação de vitaminas em rações animais. Rushing *et al*, (1991) descreveram um método para a determinação simultânea das vitaminas A e E em rações para roedores, por CLAE. Além disso, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido utilizada para a análise das vitaminas A, D, E e K em suplementos, alimentos e soro.

Este estudo teve como objetivo, determinar simultaneamente a concentração de vitaminas lipossolúveis em rações para frangos de corte, utilizando o método cromatográfico adaptado de Cohen e LaPointe (1978).

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Analisaram-se amostras de rações para frangos de corte, destinadas a diversas fases de crescimento, fornecidas por indústrias da região de Campinas, São Paulo. Foram analisadas amostras de 3 diferentes lotes de cada marca e fase.

Os padrões das vitaminas A (*all-trans*-retinol e palmitato de retinila), D (ergocalciferol e colecalciferol), E (α -tocoferol e δ -tocoferol) e K (filoquinona e menadiona), foram obtidos da marca Sigma.

Para a extração das vitaminas foram utilizados etanol e hexano de grau de pureza analítico. Na extração e preparação da fase móvel utilizou-se água obtida de sistema Milli-Q (MILLIPORE). Para a fase móvel foi utilizado metanol de grau cromatográfico, e após a preparação da fase móvel, esta foi filtrada em membrana Millipore Fluoropore, com 0,5 μ m de poro, e, em seguida, degaseificada em aparelho de ultra-som.

Equipamentos

O equipamento de cromatografia líquida utilizado foi um Hewlett Packard Series 1050, composto por bomba isocrática, injetor manual Reody, com alça de amostragem de 20 μ l, acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD).

Foi utilizada uma Coluna Nova Pack C18 , com 15 x 3,9 cm, com 5 μ m de diâmetro de partícula.

Métodos

Foram preparadas soluções dos padrões das vitaminas separadamente em etanol, e suas concentrações determinadas por meio da absorvância medida em espectrofotômetro. As soluções padrões foram armazenadas em frascos envoltos em papel alumínio, e armazenados a -10° C. A manipulação dos padrões e das amostras durante a extração foi realizada sob condições mínimas de luz.

As amostras de ração foram previamente trituradas, e armazenadas, em pequenas quantidades, a -10° C. A metodologia analítica para a extração simultânea das vitaminas foi baseada em Gomis *et al.* (2000). Para a extração das formas vitamínicas das matrizes utilizou-se etanol com 0,25% de BHT, seguida de partição com hexano. A fração do hexano foi evaporada com nitrogênio e

ressuspensa em metanol. A metodologia utilizada para a extração seguiu o fluxograma apresentado na **Figura 1**.

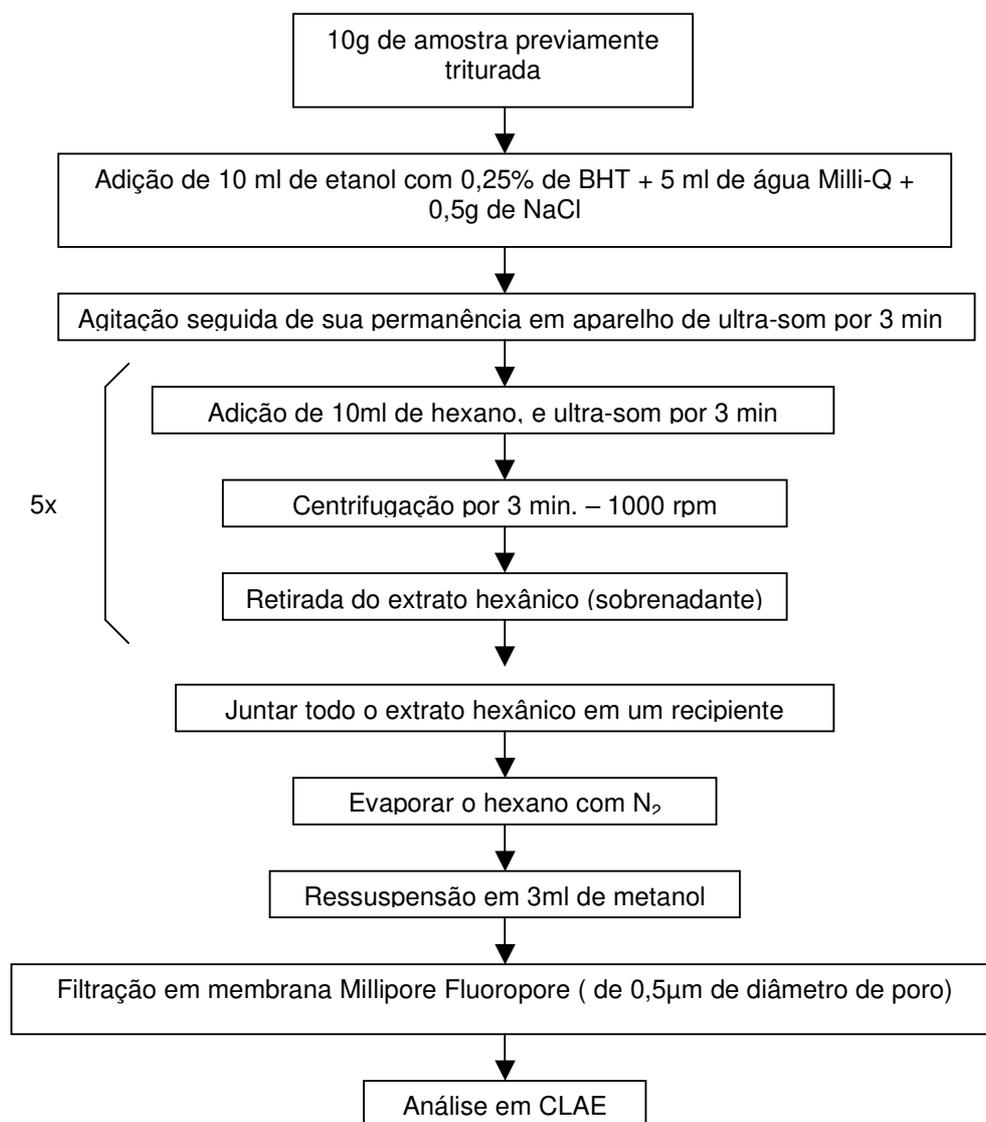


Figura 1 – Fluxograma da extração e determinação das vitaminas lipossolúveis adicionadas em rações para frangos.

Os extratos foram filtrados em membranas Millipore Fluoropore de 0,5 μm de poro, para serem, em seguida, injetados no cromatógrafo. Para separação das vitaminas foi utilizada coluna Nova Pack C₁₈, de 15 x 3,9 cm, com 5 μm de diâmetro de partícula, e um sistema isocrático adaptado para troca de fase móvel durante a análise cromatográfica. Para a análise cromatográfica foi utilizado o método de Cohen e Lapointe (1978) modificado. Como fase móvel, foi utilizado o sistema: 0-10 min metanol:água (95:5), 10-25 min metanol, e 25-30 min metanol:água (95:5), à vazão de 1ml/min, sendo necessários 10 min de condicionamento da coluna entre as injeções. Para a detecção foram utilizados os comprimentos de onda: 325nm para palmitato de retinila e all-*trans*-retinol; 265nm para colecalciferol e ergocalciferol; 300nm para δ -tocoferol; 290nm para α -tocoferol; e 250nm para menadiona e filoquinona.

Para identificação, utilizaram-se a comparação dos tempos de retenção obtidos com os padrões nas mesmas condições cromatográficas, co-cromatografia, e os espectros de absorção obtidos no DAD. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo, pode-se observar o cromatograma da análise de uma das amostras de rações (**Figura 2**).

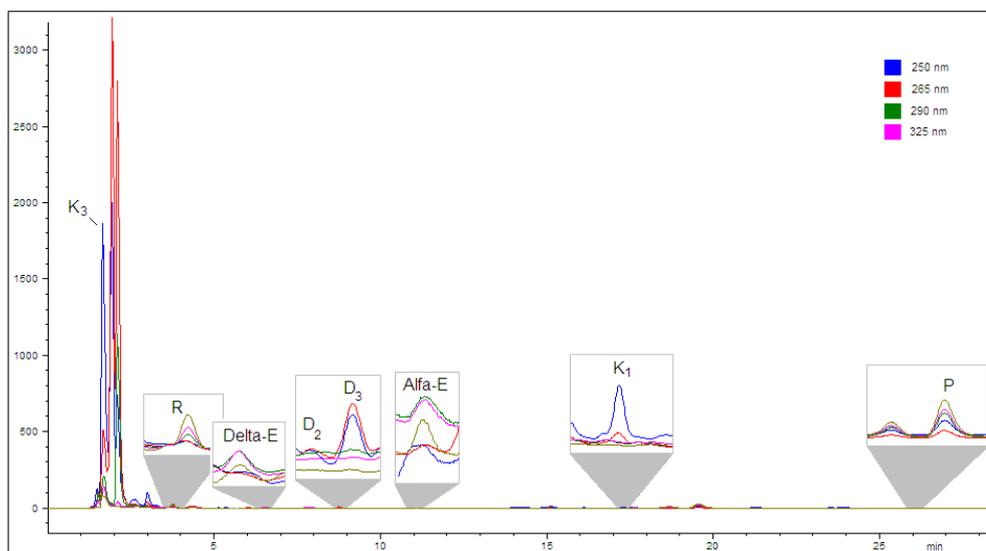


Figura 2 – Cromatograma da análise das vitaminas menadiona (K_3), all-*trans*-retinol (R), δ -tocoferol (Delta-E), ergocalciferol (D_2), cocalciferol (D_3), α -tocoferol (Alfa-E), filoquinona (K_1) e palmitato de retinila (P), pelo método de Cohen e Lapointe adaptado. Condições cromatográficas: coluna C_{18} com sistema de eluição isocrático, adaptado para troca de fase móvel; 0-10 min metanol:água (95:5); 10-25min metanol (100%); 25-30 min metanol:água (95:5). Vazão: 1ml/min.

No **Quadro 1** pode-se observar os níveis recomendados de vitaminas lipossolúveis para diferentes idades, segundo as Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (Rostagno *et al.*, 2005).

Quadro 1 – Níveis de suplementação de vitaminas lipossolúveis para rações de aves (quantidade por kg de ração).

Nutriente	Frangos de corte e aves de reposição		Frangos de corte retirada (final)	Reprodutores
	Inicial	Crescimento		
Vitamina A (UI)	10000	8000	4000	9000
Vitamina D_3 (UI)	2000	1600	800	2500
Vitamina E (UI)	35	28	14	40
Vitamina K_3 (mg)	1,7	1,4	0,7	2

Fonte: Rostagno *et al.*, 2005.

Como não há suplementação vitamínica recomendada para a fase pré-inicial, utilizada por alguns fabricantes, foi utilizado como nível mínimo, o recomendado para a fase inicial.

Na **Tabela 1** podem-se observar os resultados obtidos para a quantificação das vitaminas lipossolúveis palmitato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol e menadiona, em rações para frangos de corte. Na **Tabela 2** pode-se verificar a estimativa dos valores dos vitâmeros all-*trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocoferol e filoquinona nas mesmas amostras.

Tabela 1 – Teores das vitaminas* palmitato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol, e menadiona, em amostras de rações para frangos de corte.

Amostra		Palmitato de retinila (UI/kg)			Colecalciferol (UI/kg)			α -tocoferol (UI/kg)			Menadiona (mg/kg)		
Marca	Fase	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
A	Crescimento	ND	ND	ND	363 \pm 3	680 \pm 7	261 \pm 2	34 \pm 2	31,1 \pm 0,4	25 \pm 2	2,879 \pm 0,002	3,6320 \pm 0,0003	5,767 \pm 0,002
	Engorda	ND	ND	ND	725 \pm 4	882 \pm 2	289 \pm 1	5,54 \pm 0,09	7,6 \pm 0,2	35,5 \pm 0,5	2,0455 \pm 0,0003	4,171 \pm 0,001	2,737 \pm 0,002
	Pré-inicial	ND	LNF	LNF	313 \pm 9	LNF	LNF	49 \pm 4	LNF	LNF	3,02 \pm 0,01	LNF	LNF
B	Inicial	ND	LNF	LNF	211 \pm 2	LNF	LNF	34,1 \pm 0,4	LNF	LNF	2,21 \pm 0,002	LNF	LNF
	Crescimento	ND	LNF	LNF	110,36 \pm 0,08	LNF	LNF	22,0 \pm 0,4	LNF	LNF	1,464 \pm 0,001	LNF	LNF
	Abate	ND	LNF	LNF	434 \pm 2	LNF	LNF	22,7 \pm 0,4	LNF	LNF	1,535 \pm 0,001	LNF	LNF
	Matriz	ND	ND	ND	156,88 \pm 0,01	244 \pm 2	193 \pm 2	38 \pm 1	28 \pm 2	37 \pm 2	4,357 \pm 0,002	3,98 \pm 0,003	4,293 \pm 0,006
	Pré-inicial	T	753,3 \pm 0,3	T	148 \pm 1	93,9 \pm 0,9	139 \pm 1	18,2 \pm 0,6	14,69 \pm 0,06	30 \pm 3	3,016 \pm 0,004	2,83 \pm 0,003	4,601 \pm 0,002
	Inicial	738,7 \pm 0,6	1605 \pm 2	1391 \pm 3	239 \pm 1	293 \pm 3	321 \pm 4	47,3 \pm 0,2	13,7 \pm 0,6	32,3 \pm 0,5	5,3659 \pm 0,0003	4,79 \pm 0,002	3,790 \pm 0,001
C	Crescimento	824,9 \pm 0,4	1572 \pm 2	788 \pm 3	138,3 \pm 0,2	217 \pm 3	345 \pm 10	33,1 \pm 0,3	17 \pm 1	13 \pm 1	6,421 \pm 0,003	3,430,008	3,275 \pm 0,003
	Abate	1159,6 \pm 0,3	663,7 \pm 0,2	775,5 \pm 0,7	495 \pm 6	125 \pm 2	180 \pm 2	87 \pm 1	28 \pm 2	29,1 \pm 0,3	7,98 \pm 0,02	8,14 \pm 0,01	4,27 \pm 0,01
D	Inicial	ND	T	ND	819 \pm 4	1525,7 \pm 0,4	3111 \pm 7	47,3 \pm 0,3	65,34 \pm 0,08	16 \pm 2	8,13 \pm 0,01	1,650 \pm 0,004	1,905 \pm 0,003
	Crescimento	T	T	T	2762 \pm 8	2010 \pm 6	2030 \pm 1	75,2 \pm 0,4	41 \pm 2	56,1 \pm 0,1	3,224 \pm 0,008	1,393 \pm 0,001	1,128 \pm 0,005

ND: Não detectável; T: traço (resultado obtido abaixo do limite de quantificação); LNF: Lote não fornecido.

*Média e estimativa de desvio padrão de duas determinações.

Tabela 2 – Estimativa dos valores das vitaminas all-*trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocoferol e filoquinona em rações para frangos.

Marca	Amostra	All- <i>trans</i> -retinol (UI/kg)			Ergocalciferol (UI/kg)			δ -tocoferol (UI/kg)			Filoquinona (mg/kg)		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
A	Crescimento	3,28	0,85	3,93	ND	ND	ND	ND	T	ND	1,66	1,99	T
	Engorda	4,55	2,86	10,62	ND	ND	ND	T	0,12	0,24	2,35	1,94	1,42
B	Pré-inicial	ND	LNF	LNF	26,89	LNF	LNF	0,34	LNF	LNF	0,46	LNF	LNF
	Inicial	ND	LNF	LNF	39,70	LNF	LNF	0,20	LNF	LNF	0,39	LNF	LNF
	Crescimento	ND	LNF	LNF	T	LNF	LNF	0,34	LNF	LNF	0,46	LNF	LNF
	Abate	ND	LNF	LNF	22,89	LNF	LNF	0,34	LNF	LNF	9,52	LNF	LNF
C	Matriz	1,09	4,30	ND	T	T	ND	0,64	0,48	0,48	0,76	ND	0,77
	Pré-inicial	17,37	25,04	24,27	T	ND	ND	0,31	0,19	0,28	T	ND	1,54
	Inicial	6,46	23,65	31,85	113,77	82,16	ND	0,53	0,70	0,75	5,09	1,10	2,56
	Crescimento	6,41	9,95	25,45	126,58	88,70	ND	0,49	0,48	0,81	1,89	2,76	10,33
	Abate	5,24	9,85	20,14	39,13	T	ND	0,56	0,17	T	66,45	4,75	2,64
D	Inicial	ND	ND	ND	439,62	27,79	ND	ND	0,07	0,22	6,20	0,54	36,04
	Crescimento	2,60	2,19	1,99	ND	ND	ND	0,25	0,10	T	4,98	1,32	0,92

ND: Não detectável; T: traço (resultado obtido abaixo do limite de quantificação); LNF: Lote não fornecido.

Apenas em 10, das 31 amostras estudadas, foi possível quantificar a vitamina A na forma de palmitato de retinila, entretanto, nenhuma dessas amostras atingiu o nível mínimo de suplementação recomendado, que seria de 10000 UI/kg, 8000 UI/kg e 4000 UI/kg de ração, para as fases inicial, crescimento e final, respectivamente. O palmitato de retinila foi detectado, na forma de traços, em 6 amostras.

Foi possível quantificar a vitamina D₃ em todas as amostras analisadas. Em 4 amostras, pertencentes à marca D, foi observado valor superior ao recomendado por Rostagno *et al.* (2005), que é de 2000 UI/kg para a fase inicial, 1600 UI/kg para a fase crescimento, e 800 UI/kg para a fase de retirada.

O α -tocoferol (vitamina E) pôde ser quantificado em todas as amostras analisadas, entretanto, foram observados valores de acordo com os recomendados por Rostagno *et al.* (2005) somente em 15 das 31 amostras. Apenas 1 das 6 amostras da marca D não apresentaram quantidade satisfatória de α -tocoferol. As marcas A e B apresentaram resultados insatisfatórios em 50% das amostras analisadas, e a marca C, em 10 das 15 amostras analisadas.

A vitamina K₃ foi detectada e quantificada em todas as amostras, e só não atingiu os valores recomendados em 3 das 31 amostras analisadas. Essas 3 amostras, pertencentes à marca D, apresentaram valores pouco abaixo do nível de suplementação recomendado por Rostagno *et al.* (2005).

Na **Figura 3** pode-se observar os resultados obtidos para cada vitamina, expressos em porcentagem.

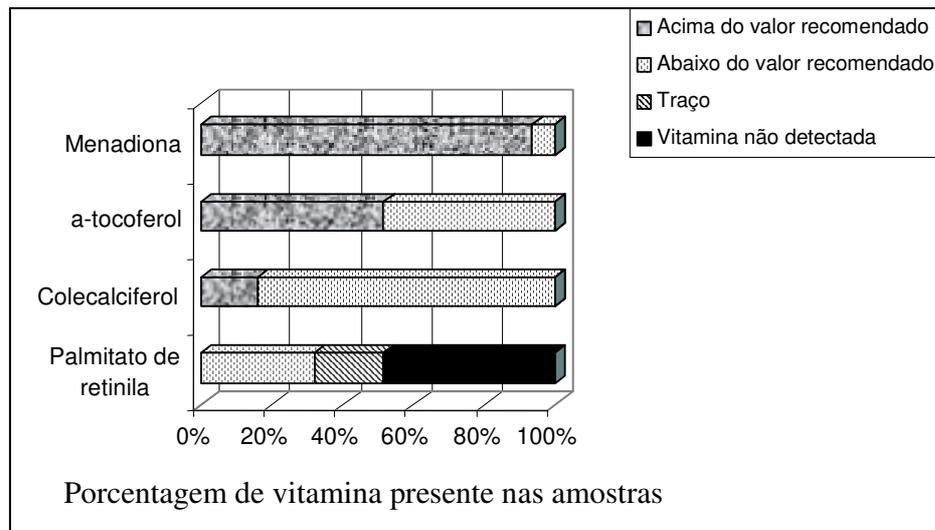


Figura 3 – Presença das vitaminas palmitato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol e menadiona nas amostras de rações estudadas.

As vitaminas *all-trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocoferol e filoquinona podem ocorrer naturalmente em alimentos, ou mesmo serem adicionadas nas rações, e foram observadas em diversas amostras (**Figura 4**).

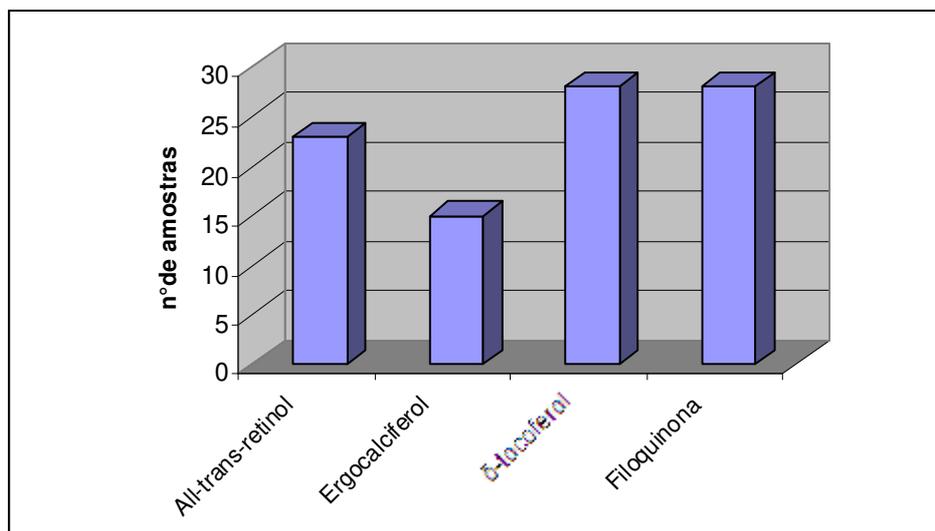


Figura 4 – Números de amostras em que foram detectadas as vitaminas *all-trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocoferol e filoquinona.

A ausência ou presença de um dos vitâmeros estudados em apenas um dos três lotes indica falha na padronização do lote, o que pode ter ocorrido pela troca de suplemento utilizado pelo fabricante, pela falta de homogeneização do lote, ou mesmo pela degradação das vitaminas em alguma etapa de fabricação ou armazenamento da ração. Pela grande variedade de vitaminas lipossolúveis que podem ser utilizadas como suplemento em rações, não se pode afirmar que alguma das amostras estudadas não está totalmente de acordo com os níveis recomendados, pois a mesma pode conter formas vitamínicas que não são quantificadas por este método.

CONCLUSÃO

Nenhuma das amostras alcançou os níveis recomendados pelas Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos, apenas com o uso das vitaminas lipossolúveis palmitato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol e menadiona. Para a certeza de que as amostras forneceriam quantidade suficiente de vitaminas lipossolúveis para as aves, seria necessário analisar todas as formas das vitaminas lipossolúveis.

O método utilizado neste trabalho mostrou-se de fácil aplicação para a determinação das vitaminas palmitato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol e menadiona, nas amostras de rações estudadas, podendo ser utilizado em estudos de nutrição animal ou de estabilidade dessas vitaminas em rações, e mesmo no controle de qualidade das rações em indústrias de produtos para a alimentação animal.

Mesmo não sendo alvo deste estudo, o método se mostrou eficiente para a detecção de algumas vitaminas naturalmente presentes nas rações (*all-trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocoferol e filoquinona), necessitando, porém, de melhores estudos sobre a extração dessas vitaminas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEW, B. P. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Animail Feed Science Technology*, v. 59, p. 103-114, 1996.
- COHEN, H.; LAPOINTE, M. Method for extraction and cleanup of animal feed for the determination of liposoluble vitamins D, A, and E by High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 26, p. 1210-1213, 1978.
- GOMIS, D. B.; FERNÁNDEZ, M. P.; GUTIÉRREZ ALVARES, M. A. D. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolm liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 891, p. 109-114, 2000.
- QIAN, H.; SHENG, M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D₂ in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 825, p. 127-133, 1998.
- REBEL, J. M. J.; VAN DAM, J. T. P.; ZEKARIAS, B.; BALK, F. R. M.; POST, J.; FLORES MIÑAMBRES, A.; TER HUURNE, A. A. H. M. Vitamin and trace mineral content in feed of breeders and their progeny: effects of growth, feed conversion and severity of malabsorption syndrome of broilers. *British Poultry Science*, v. 45, p. 201-209, 2004.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos – Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2 ed., 186 p., 2005.
- RUSHING, L. G.; COOPER, W. M.; THOMPSON Jr., H. C. Simultaneous analysis of vitamins A and E in rodent feed by High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p.296-299, 1991.
- TAVČAR-KALSHER, G.; VENĀUŠT, A. Stability of vitamins in premixes. *Animal Feed Science and Technology*, v. 132, p.148-154, 2007.

VILLAMIDE, M.J.; FRAGA, M.J. Composition of vitamin supplements in Spanish poultry diets. *British Poultry Science*, v. 40, p. 944-652, 1999.

CONCLUSÕES GERAIS

Houve uma grande variação dos níveis dos macronutrientes analisados, de acordo com fase de crescimento para a qual a ração era destinada, concordando com a literatura, que recomenda a adequação da ração à idade da ave.

Também foi possível observar que as marcas A, C e D apresentaram falhas na padronização da quantidade de nutrientes, o que pôde ser observado pelas diferenças nos resultados entre lotes.

Os resultados obtidos nas etapas de validação foram satisfatórios para a análise das vitaminas palmitato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol e menadiona, que apresentaram valores de repetibilidade inferiores a 14%.

Mesmo não sendo alvo deste estudo, o método mostrou-se eficiente também para a detecção de algumas vitaminas naturalmente presentes nas amostras analisadas (*all-trans*-retinol, ergocalciferol, δ -tocoferol e filoquinona), necessitando, porém, de melhores estudos de extração.

Nenhuma das amostras alcançou os níveis recomendados pelas Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos, apenas com o uso das vitaminas lipossolúveis palmitato de retinila, colecalciferol, α -tocoferol e menadiona.

O método cromatográfico utilizado neste trabalho mostrou-se de fácil aplicação para as amostras de rações estudadas, podendo ser utilizado em estudos de nutrição animal ou de estabilidade dessas vitaminas em rações, e mesmo no controle de qualidade das rações em indústrias de produtos para a alimentação animal.