UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

# PIGMENTANTES DE GEMA: NOVO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE COR E CARACTERIZAÇÃO DA PRODUTIVIDADE E SAÚDE DAS POEDEIRAS

Jussara de Souza Carneiro
Orientadora: Prof. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

GOIÂNIA
2013

sistema de bibliotecas ufg

UFG

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:** **[ ] Dissertação** **[ x ] Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Autor (a): | JUSSARA DE SOUZA CARNEIRO | | | | |
| E-mail: | jussaravet@gmail.com | | | | |
| Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [ x ]Sim [ ] Não | | | | | |
| Vínculo empregatício do autor | | Universidade Federal de Uberlandia (UFU) | | | |
| Agência de fomento: | | | | Sigla: | |
| País: | Brasil | UF: MG | | CNPJ: | |
| Título: | Pigmentantes de gema: novo método de avaliação de cor e caracterização da produtividade e saúde das poedeiras | | | | |
| | | | | | |
| Palavras-chave: | aditivos, carotenoides, corantes, gema, nutrição | | | | |
| Título em outra língua: | Yolk pigments: new method for evaluation of color and characteriztion of health and productivity of layers | | | | |
| | | | | | |
| Palavras-chave em outra língua: | additives, carotenoids, dyes, yolk, nutrition | | | | |
| | | | | | |
| Área de concentração: | Patologia, Clínica e Cirurgia Animal | | | | |
| Data defesa: | | 01/08/2013 | | | |
| Programa de Pós-Graduação: | | Ciência Animal | | | |
| Orientador (a): | Maria Clorinda Soares Fioravanti | | | | |
| E-mail: | clorinda@ufg.br | | | | |
| Co-orientadores | Elizabeth Gonzales e Marcos Barcellos Café | | | | |
| E-mail: | mcafe@ufg.br e elisa.gonzales@uol.com.br | | | | |

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concordo com a liberação total do documento [ x ] SIM [ ] NÃO[1]

JSCarneiro

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 31/10/2013

JUSSARA DE SOUZA CARNEIRO

# PIGMENTANTES DE GEMA: NOVO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE COR E CARACTERIZAÇÃO DA PRODUTIVIDADE E SAÚDE DAS POEDEIRAS

Tese apresentada para a obtenção do grau
de Doutora em Ciência Animal junto à
Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

**Área de Concentração:**
Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

**Orientadora:**
Prof[a]. Dr[a].Maria Clorinda Soares Fioravanti - UFG
**Comitê de Orientação:**
Prof[a]. Dr[a] Elisabeth Gonzales - UNESP/Botucatu
Prof. Dr. Marcos Barcellos Café - UFG

GOIÂNIA

2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**
**(GPT/BC/UFG)**

C289p

Carneiro, Jussara de Souza.
Pigmentantes de gemas: novo método de avaliação de cor e caracterização da produtividade e saúde das poedeiras [manuscrito] / Jussara de Souza Carneiro. - 2013.
104 f. : figs, tabs.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravante.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.
Bibliografia.
Inclui listas de figuras e tabelas.

1. Gema do ovo – Coloração – Galinhas. 2. Aditivos – Ração – Galinhas. 3. Pigmentantes – Saúde – Galinhas. Título.

CDU: 637.414

**JUSSARA DE SOUZA CARNEIRO**

Tese defendida e aprovada em **01/08/2013** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti
(ORIENTADOR (A))

Prof. Dr. Mauricio Cunha Escarpinati - UFU

Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro - IFTM

Profa. Dra. Nadja Susana Mogyca Leandro

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

Dedico este trabalho aos meus filhos
Carolina, Marcelo e Jair, ao meu namorado
Jacomini, aos meus amados cães, e a todos
àqueles que tiveram que suportar meu mau
humor durante todo o doutorado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus filhos que acreditaram que eu seria capaz, apesar de eu já ter passado muito da idade; ao José Octávio Jacomini, meu amor, que me ajudou com sua paciência e capacidade intelectual; aos meus cães que não saíram do meu lado durante as longas horas passadas ao computador.

Agradeço aos professores Maria Clorinda Soares Fioravanti, Marcos Barcelos Café e Elisabeth Gonzales que me orientaram com competência; ao professor Paulo Roberto Ribeiro, o mentor do projeto, ao professor Duvaldo Eurides, que me convenceu a fazer doutorado ao invés de aposentar, à professora Neusa Margarida Paulo que me emprestou o aparato de fotografia, ao professor Humberto Eustáquio Coelho que fez a leitura e as fotos das lâminas de histopatologia, ao professor José Henrique Stringhini que conseguiu as galinhas do experimento, ao Dr. Enio Avelar Naves do laboratório IPAC que me forneceu os frascos para a coleta do material destinado à histologia, ao professor Luiz Bispo da Silva que me auxiliou com o inglês e a configuração das tabelas figuras e gráficos, à professora Belchiolina Beatriz Fonseca por me socorrer com seu conhecimento de estatística, à Gabriela de Godoy Cravo Arduíno, que confeccionou belos slides para minha apresentação.

Agradeço aos amigos que me ajudaram com seus conhecimentos, que me levaram de carona para Goiânia, me hospedaram e não me deixaram desistir.

Agradeço especialmente ao doutorando Bruno Moreira dos Santos, que foi fundamental no trato diário das aves, na colheita de material e na análise dos ovos e desempenho das aves.

Agradeço também aos doutorandos Regis Kamimura, aos graduandos Thuanny Oliveira Navas; Rejane Mery do Amor Divino Castro; Hyara Paula Fleuri Xavier; Letícia Melo Oliveira, Helton Freires Oliveira, Camila Sousa, que me auxiliaram na colheita de material, análise laboratorial do sangue, confecção das lâminas e outras atividades do experimento.

Agradeço aos fabricantes do Farelo de Urucum® (Paschoini Agro Ltda) e Carophyl® (DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda) pela doação dos produtos.

Agradeço ao proprietário da Granja Bom Princípio Avicultura Ltda pela doação das galinhas poedeiras.

Agradeço ainda a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este sonho se realizasse.

“*Que o alimento seja seu remédio*
*e o remédio seu alimento*”

(Hipocrates há mais de dois mil anos)

# SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 1
1.1 Introdução..... 1
1.2 Justificativa..... 2
1.3 Objetivo..... 2
1.4 Revisão de literatura..... 2
1.4.1 Urucum..... 8
1.4.2 Cantaxantina..... 14
1.4.3 Perfil bioquímico..... 17
Referências..... 20
CAPITULO 2 - EFEITO DE PIGMENTANTES DIETÉTICOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO FÍGADO E RINS E ESTRESSE OXIDATIVO DOS ERITRÓCITOS DE POEDEIRAS COMERCIAIS..... 40
2.1 Introdução..... 41
2.2 Material e métodos..... 43
2.3 Resultados..... 49
2.4 Discussão..... 59
2.5 Conclusões..... 62
Referências..... 63
CAPITULO 3 - AVALIAÇÃO COMPUTACIONAL DA COR DA GEMA: UMA OPÇÃO AO MÉTODO TRADICIONAL..... 71
3.1 Introdução..... 72
3.2 Material e métodos..... 74
3.3 Resultados..... 79
3.4 Discussão..... 83
3.5 Conclusão..... 86
Referencias..... 86
CAPITULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 89

# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO 2


FIGURA 1 Concentração sanguínea de creatinina de poedeiras comerciais alimentadas com dietas à base de sorgo (controle), cantaxantina + apocaroteno (CAR+CAY) e farelo de urucum (URU). Os dados representam a média ± DP de 18 animais..... 53

FIGURA 2 Concentração sanguínea de ácido úrico de poedeiras comerciais alimentadas com dietas à base de sorgo (controle), cantaxantina + apocaroteno (CAR+CAY) e farelo de urucum (URU). Os dados representam a média ± DP de 18 animais..... 53

FIGURA 3 Concentração sanguínea de AST de poedeiras comerciais alimentadas com dietas à base de sorgo (controle), cantaxantina + apocaroteno (CAR+CAY) e farelo de urucum (URU). Os dados representam a média ± DP de 18 animais..... 54

FIGURA 4 Concentração sanguínea de GGT de poedeiras comerciais alimentadas com dietas à base de sorgo (controle), cantaxantina + apocaroteno (CAR+CAY) e farelo de urucum (URU). Os dados representam a média ± DP de 18 animais..... 54

FIGURA 5 Fotomicrografia de corte histológico de fígado de poedeiras vermelhas (a) hepatócitos normais (seta); (b) hepatócitos com degeneração gordurosa (seta). Coloração HE, aumento de 40 x..... 55

FIGURA 6 Fotomicrografia de corte histológico de rins das galinhas poedeiras: (a) glomérulo e túbulos normais (seta); (b) infiltrado inflamatório caracterizando pielite (setas); c infiltrado inflamatório no parênquima renal caracterizando nefrite (seta); (d) degeneração hidrópica de células tubulares (seta). Coloração HE e aumento de 40 x..... 57

FIGURA 7 Concentração sanguínea de malonaldeído (MDA) de poedeiras comerciais alimentadas com dietas à base de sorgo (controle), cantaxantina + caroteno (CAR+CAY) e farelo de urucum (URU). Os dados representam a média ± DP de 18 animais..... 58

**CAPÍTULO 3**

FIGURA 1 Avaliação tradicional da cor das gemas utilizando o leque colorimétrico ROCHE®..... 75

FIGURA 2 Aparato para fotografar as gemas dos ovos..... 75

FIGURA 3 Esquema indicando as etapas para a definição da cor da gema. A) Foto da gema. B) Região central da gema do ovo identificada automaticamente pelo software de processamento de imagens. C) Mapeamento da cor média do centro da gema para o sistema de cores Lab..... 76

FIGURA 4 A) Foto do leque colorimétrico obtida com a mesma câmera usada nas coletas das imagens das gemas. B) Seleção das partes do leque que foram passadas ao software para determinação da cor média de cada parte do leque. C) Distribuição das intensidades dos pixels de cada escore do leque colorimétrico no sistema de cores Lab (eixo horizontal – canal a; eixo vertical – canal b). É possível notar que cada escore está distribuído em uma região diferente dos eixos (a-b). D) Junção de todas as distribuições de escores após a convolução com uma máscara Gaussiana, formando um mapa de escores baseado nas coordenadas a e b..... 78

FIGURA 5 Fotografias digitais das gemas de acordo com os tratamentos: (a) controle, (b) ração com farelo de urucum e (c) ração com cantaxantina + apocaroteno..... 79

FIGURA 6 Canela e tecido adiposo das aves. A) Alimentadas com ração contendo pigmentante B) Alimentadas com ração sem pigmentante..... 80

FIGURA 7 Distribuição do escore de coloração (valor colorimétrico definido pelo leque Roche®) de acordo com a alimentação. Nos controles a barra do zero vai até 60. Histogramas obtidos a partir da classificação manual (a, b, c) e histogramas obtidos a partir da classificação automática (d, e, f)..... 81

FIGURA 8 Mapa de erro entre a classificação de cor da gema pelo método automático e manual. Em geral, a cor da gema dada utilizando o leque é maior do que a fornecida pelo computador. Esta divergência tende a diminuir nas gemas de coloração mais alaranjada..... 82

FIGURA 9 Distribuição espacial das cores das gemas no sistema de cores Lab. A) Disposição das gemas de acordo com a dieta utilizada na alimentação das aves. Na parte inferior se concentram as gemas esbranquiçadas, na parte superior esquerda as amarelas e na superior direita as alaranjadas. B) Gemas de ração controle. C) Gemas de ração com farelo de urucum. D) Gemas de ração com cantaxantina + apocaroteno..... 83

# LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 2

TABELA 1 Composição nutricional calculada das rações..... 45

TABELA 2 Valores médios, desvio padrão (desv pad) e coeficiente de variação (CV) dos índices de avaliação produtiva de poedeiras comerciais alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias..... 50

TABELA 3 Valores médios, desvio padrão (desv pad) e coeficiente de variação (CV) dos índices de qualidade física interna e externa de ovos de poedeiras comerciais alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias..... 51

TABELA 4 Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos, proteína total, albumina, globulina, relação albumina/globulina, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), ALP (fosfatase alcalina) e GGT (gama glutamiltransferase) de poedeiras comerciais alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias..... 52

TABELA 5 Número e porcentagem de poedeiras alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (basal/controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias, que apresentaram degeneração gordurosa do fígado..... 55

TABELA 6 Número e porcentagem de poedeiras alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (basal/controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias, que apresentaram nefrite..... 56

TABELA 7 Número e porcentagem de poedeiras alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (basal/controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias, que apresentaram pielite ou pielonefrite..... 56

TABELA 8 Número e porcentagem de poedeiras alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (basal/controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias, que apresentaram degeneração hidrópica renal..... 57

TABELA 9 Média e desvio padrão da dosagem de malonaldeido no sangue das aves aos 21 dias (Ciclo 1) e aos 63 dias (Ciclo 3) do início do experimento (TBARS), alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum) 58

**CAPÍTULO 3**

TABELA 1 Mediana dos escores para cor da gema avaliados pelo leque colorimétrico (método manual) e pelo computador (método automático)..... 79

## RESUMO

O milho vem sendo substituído por outros alimentos na alimentação de galinhas poedeiras. Contudo, como tais alimentos apresentam baixa capacidade de corar as gemas dos ovos, pigmentantes são comumente adicionados à ração dos animais. Carotenóides sintéticos como cantaxantina, bem como pigmentos naturais encontrados no farelo de urucum estão entre os mais utilizados. Contudo, sabe-se muito pouco sobre o impacto da utilização de tais pigmentantes na saúde das galinhas, além da determinação da dose ser baseada somente na coloração das gemas dos ovos. No presente estudo avaliou-se se os pigmentantes apresentam algum efeito sobre a saúde das galinhas, bem como testou-se um novo método computadorizado, simples, rápido e não subjetivo, para a avaliação da coloração das gemas. Assim, galinhas poedeiras vermelhas foram alimentadas com três diferentes rações a base de sorgo: sem pigmentante; com 3% de farelo de urucum ou com cantaxantina (8 ppm) + apocaroteno (25 ppm). Foram avaliados o desempenho das galinhas, a qualidade dos ovos, as funções renais e hepáticas, e o estresse oxidativo (inferido a partir dos níveis de malondealdeído de eritrócitos). Nenhum dos tratamentos alterou o desempenho das galinhas, a qualidade dos ovos e as funções hepáticas e renais. Contudo, todos os corantes aumentaram a coloração e o peso das gemas dos ovos. Por fim, os resultados sugerem claramente que a intensidade da coloração das gemas foi determinada com maior precisão pelo método computadorizado quando comparado ao ensaio colorimétrico tradicional.

**Palavras-chaves:** aditivos, carotenoides, corantes, gema, nutrição

## ABSTRACT

Aimed at feeding laying hen, corn has been substituted by other cheaper food. However, since these foods have little capacity to stain egg yolk, pigments are usually added to the animal's feed. Synthetic carotenoids, such as canthaxanthin, and the natural pigments present in bran annatto are among the most used food coloring. However, little is known about the impact of those pigments to the animal's health, and it is important to point out that the choice of the dye and its dose are based solely on the eggs color. In the present study we aimed at evaluating if the pigments have some beneficial or toxic effects on the laying hen health, and test a new simple, fast and non subjective computerized method to analyze the egg color. Thus, laying hens of the *ISA Brown* lineage were fed with three different sorghum meal: without dye; with bran annatto (3%); or with cathaxanthin (8 ppm) + apocaroten (25 ppm). Animal performance, eggs quality, the liver and kidney functions, as well as the oxidative stress inferred from the levels of malondialdehyde in red blood cells were determined. None of the treatments altered the laying hen performance, the liver and kidney integrity and functions, and the oxidative stress. However, all the dyes tested increased yolks egg weight and color. Finally, the results clearly suggest that yolks color intensity was more accurately determined by the computerized method when compared to the traditional colorimetric fan assay.


**Keywords:** additives, carotenoids, dye, yolk, nutrition

# CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

## 1.1 Introdução

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, a produção de ovos no Brasil em 2011 foi de 2,7 bilhões de dúzias (IBGE, 2009), porém o consumo anual por habitante ainda é insatisfatório. Entre os atributos sensoriais dos produtos de origem animal, a cor é relacionada como indicador de qualidade, exercendo papel importante na aceitação dos alimentos pelos consumidores (PEREIRA, 2001; TOCCHINI & MERCADANTE, 2001). A preferência dos consumidores por ovos com gema amarela, quase laranja (MANO, 2007), estimulou os produtores a usarem corantes (HARDER et al., 2007).

É definido como corante ou pigmentante os aditivos alimentares que conferem, intensificam ou restauram a cor de um alimento. Segundo (Instrução Normativa) IN 15 de 26 de maio de 2009 (BRASIL, 2009), que alterou a redação da IN 13 de 30 de novembro de 2004 (BRASIL, 2004), aditivo é definido no Artigo 2º como *"substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizado normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano"*.

Em virtude das exigências do mercado consumidor, várias experiências de adição de pigmentantes na alimentação de galinhas poedeiras são realizadas com a finalidade de obter ovos de coloração ideal (HARDER et al., 2007).

A maior parte das pesquisas com o uso de pigmentantes foi realizada com a adição dietética de produtos sintéticos. Entretanto, com a proibição do uso da maioria dos pigmentantes sintéticos, como os azoicos, nos principais países da Europa e da América do Norte (MAIA et al., 2005) a busca por corantes naturais aumentou.

## 1.2 Justificativa

Além da importância dos aspectos econômicos nos sistemas de produção, é crescente a preocupação da sociedade quanto ao meio ambiente, à qualidade de vida do ser humano e ao bem estar animal. Não há sustentabilidade se, ao final do processo, esses elementos não forem respeitados. Sendo assim, a busca pela utilização de produtos naturais é sempre bem vinda sob os olhares de vários segmentos da sociedade.

Esse estudo visa analisar os efeitos de dois pigmentantes, um sintético (mistura de cantaxantina + apocaroteno) e outro natural (farelo de urucum), sobre a saúde das aves e utilizar uma metodologia fácil de ser usada, capaz de avaliar, com precisão, a cor exata da gema. Esta metodologia se justifica porque a técnica de rotina hoje utilizada (leque colorimétrico) é subjetiva e limitada à percepção de cores do indivíduo que está fazendo a leitura.

## 1.3 Objetivo

Objetivou-se com este estudo verificar os efeitos de dois pigmentantes, um sintético (mistura de cantaxantina + apocaroteno) e outro natural (farelo de urucum), na função hepática e renal, no desempenho das aves, na qualidade física dos ovos e na concentração sanguínea de malonaldeído, além de comparar dois métodos de classificação da intensidade da cor da gema de ovos, um subjetivo (leque colorimétrico ROCHE®), dependente da acuidade do pesquisador e outro objetivo (computacional).

## 1.4 Revisão de literatura

A coloração da gema do ovo se deve à deposição de carotenóides xantofílicos que podem ser encontrados de forma natural em alimentos como milho, urucum, cenoura, entre outros, ou provir de substâncias sintéticas, como a cantaxantina. O grau de pigmentação obtido depende da concentração de

xantofila no alimento, da composição da ração e, ainda, das condições de saúde da ave (GARCIA et al., 2002).

Os carotenóides são classificados em carotenos e xantofilas. Os carotenos, formados exclusivamente por hidrocarbonos, são precursores de vitamina A. Já as xantofilas são substâncias derivadas dos carotenos e possuem átomos de oxigênio em suas moléculas. Somente os carotenóides que possuem grupos funcionais e oxigênio na molécula têm capacidade pigmentante (COELLO, 1993). Para que a cor amarela apareça são necessárias, no mínimo, sete duplas ligações conjugadas. À medida que o número de ligações aumenta mais avermelhado os carotenóides se tornam. Aqueles com menos de sete ligações são incolores (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).

A denominação carotenoide é derivada do nome científico da cenoura, *Daucus carote,* reconhecida por Wackenrod em 1831, como a primeira fonte de beta caroteno (GOODWIN, 1952). Os carotenóides mais encontrados nos vegetais utilizados como alimento são: luteína em espinafre, brócolis, ervilhas, couve de Bruxelas; α-caroteno em cenouras e abóboras; β-caroteno em frutas, cenoura, pimenta vermelha, laranja, batata, brócolis e vegetais verdes; β-criptoxantina em pimentões vermelhos maduros e mamões; licopeno em tomate e derivados e melancia; zeaxantina em gema de ovo e milho (FERNADES-GARCIA et al., 2011). Dos mais de 750 carotenóides conhecidos atualmente (BRITTON et al., 2004), apenas 50 são precursores de vitamina A. Destes, o β-caroteno é o mais abundante nos alimentos e o que apresenta maior capacidade de síntese da vitamina (AMBRÓSIO et al., 2006).

Devido à vasta distribuição, diversidade estrutural e inúmeras funções, como potencializadores da resposta imune e ação antioxidante, os carotenoides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentantes naturais (MELENDEZ-MARTINEZ et al., 2004; AMBROSIO et al., 2006). Esses compostos lipossolúveis são responsáveis pela foto-proteção de tecidos, vegetais e animais, expostos à luz, radiação e/ou ar atmosférico (MANACH et al., 2004). São também responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelha de muitos alimentos, tais como frutas e vegetais, de alguns peixes (salmão e truta), algas e crustáceos (MALDONADE et al., 2008).

A dieta a base de milho amarelo contribui para a produção de ovos com gema bem pigmentada (CHEEKE, 2004) devido à grande quantidade de xantofilas luteína e zeaxantina no milho (LEMOS et al., 2006). Entretanto, se os processos de colheita, moagem ou armazenamento desses grãos forem inadequados podem comprometer a qualidade e a quantidade desses pigmentos, prejudicando a absorção e deposição dos mesmos nos tecidos corporais, especialmente na gema do ovo (EL BOUSHY & RATERINK, 1992). Quando se utiliza alguma fonte alternativa ao milho como sorgo, milheto, quirera de arroz ou trigo, que são pobres em carotenóides xantofílicos e reduzem drasticamente a coloração da gema (CHEEKE, 2004; OLIVEIRA et al., 2007), existe a necessidade de adicionar algum pigmentante natural ou artificial na ração (ASSUENA et al., 2008; GARCIA et al., 2009).

Os carotenóides utilizados como aditivos na ração de poedeiras são classificados segundo GARCIA et al. (2002) em sintético amarelo e vermelho e natural amarelo-avermelhado e vermelho. O sintético amarelo é um produto metabólico, cuja forma comercial é o etil-ester-beta-apo-8-caroteno (apocaroteno). O sintético vermelho, a cantaxantina, embora exista na natureza, aquela utilizada na ração é sintetizada pela indústria, sendo por isto classificada como corante sintético. O natural amarelo-avermelhado, a capsantina, é obtida do pimentão e o vermelho, a bixina, é obtida do urucum. Segundo GALOBART et al. (2004), também são muito utilizados no Brasil a oleoresina de páprica (*Capsicum annum*) e o extrato de pétala de marigold (*Tagetes erecta*).

Existem três categorias de corantes permitidas para uso em alimentos segundo o artigo 10 do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965 (BRASIL, 2002): natural - pigmento inócuo, extraído de substância vegetal ou animal; caramelo - produto obtido a partir de açúcares pelo aquecimento à temperatura superior ao seu ponto de fusão e posterior tratamento indicado pela tecnologia; artificial - substância obtida por processo de síntese (com composição química definida).

Segundo VALDUGA et al. (2009), também na indústria de alimento as xantofilas são utilizadas para repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, para colorir alimentos incolores ou uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios e, recentemente, também os precursores de

vitamina A (carotenos) têm sido adicionados aos alimentos a fim de enriquecer o produto.

A maioria dos carotenóides utilizados pela indústria alimentícia é obtida por síntese química ou extração de plantas e algas (PONSANO et al., 2004), embora haja um crescente interesse nos carotenóides obtidos por processos biotecnológicos. Um exemplo é a síntese realizada por microorganismos como bactérias, fungos e leveduras (VALDUGA et al., 2009). Fontes marinhas pigmentantes também foram avaliadas, como no estudo de CARVALHO et al. (2006) que utilizaram óleo de salmão e de alga. A substituição dos sintéticos pelos naturais, nem sempre é fácil, pois a sua extração pode requerer tecnologias e metodologias complexas o que pode encarecer o produto (SCOTTER et al., 2011).

Os carotenóides se oxidam com facilidade devido às duplas ligações conjugadas existentes na molécula. Por isso, a sua conservação em situações adversas, como a presença de oxigênio, calor, metais, enzimas ou peróxidos, exige o acréscimo de substâncias que mantenham a estabilidade da coloração (DI MASCIO, 2001). Entre as substâncias estabilizadoras e potencializadora de pigmentação o selênio orgânico ou selenometionina é um dos mais utilizados (GONÇALVES et al., 2006). O ácido graxo ômega três é também um excelente estabilizador, embora ofereça proteção por um período curto, como demonstrado por BARBOSA et al. (2011a), ao observarem que a quantidade de carotenóides reduziu muito, tanto em ovos estocados sob refrigeração quanto estocados em temperatura ambiente.

A escolha do corante deve ser cuidadosa, pois a inclusão de qualquer aditivo na ração não deve alterar negativamente as características organolépticas dos ovos, como odor e sabor (CARVALHO et al., 2005). O sabor, mais que a cor, é importante na decisão do consumidor para a aquisição de um produto. Nesse sentido, é importante ressaltar que o ovo *in natura* tende a alterar suas características sensoriais de acordo com o tipo de ração ingerida (ORMENESE et al., 2004).

De acordo com HARDER et al. (2008), para o uso de corantes artificiais a legislação brasileira se apoia nas recomendações do Comitê FAO/OMS (*Food and Agriculture Organizacion/*Organizacão Mundial de Saúde) (JECFA, 2004).

Essa legislação proíbe o uso da maioria dos pigmentantes artificiais na dieta animal devido aos seus efeitos tóxicos sobre os produtos a serem consumidos pelo homem (CONSTANT et al., 2002; CARVALHO et al., 2009). A Portaria nº 02 DINAL/MS, de 28 de janeiro de 1987, excluiu da Tabela I do Decreto 55871/65, os corantes amarelo ácido ou amarelo sólido (13015), azul de indantreno ou azul de alizarina (69800), laranja GGN (15980), vermelho sólido E (16045), e escarlate GN (14815), para uso em alimentos.

A denominação “natural” não pode ser entendida como sinônimo de “saudável”. Da mesma forma que os corantes sintéticos, os naturais também precisam de especificações, como grau de pureza e quantidade máxima permitida, além de restrições no uso. Em determinadas condições os carotenóides naturais podem ser prejudiciais à saúde, como observado por BOWEN (2003) em um experimento onde foi utilizado beta caroteno para tentar reduzir a incidência de câncer de pulmão em fumantes. Ao contrário do que se esperava, o beta caroteno aumentou em 18% o desenvolvimento da neoplasia nos indivíduos tratados em relação aos não tratados.

Os carotenóides são, também, classificados como fitoquímicos, isto é, “compostos bioativos, não nutrientes, encontrados em frutas, vegetais, grãos e outras plantas comestíveis, ligados a uma redução no risco da maioria das doenças crônicas” (LIU, 2008). São também considerados nutracêuticos, ou seja, “alimentos ou parte de um alimento que proporcionam benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças” (HUNGENHOLTZ & SMID, 2002). A importância desses compostos no aumento da expectativa de vida deve ser ressaltada, uma vez que as doenças crônicas, como a hipertensão, a obesidade e o câncer, estão cada vez mais presentes, ocasionando uma preocupação dos órgãos públicos com a saúde e alimentação (MORAES & COLLA, 2006).

Além de serem eficientes corantes, os carotenóides ainda possuem ação antioxidante. Como a geração de radicais livres no organismo constitui uma ação fisiológica contínua, quando a produção supera a remoção, eles se acumulam causando o chamado “estresse oxidativo” que pode lesar as células se esse acúmulo for mantido no organismo por período prolongado. Eles podem induzir o desenvolvimento de várias doenças, como cardiopatias, catarata, artrite

reumatoide, Alzheimer, diabetes entre outras (SHAMI, 2004). Dependendo da intensidade e tempo de exposição sobre DNA, RNA e proteínas podem gerar também alergias, mutagênese e/ou carcinogênese (RAO & SHEN, 2002). Para se defender dos radicais livres, o organismo utiliza os antioxidantes endógenos como a enzima superóxido dismutase (SOD), ou os exógenos, como os carotenóides obtidos na alimentação (MACHADO et al., 2006; LIMA et al., 2012).

Antioxidantes são substâncias que quando presentes em baixa concentração, em relação ao substrato oxidável, retardam ou inibem a oxidação desse substrato (HALLIWEL, 1999). Nos carotenóides essa ação antioxidante se deve ao sistema de duplas ligações conjugadas e aos grupos funcionais presentes na molécula (RIOS et al., 2009), e pode ser feita por três mecanismos: transferência de elétrons, remoção de íons de hidrogênio ou adição de espécies radicalares (YOUNG & LOWE, 2001).

Na literatura existem vários experimentos comprovando a capacidade antioxidante dos carotenóides, como os de MICHAUD et al. (2000) que conseguiram reduzir em 32% o risco de câncer de pulmão em não fumantes e fumantes com o licopeno, que segundo RAO & SHEN (2002), parece ser um dos mais potentes antioxidantes na prevenção da carcinogênese e aterogênese. FONTANA et al. (2000) concluíram que a astaxantina é capaz de combater radicais livres, conferindo propriedades antioxidantes aos ovos postos por aves alimentadas com ração contendo esse carotenoide. SPADA et al. (2012), verificando a qualidade de ovos armazenados, por meio da preservação da viscosidade do albúmen, observaram que o albúmen dos ovos das galinhas que receberam ração com 1,5% ou 2% de urucum *in natura* tiveram a viscosidade preservada por mais tempo do que os provenientes de ovos de galinha que receberam ração sem o carotenóide.

Para avaliar o estado oxidativo de um sistema existem várias metodologias diretas e indiretas que detectam a concentração de radicais livres no sangue ou tecidos corporais. Segundo SHEU (2003), dentre elas destaca-se o “teste das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico” (TBARS), um método simples, rápido e eficiente e que pode ser aplicado na amostra, nos seus extratos ou nos seus destilados. O teste padrão, introduzido por KOHN & LIVERSEDGE (1944), consiste na medida de um cromógeno róseo, com absorção a 530-532

nm, formado pela reação de uma molécula de malonaldeido (MDA) com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido e em alta temperatura (YU et al., 1986; LIMA & ABDALLA, 2001; KOLAKOWSKA, 2003). O MDA, um produto minoritário da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, é um aldeído com três átomos de carbono (C3H4O2).

Por não apresentar especificidade o TBARS tem sido criticado, isto é, o MDA não é o único produto da oxidação dos lipídios que reage com o TBA. Quando a quantidade de MDA é baixa o teste pode ser superestimado, pois substâncias como aldeídos não provenientes de oxidação lipídica e açúcares (sacarose e glicose) podem reagir com o TBA. Da mesma forma quando o MDA se complexa com outras substâncias como proteínas e aminas deixando de reagir com o TBA, o teste pode ser subestimado. Porém apesar das críticas o teste continua sendo muito utilizado, na prática e experimentalmente, por ser simples e útil (FELLENBERG & SPEISKY, 2006).

A classificação da cor da gema é um dos parâmetros utilizados na avaliação da qualidade física do ovo. Essa classificação é feita dispondo a gema em um fundo preto ou branco e comparando a sua cor com as tonalidades de amarelo do leque colorimétrico Roche®, que vão do amarelo claro ao alaranjado. A tonalidade é expressa em uma escala graduada de 1 a 15 (LLOBET et al., 1989). É um método subjetivo, de baixo custo, rápido, simples e proporciona dados confiáveis para avaliação aproximada da cor. A exigência para cor da gema está entre o número 9 a 10 do leque, para ovos comuns. Já nas marcas de grandes redes de supermercados, do número 11 a 12 e, maior do que 12 para ovos de qualidade superior (MENDES, 2010). Para avaliação mais precisa da cor da gema, existem outros métodos colorimétricos que podem ser utilizados, porém requerem aparelhos específicos e são de alto custo (CARBÓ, 1987), como por exemplo, o colorímetro Minolta CR-200 b (BIBLE & SINGHA, 1997).

### 1.4.1 Urucum

O urucum é também chamado de achicote, bixa, urucu, urucu-ola-mata, urucuba, uru-uva e annatto (BARBOSA FILHO, 2006). O produto utilizado na indústria de alimento é um extrato avermelhado obtido do pericarpo da semente dos frutos do urucuzeiro, o qual pertence à família *Bixacea* e ao gênero

*Bixa.* Apesar de existir várias espécies, a mais frequente em nosso meio é a *Bixa orellana L.*, que recebeu este nome em homenagem a Francisco Orellana, o primeiro europeu a navegar o Amazonas (CÂNOVA, 2002; GIULIANO et al., 2003). É um arbusto nativo da floresta amazônica que pode alcançar de dois a dez metros de altura, com grandes folhas de cor verde-claro e flores rosadas (FRANCO et al., 2002). Os frutos, denominados cápsulas ou cachopas, são revestidos por espinhos maleáveis que, quando maduros, abrem-se revelando pequenas sementes (0,4 cm de diâmetro), de cor avermelhada, dispostas em série e revestidas por uma polpa vermelho alaranjada (JOLY, 2005). Um fruto bem desenvolvido fornece, em média, 40 a 60 sementes, mas excepcionalmente podem ser encontradas cápsulas com até 70 sementes. O urucuzeiro floresce, frutifica e matura praticamente durante o ano todo, mas os frutos só devem ser colhidos depois de maduros e secos para evitar o crescimento de microrganismos nas sementes úmidas (FRANCO et al., 2008).

A semente é tradicionalmente utilizada pelos índios brasileiros e peruanos como fonte de matéria prima para tinturas vermelhas (*uru-ku* em tupi significa vermelho) com os mais diversos fins; entre eles, protetor da pele contra o sol, picadas de insetos e cerimoniais de agradecimento aos deuses pelas colheitas, pesca e saúde do povo (GIULIANO et al., 2003). Dentre as fontes de corantes naturais, o urucum é o mais utilizado pela indústria nacional representando cerca de 90% dos pigmentantes naturais usados no Brasil e 70% no mundo (TOCCHINI & MERCADANTE, 2001), inclusive na pigmentação de gemas de ovos de galinhas poedeiras (OLIVEIRA, 2004).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de grãos de urucum. Segundo o IBGE (2009) das 17 mil toneladas/ano produzidas pela América Latina, 12 mil são originárias do Brasil. Dos grãos, 70% destinam-se ao processamento do colorau, 20% são utilizados na produção de corante e 10% são exportados (FRANCO et al., 2008).

De acordo com TOCCHINI & MERCADANTE (2001), a tintura de urucum em pó é conhecida como “colorau” ou “colorífico”, sendo muito usada na culinária para realçar a cor dos alimentos, embora exista uma grande variação nos teores de pigmento (154 a 354 mg/100 g de colorífico). Segundo a resolução CNNPA 12/78 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1978), o colorífico é definido

como “produto constituído pela mistura de fubá ou farinha de mandioca com urucum em pó ou extrato oleoso de urucum, adicionado ou não de sal e óleo comestíveis” (CARVALHO, 2010).

As sementes do urucum contêm lipídeos como ácido linoléico, linolênico e oleico, além de aminoácidos como aspartato, glutamato e leucina (RODRIGUES et al., 2007). A polpa que envolve as sementes é rica em carotenóides como beta caroteno, bixina e norbixina, sendo o mais importante a bixina ($C_{25}H_{30}O_4$), que corresponde a mais de 80% dos carotenóides presentes na polpa e representa, em média, 2,5% do peso das sementes desidratadas (OLIVEIRA, 2005a; SANTANA, et al., 2008; RODRIGUES-ÁVILA, et al., 2011). O segundo carotenóide em importância é a norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$) obtida pela saponificação da bixina. As duas podem existir na forma cis e trans (COSTA & CHAVES, 2005). O pigmento de cor laranja é constituído pela cis-bixina, insolúvel em óleo, mas durante a extração, o tratamento térmico a converte em trans-bixina de cor vermelha e solúvel em óleo (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004). É a presença do éster metílico que faz a bixina ser mais lipossolúvel, enquanto que a norbixina é mais hidrossolúvel pela presença do grupamento carboxila (LIMA et al., 2001). Devido a este fato RIOS & MERCADANTE (2004) citam que a concentração de bixina é maior nas soluções lipossolúveis de urucum, enquanto que a norbixina predomina nas soluções hidrossolúveis.

A polpa que envolve sementes do urucum pode ser processada por centrifugação em água ou em óleo de soja (PASCHOINE 2000; BRAZ et al., 2007). Os pigmentos podem ser extraídos por processos mecânicos, como atrito e raspagem das sementes, físico-químicos com solventes, ou com a utilização de enzimas (ALVES, 2001). Porém, a extração utilizando micro-ondas além de ser mais rápida é também a mais eficiente, pois proporciona o dobro do rendimento dos outros métodos (VASU et al., 2010).

Como a polpa que envolve a semente contém em torno de 6% de bixina, a extração industrial desse pigmentante gera, em média, 96% de resíduo que após passar por processo de secagem pode ser triturado e reaproveitado (DEMCZUK, 2012). Esse resíduo, transformado agora em “farelo de urucum” possui um alto teor de proteínas, fibra bruta, potássio, fósforo, magnésio, aminoácidos e níveis significantes de bixina (BRESSANI et al., 1983; DEMCZUK

et al., 2010) e pode ser usado como corante de carne e gema em ração de aves, suplemento alimentar em ração de suínos, além de servir também como adubo em plantações (UTIYAMA, 2001).

A bixina é indexada no *Colour Index*, um órgão internacional de nomenclatura de corantes, como CI nº75120, mas a denominação mais conhecida é da Comunidade Europeia, como ECC nº E160b (OLIVEIRA, 2005b).

Os carotenóides do urucum podem sofrer degradação quando expostos a luz ou a altas temperaturas (SATYANARAYANA et al., 2003). Diante deste fato é necessário observar as condições de processamento e armazenamento para que não interfiram na sua capacidade corante ou antioxidante.

A capacidade corante do urucum, tanto o farelo como o extrato oleoso, é comprovada em todos os experimentos realizados com galinhas e codornas (COSTA et al., 2005; BRAZ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; HARDER et al., 2008; CURVELO et al., 2009; GARCIA et al., 2009; SALDANHA et al., 2009; QUEIROZ et al., 2010). Um dos primeiros trabalhos foi realizado por CAMPOS et al. (1955) que substituíram 30% do milho por trigo e suplementaram a ração com 1% de farelo de urucum obtendo gemas com coloração semelhante àquelas da ração só com milho e quando a adição foi de 2% de urucum, a cor da gema ficou mais intensa, isto é, semelhante às gemas produzidas por galinha caipira. HARDER et al. (2007) usando 2,05% de farelo de urucum na ração obtiveram pigmentação excelente, mas por fatores econômicos, sugerem o uso de apenas 1,5%, já que esta porcentagem, também, produziu coloração adequada.

O urucum é um pigmentante extremamente seguro, com uma $DL_{50}$ (dose letal média) por via intraperitoneal, em ratos, de 700 mg/kg (CATÁLOGO RURAL, 2008). É também aparentemente seguro para os seres humanos, por isto desde 1970 a FAO/WHO permite a ingestão diária, temporária, de extrato de urucum na dose de 1,25 mg/kg de peso. O Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/WHO limitou a ingestão de extrato de urucum em 2,5 mg/kg de peso corpóreo/dia ou 0,065 mg/kg de peso corpóreo/dia de bixina ou norbixina (JECFA, 2002). Em 2006 a FAO reafirmou que o uso dos extratos de urucum é seguro nas concentrações determinadas (JOINT-FAO, 2006).

Por outro lado, as concentrações consideradas seguras para ingestão podem variar de acordo com certas circunstâncias, como demonstrado por OUYIANG et al. (2008), que ao associarem urucum ao íon cúprico (metal oxidante), observaram que os componentes do urucum desenvolveram efeito oxidativo sinérgico, o que poderia lesar o material genético das células. Da mesma forma, AUTTACHOAT et al. (2011) avaliando, em camundongos, a capacidade alergênica do urucum diluído em veículo oleoso, observaram discreto efeito positivo. Ao realizar o mesmo teste com extrato concentrado de bixina e de norbixina, verificaram que a bixina induziu sensibilização mesmo em baixa concentração (0,5%) e a norbixina, mesmo em alta concentração (10%), não provocou nenhuma reação. Essas observações são de extrema importância, pois embora no Brasil a portaria nº 1004 da ANVISA limita as concentrações máximas de urucum, como corante e conservante em carnes, muito abaixo daquelas utilizadas no teste alérgico, ela não estabelece distinção entre extrato de urucum ou carotenóide isolado (ANVISA, 1998).

Além da capacidade de corar, atribui-se às folhas, caule, raiz e sementes do urucum várias propriedades medicinais, como fonte de vitaminas, ação antitérmica, cicatrizante, diurética, antialérgica, antiinflamatória, antisséptica, antibacteriana e antioxidante (DUKE et al., 2003; SILVA, et al., 2008). Alguns trabalhos confirmam essas outras habilidades do urucum, COELHO et al. (2003) observaram que a tintura de urucum extraída de qualquer parte da planta inibiu o crescimento de 12 espécies de bactérias; FRANCO (2008) conseguiu reduzir a concentração sanguínea de colesterol, em até 94%, quando administrou 1 mL de bixina a 10% em coelhos com hiperlipidemia induzida; SILVA et al. (2010), avaliando a capacidade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos liofilizados de várias partes do urucuzeiro, observaram ação bacteriostática sobre cinco espécies bacterianas.

CHISTÉ et al. (2011) identificaram, nas sementes, compostos fenólicos como hipoaletina e derivados de ácido cafeico, que segundo KRINSKY (1994), eram importantes na redução do risco de doenças inflamatórias, degenerativas e cardiovasculares. A planta ainda possui vários compostos exóticos, como por exemplo, o geranilgeraniol, identificado por SILVA (2008), na parte externa da semente. Esse componente é um importante intermediário na biossíntese de

substâncias como a vitamina K, tocoferóis, tocotrienóis, diversos hormônios e carotenóides (SILVA et al., 2011).

Diversos estudos têm sido feitos com o intuito de observar o efeito antioxidante do urucum e da bixina. HAILA et al. (1996) verificaram que a bixina adicionada à triacilglicerídeos expostos à luz reduziu a formação de hidroperóxidos por oxidação. MARTINÉZ TOMÉ et al. (2001), comparando a capacidade antioxidante do urucum com butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e galato de propila (antioxidantes sintéticos), confirmaram a maior eficiência do produto natural. SILVA JUNIOR et al. (2005), estudando o efeito da norbixina na resposta ao dano do DNA induzido por radiação UV, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, em células de *Escherichia coli*, constataram que esse carotenoide aumentou a sobrevivência das células em pelo menos 10 vezes. ANTUNES et al. (2005) demonstraram que a bixina atuou como antioxidante interceptando os radicais livres gerados pelo dano cromossômico induzido por cisplatina. KIOKIAS & OREOPOULOU (2006) avaliaram a capacidade antioxidante do extrato de urucum, beta caroteno, luteína e licopeno quanto à formação de hidroperóxidos em uma emulsão aquosa e constataram que o urucum foi o mais eficiente de todos. CASTRO (2008) avaliou o efeito antioxidante do urucum durante o processamento térmico e armazenamento de hambúrgueres elaborados com peito de frango e observaram, que apesar do tratamento térmico ter reduzido a concentração de bixina, ela ainda assim foi capaz de minimizar a rancidez oxidativa durante os 120 dias de armazenamento a -18ºC. MERCADANTE et al. (2010) compararam o efeito antioxidante de produtos naturais (norbixina, beta caroteno, licopeno e zeaxantina) com o eritorbato de sódio (antioxidante sintético) em salsichas e verificaram que a norbixina e a zeaxantina foram as mais eficientes reduzindo, em torno de 20%, os níveis de MDA.

Importante enfatizar que o farelo de urucum pode ter concentrações diversas de bixina na dependência do cultivar, da área de cultivo, da estação do ano, das condições de armazenamento e da quantidade e método de extração do pigmentante (SANTANA et al., 2008).

### 1.4.2 Cantaxantina

Responsável pela coloração dos flamingos e de várias outras aves, e quimicamente descrita como β-β´-carotene-4,4'-dione, a cantaxantina é um ceto-carotenóide amplamente distribuído na natureza, de considerável interesse econômico, por causa de seu uso generalizado, tanto na indústria alimentícia como na indústria cosmética (GARCIA et al., 2002). É o corante sintético mais utilizado para intensificar a cor da gema de ovos de galinhas poedeiras e codornas (HANNIBAL et al., 2000). Foi aprovado pelo FDA, na concentração de 10%, para ser usado como corante artificial em alimentos (66 mg/kg) e produtos farmacêuticos (LOZANO-ALCÁZAR, 1995), sendo comercializada pela DSM como Carophyl red®.

Como qualquer carotenoide, a cantaxantina pode oxidar com facilidade em função da temperatura, luz e pH, por isso na sua produção são utilizados antioxidantes como o etoxiquim (MELENDEZ-MARTINEZ et al., 2004).

Em 1997 o Comitê de Alimentos da FAO/OMS estabeleceu que a ingestão diária aceitável deste pigmentante fosse de 0,03 mg/kg, já que a ingestão de altas doses por períodos prolongados pode causar depósitos de pequenos pontos amarelos, brilhantes, bilaterais e simétricos no olho, dando origem a uma retinopatia conhecida como "pó de ouro" (FRIEDMAN, 2005; SUJAK et al., 2005). No México, onde a cantaxantina costuma ser ingerida antes da exposição ao sol, para aumentar o bronzeado, foi descrito um caso de retinopatia por PRADO-SERRANO & GARCIA-CARMONA (2006). Devido a esta possível toxicidade ocular, a União Européia desde 01/12/2003, padronizou o uso deste corante em 25 mg/kg de ração para salmão e frango e 8 mg/kg de ração para galinhas poedeiras, na concentração de 10% (DIRECTIVA 2003/7/CE).

A capacidade corante da cantaxantina é comprovada em vários experimentos. Segundo GARCIA et al. (2002), ao ser usada por dois ciclos de 28 dias, em concentrações de zero a 60mg/g, mostrou ser um excelente corante para gemas. Com 60mg/g as gemas atingiram a cor de 14,3 do leque colorimétrico da Roche aos 5,43 dias do inicio da inclusão, sem alterar os parâmetros produtivos e de qualidade dos ovos. É importante informar que o padrão colorimétrico de classificação para gemas de ovos tipo caipira se encontra na faixa referencial de 8,5 a 9,0 pontos (SILVA et al., 2000). Segundo MOURA et al. (2009), a adição de

cantaxantina à 10%, associada ao apocaroteno à 10% e à selenometionina na ração de codornas japonesas, além de deixar a gema próxima do alaranjado, alterou o sabor do ovo, porém não a ponto de interferir na aceitação pelos degustadores. ROCHA (2011) observou que a adição de cantaxantina + apocaroteno à dieta de matrizes resultou em maior coloração das gemas quando comparadas àquelas provenientes de ovos obtidos de matrizes que não tiveram a mistura de pigmentantes adicionada à ração.

A associação de apocaroteno (pigmentante sintético amarelo) com cantaxantina tem como finalidade reduzir o tom avermelhado que esse pigmentante confere à gema (GARCIA et al. 2002), já que juntos deixam a gema amarelo-alaranjada. O apocaroteno é também conhecido como apo-éster, éster etílico do ácido beta-apo-8-carotenóico, ethyl-8'-apo-ß-caroten-8'-oate ou etil-ester-beta-8-apo-caroteno. É um carotenoide isolado de várias plantas como a alfafa, capim e legumes verdes, formado por cristais violeta-vermelho ou pó cristalino, sensíveis ao oxigênio e à luz e deve, portanto, ser mantido em um recipiente resistente à luz sob um gás inerte. O produto utilizado comercialmente é sintetizado no México e comercializado na concentração de 10% pela DSM como Carophyll yellow® (GARCIA et al., 2002). A dose diária máxima é de 5 mg/kg de peso corporal (JECFA 2002).

São atribuídas à cantaxantina potentes propriedades antioxidantes pela captura de radicais livres e preservação da vitamina E (VON SCHANT et al.,1999; BEARDSWORTH & HERNANDES, 2003). Por ser transferida de forma eficiente do saco vitelino ao embrião, poderia reduzir as reações oxidativas que ocorrem nos tecidos e embriões de frangos, principalmente nos períodos mais críticos, como eclosão e primeiros momentos de vida após a eclosão. Por isto a adição de cantaxantina à dieta materna seria interessante para garantir níveis adequados às poedeiras e aos ovos (SURAI et al., 2003).

Existem, na literatura, vários experimentos que avaliaram a capacidade antioxidante da cantaxantina, com resultados promissores. SOUZA et al. (2008) e SCHER et al. (2009) adicionaram 60mg/g de cantaxantina na dieta das matrizes e obtiveram redução no número de ovos inférteis e na mortalidade embrionária, além de melhora na taxa de eclosão sobre ovos totais e ovos férteis incubados. ROSA et al. (2010), usando a mesma concentração de cantaxantina (60 ppm) na

ração das matrizes, verificaram aumento de 1,08% na fertilidade, 3,0% na eclosão total e 2,4% na eclosão sobre ovos férteis quando comparado ao grupo de matrizes que não receberam o pigmentante na dieta. Esses autores ainda mediram a concentração de MDA em gemas de ovos incubados por quatro, oito e doze dias, e obtiveram os menores valores de MDA/mg de proteína, em aves que receberam ração com cantaxantina quando comparados às gemas de aves alimentadas com ração sem cantaxantina. ZHANG et al. (2011), ao adicionarem 60 ppm de cantaxantina na ração de matrizes, verificaram que houve aumento significativo na capacidade antioxidante total (TAC) e redução de MDA no sangue das matrizes, dos pintos e na gema dos ovos, aumento da SOD no sangue dos pintos, além de redução na mortalidade dos pintos associada à redução de MDA no soro sanguíneo deles. FERREIRA (2010) observou que galos *White Plymouth Rock* tiveram a sua capacidade reprodutiva aumentada quando alimentados com ração contendo 10% de cantaxantina. MAKKER et al. (2009) e BANSAL & BILASPURI (2010) sugeriram que a adição de antioxidantes dietéticos na ração reduz o estresse oxidativo dos espermatozoides. Segundo ROCHA (2011), o efeito benéfico sobre a fertilidade ocorre tanto no galo quanto na galinha, já que a adição de cantaxantina à dieta das matrizes aumentou a eclosão dos ovos férteis em 2,4% quando comparado com dieta sem o carotenoide.

Sua ação característica de pró-vitamina A parece não estar relacionada à sua capacidade antioxidante. De acordo com EUROPEAN COMISSION (2002), a cantaxantina absorvida no intestino delgado é transportada pelo sangue ao fígado, onde parte é transformada em substâncias precursoras de vitamina A, e o restante permanece íntegro sendo transportado pelas lipoproteínas aos depósitos alvos. Embora BEARDSWORTH & HENÁNDEZ (2003) tenham demonstrado que, nas aves, a cantaxantina pode ser transformada em vitamina A quando o nível desta última é limitado na dieta, SURAI et al. (2003) afirmaram que as dietas das aves são normalmente suplementadas com retinol sintético e portanto a contribuição dos carotenóides derivados do alimento para a formação de vitamina A é mínima. Ainda, ao avaliarem o efeito da cantaxantina sobre a concentração de vitamina A e E em ovos, embriões e pintos observaram que o corante não alterou as concentrações de vitamina A, mas aumentou as da vitamina E.

### 1.4.3 Perfil bioquímico sanguíneo

As provas laboratoriais do sangue podem ser ferramentas importantes no monitoramento da saúde, estado do sistema imune, diagnóstico de doenças e tratamento em aves, já que os sinais clínicos são inespecíficos nestas espécies (SCHIMIDT et al., 2007). A importância econômica das poedeiras e a necessidade da manutenção do seu bem estar torna necessário o conhecimento dos valores bioquímicos de referência para uma adequada avaliação do seu estado fisiológico (KRAL & SUCHY, 2000). Como o número de trabalhos sobre os valores bioquímicos de referência em aves é muito limitado, várias lacunas ainda permanecem, o que leva a pouca utilização de exames laboratoriais na medicina aviária. Também não existe padronização quanto à linhagem, atividade produtiva, região geográfica, entre outros fatores (BORSA et al., 2006).

Segundo BARBOSA et al. (2011b) existem grandes variações nos valores bioquímicos encontrados por diferentes pesquisadores no sangue das aves, podendo ser os fatores climáticos, tipo de alimentação, manejo, aparelhagem usada, reagentes comerciais e método de colheita das amostras os responsáveis por estas variações.

Os testes bioquímicos podem ser agrupados de acordo com o órgão que são capazes de avaliar, por exemplo provas de função renal e hepática (LUMEIJ, 2008). Adicionalmente a composição bioquímica do plasma sanguíneo reflete a situação metabólica dos tecidos animais, de forma a poder indicar lesões teciduais, transtornos no funcionamento dos órgãos, adaptação do animal diante de desafios nutricionais e fisiológicos e desequilíbrios metabólicos específicos ou e de origem nutricional (GONZÁLEZ & SCHEFFER 2003).

Muitas enzimas estão presentes no fígado. Aquelas que estão primariamente presentes e, em altas concentrações, são rotineiramente utilizadas como diagnóstico. Durante alterações na permeabilidade celular hepática e/ou necrose e colestase, certas enzimas hepáticas são liberadas no soro. Em geral, dois grupos de enzimas hepato-específicas são medidas no soro: aquelas que se elevam durante aumento da permeabilidade e/ou necrose e aquelas que se elevam durante processos obstrutivos ou defeitos de transporte (CORNELIUS, 1989).

Alterações na atividade enzimática são frequentemente detectadas antes da identificação da insuficiência hepática. As enzimas hepáticas podem ser divididas em duas categorias: enzimas de vazamento, liberadas devido alterações na permeabilidade da membrana dos hepatócitos (alanina aminotransferase [ALT], aspartato aminotransferase [AST]) e enzimas de indução que se apresentam elevadas em decorrência de colestase, drogas ou efeitos hormonais (fosfatase alcalina [ALP] e gama glutamiltransferase [GGT]) (DUNCAN & PRASSE, 2003).

Segundo BENEZ (2004) a ALT é encontrada em alta concentração no rim, coração, musculatura esquelética, fígado e pulmão de aves. Por este motivo não deve ser utilizada para diagnóstico de doenças hepáticas nesses animais (LUMEIJ, 2008).

Não existe consenso entre os autores no uso da atividade sérica da AST como avaliador da função hepática em aves. Segundo KANEKO et al. (2008), a AST é uma enzima amplamente distribuída nas aves, concentrado-se, principalmente, no coração, fígado, musculatura esquelética, rim e cérebro, podendo variar entre as espécies aviárias. Devido à influência muscular na sua concentração, não pode ser considerada uma enzima específica do fígado. Por outro lado, SCHIMIDT et al. (2007) afirmam que a enzima AST é considerada um marcador sensível de distúrbio hepatocelular em aves.

A ALP tem pequena atividade no fígado de galinhas, tanto que seu aumento sugere atividade osteoblástica ou alterações associadas ao osso (HARR, 2002).

A GGT, segundo GONZALES & SILVA (2006), é uma enzima mais específica do epitélio biliar das aves do que dos mamíferos e o aumento da sua atividade sérica indica colestase e desordens deste epitélio. De acordo com GONÇALVES et al. (2010) o incremento de ração no período pré-pico promove maior sobrecarga hepática das aves de postura, elevando os níveis séricos da GGT e AST.

A albumina é sintetizada nas células hepáticas e suas principais funções relacionam-se ao transporte de bilirrubina, magnésio e cálcio; além disso, interfere na manutenção da pressão oncótica do plasma e na estabilização dos sistemas coloidais. A hiperalbuminemia ocorre na desidratação e a

hipoalbuminemia tem como causas principais as deficiências alimentares, nefropatias, hepatopatias e infecções graves (KANEKO et al., 2008). As globulinas podem ser divididas em três categorias de acordo com a sua mobilidade eletroforética em globulinas alfa, beta e gama. Na rotina do laboratório, a concentração de globulinas totais é o resultado da subtração entre a quantidade de proteínas totais e albumina (DUNCAN & PRASSE, 2003).

Os principais fatores que afetam as concentrações das proteínas totais nas aves são a idade, sazonalidade, condições de manejo e doenças (LUMEIJ, 2008). Em poedeiras, os níveis de proteínas séricas totais e albumina, são maiores no pré-pico de produção do que durante o pico. Isto se deve provavelmente ao fato dessas aves utilizarem, em média, 12,5% de proteínas na formação do ovo (GONÇALVES, 2008).

Para o estudo da função renal é importante considerar as diferenças anatômicas e fisiológicas das aves, que ao contrário dos mamíferos, não possuem córtex, medula e pelve renais macroscopicamente distintos. O rim das aves é formado por dezenas a centenas de milhares de lóbulos microscópicos que constituem as unidades funcionais, compostas por córtex e cone medular (WIDEMAN, 1988).

O ácido úrico, principal produto catabólico de proteína, nitrogênio protéico e purina, é secretado em torno de 90% pelos túbulos proximais, em aves sadias segundo HARR (2002). Mas existe divergência nas taxas de ácido úrico nos trabalhos de diferentes autores e esta diferença, nas aves, pode estar associada à dieta, ao estado de hidratação e a espécie (KANEKO et al., 2008).

De acordo com KANEKO et al. (2008), a creatina é excretada pelos rins antes de ser convertida em creatinina. A creatinina, por isto, teria pouco valor diagnóstico nas aves, pois estaria em pequena concentração no soro (0,1 a 0,4 mg/dl). Por outro lado BARBOSA et al. (2011b) encontraram níveis de creatinina superiores (1,2 a 2,2 mg/dl) aos observados por KANEKO et al. (2008).

O colesterol é produzido em quase todas as células do corpo, principalmente nos hepatócitos, córtex da adrenal, ovários e epitélio intestinal. O fígado é o local primário de síntese na maioria dos animais (HENDRIX, 2002). Possui importante função metabólica por ser constituinte das membranas

celulares, além de ser precursor dos hormônios sintetizados em tecidos esteroidogênicos (BORGES et al., 2001).

**Referências**

1. AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição PUC,** Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

2. ANTUNES, L.; PASCOAL, L.; BIANCHI, L.; DIAS, F. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Uberaba, v. 585, n. 2, p. 113-119.2005.

3. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 - carne e produtos cárneos. Portaria no 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Referência bibliográfica de documentos eletrônicos. Disponível em http://www.anvisa.gov.br.

4. ASSUENA, V.; FILARDI, R. S.; JUNQUEIRA, O. M.; CASARTELLI, E. M.; LAURENTIZ, A. C.; DUARTE, K. F. Substituição do milho pelo sorgo em rações para poedeiras comerciais formuladas com diferentes critérios de atendimento das exigências em aminoácidos. **Ciência Animal Brasileira,** Goiania, v. 9, n. 1, p. 93-99, 2008.

5. AUTTACHOATA, W.; GERMOLECB, D. R.; SMITH, M. J.; WHITE JR, K. L.; GUOA, T. L. Contact sensitizing potential of annatto extract and its two primary color components, *cis*-bixin and norbixin, in female BALB/c mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 10, p. 2638-2644, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511003322.

6. BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, New York, v. 2011, p. 01-07, 2010.

7. BARBOSA FILHO, J. M. *Bixa orellana*: retrospectiva de usos populares, atividades biológicas, fitoquímica e emprego na fitocosmética, no continente americano. SIMPÓSIO BRASILEIRO DO URUCUM, 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2006, p. 1-14. Disponível em: http://ibflorestas.org.br/pdf/category/1-pdf.html?start=80&format=html&lang=en

8. BARBOSA, V. C.; GASPAR, A.; CALIXTO, L. F. L.; AGOSTINHO, T. S. P. Stability of the pigmentation of egg yolks enriched with omega-3 and carophyll stored at room temperature and under refrigeration**. Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 7, p. 1540-1544, 2011a.

9. BARBOSA, T. S.; MORI, C. K.; POLÔNIO, L. B.; PONSANO, E. H. G.; CIARLINI, P. C. Perfil bioquímico sérico de galinhas poedeiras na região de Araçatuba, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1583-1588, 2011b.

10. BEARDSWORTH, P. M.; HERNÁNDEZ, J. M. Canthaxanthin is more than a safe carotenoid. **World Poultry,** Surrey, v. 19, p. 14-15, 2003.

11. BENEZ, S. M. **Aves: criação, clínica, teoria, prática: silvestres, ornamentais, avinhados**. 4. ed. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 600 p.

12. BIBLE, B. B; SINGHA, S. Canopy position influences CIELab coordinates of peach color. **Hortscience**, Alexandria, v. 28, p. 992-993, 1997.

13. BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; CARVALHO, G. R.; ROCHA JÚNIOR, V. R. Concentração plasmática de colesterol total e lipoproteína de alta densidade em novilhas mestiças doadoras de embriões tratadas com

somatotropina bovina recombinante. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.5, p.605-610, 2001.

14. BORSA, A.; KOHAYAMA, A.; BORETTI, L. P.; SAITO, M. E.; KUIBIDA, K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industriais clinicamente saudáveis**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 675-677, 2006.

15. BOWEN, D. J.; THORNQUIST, M.; ANDERSON, K.; BARNETT, M; POWELL,C.; GARY GOODMAN, M.D.; OMENN, G. Stopping the active intervection: caret **Controlled Clinical Trials**, New York v. 24, n. 1, p. 39-50, 2003.

16. BRASIL. ANVISA. **Decreto no 55.871/65 de 26 de março de 1965**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br.2002.

17. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial da União,** Brasília, 24 jul. 1978.

18. BRASIL, 2004. Instrução Normativa 13 de 30 de novembro de 2004. Regulamenta o uso de aditivo para alimentação animal.

19. BRASIL, 2009. Instrução Normativa 15 de 26 de maio de 2009. Regulamenta o registro dos estabelecimentos e dos produtos destinados à alimentação animal e estabelece outras normas.

20. BRAZ, N. M.; FUENTES, M. F. F.; FREITAS, E. R.; SUCUPIRA, F. F.; MOREIRA, R. F.; LIMA, R. C. Semente residual do urucum na alimentação de poedeiras comerciais: desempenho e características dos ovos. **Acta Scientarium Animal Science**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 129-33, 2007.

21. BRESSANI, R.; PORTA-ESPAÑA DE BARNEÓN, F.; BRAHAM, J. E.; ELÍAS L. G.; GÓMEZ-BRENES, R. Chemical composition, amino acid content and

nutritive value of the protein of the annatto seed (*Bixa orellana*, L.). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, n. 33, p. 356-376, 1983.

22. BRITTON, G. S.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. P. **Carotenoids handbook.** Basel: Birkhauser Verlag, 2004. 660 p.

23. CARBÓ, C. B. **La gallina ponedora**. Madrid. Ediciones Mundi – Prensa, 1987. 519 p.

24. CAMPOS, J. Efeito do urucum na cor da gema de ovos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 9, p. 349-353; 1955.

25. CÂNOVA, R. Urucum. http://alemdojardim.terra.com.br/alem/mai. Acesso em 30 out. 2012.

26. CARVALHO, A. M.; JUNQUEIRA, A. M. R.; VIEIRA, J. V.; BOTELHO, R. Análise sensorial de genótipos de cenoura cultivados em sistema orgânico e convencional. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 805-809, 2005.

27. CARVALHO, P. R.; PITA, M. C. G.; PIBER-NETO, E.; MIRANDOLA, R. M. S.; MENDONÇA-JÚNIOR, C. X. Influência da adição de fontes marinhas de carotenóides à dieta de galinhas poedeiras na pigmentação da gema do ovo. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science,** São Paulo, v. 43, n. 5, p. 654-663, 2006.

28. CARVALHO, P. R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B; ORMENESE, R. C. S. C.; CARVALHO, P. R. N.; SIVA, M. G. Supplementation carotenoid compounds derived from seed integral ground annatto (*Bixa orellana* L.) in the feed laying hens to produce eggs special. **Pakistan Journal of Nutrition,** Faisalabad, v. 8, n. 12, p. 1906-1909, 2009.

29. CARVALHO, P. R. N Produção do colorífico. In: REUNIÃO NACIONAL DA CADEIA PRODUTIVA DO URUCUM, 2, 2010, Campinas, SP. **Palestras e**

**Resumos...** Campinas, SP: Instituto Agronômico e Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2010.

30. CASTRO, F. W. **Avaliação do efeito protetor do colorífico como antioxidante natural na oxidação lipídica em carne de frango**. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

31. CATÁLOGO RURAL 2008. In: http://www.agrov.com/vegetais/fru/urucum.htm. Acesso em: 25 nov. 2012.

32. CHEEKE, P. R. **Applied animal nutrition**. **Feeds and feeding**. 3. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2004. 624 p.

33. CHISTÉ, R. C.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Effect of solvent type on the extractability of bioactive compounds, antioxidant capacity and color properties of natural annatto extracts. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, n. 46, p. 1863-1870, 2011.

34. COELHO, A. M. S. P.; SILVA, G. A.; VIEIRA, O. M. C.; CHAVASCO, J. K. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n.1, p. 47-54, 2003.

35. COELLO, C. L. **Considerações sobre pigmentação de ovos e frangos**. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. 1993, Santos. **Anais...** Campinas: Facta, 1993. p. 95-110.

36. CONSTANT, P. B.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do Centro Pesquisa e Processamento de Alimentos,** Curitiba, v**.** 20, p. 203-220, 2002.

37. CORNELIUS, C.E. Liver function. In: KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals.** 4.ed. San Diego: Academic Press, 1989. Cap.14, p.364-97.

38. COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 149-152, 2005.

39. CURVELO, E. R.; GERALDO, A.; SILVA, L. M., SANTOS, T. A.; VIEIRA FILHO, J. A.; PINTO, E. R. A.; OLIVEIRA, M. L. R.; FERREIRA, C. B. Níveis de inclusão de extrato de urucum e açafrão em dietas para poedeiras semi pesadas e seus efeitos sobre o desempenho e coloração da gema dos ovos**.** In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFMG, 2, 2009, Bambuí. **Anais...** Campus Bambuí II: Jornada Científica, 2009. p. 22-24.

40. DEMCZUK JUNIOR, R. B.; NAKAMURA, A. M.; IZIDORO, D. R.; RIBANI, R. H. Utilização de 37 análises multivariada na caracterização de farelo de urucum. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2010, Curitiba, Paraná. **Anais...** Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia Curitiba, Paraná, 2010.

41. DEMCZUK JUNIOR, R. B. **Estabilidade e aplicação do corante de urucum no Estado do Paraná**. 2012. 134f. Tese (Doutorado em Nutrição) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

42. DI MASCIO, P. **Carotenóides e saúde: mecanismo de ação**. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS. 4, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas, 2001. P. 26 Disponível em: http://www.globorural.com.br/edic./180gr_responde1.htm.

43. DIRECTIVA 2003/7/CE DA COMMISSION of 24 January 2003 amending the conditions for authorisation of canthaxanthin in feedingstuffs in accordance with Council Directive 70/524/EEC (Official Journal of the European Communities en 25. 01. 2003).

44. DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J.; DUCELLIER, J.; DUKE, P. A. R. C. **Handbook of medicinal spices:** CRC Press: Boca Raton, 2003, 348 p.

45. DUNCAN, R. J., PRASSE, K. W. **Clinical pathology**. 4 ed. Athens: Iowa State Press, 2003. 450 p.

46. EL BOUSHY, A. R.; RATERINK, R. Egg yolk pigmentation**. World Review of Animal Production**, Roma, v. 27, p. 49-62, 1992.

47. EUROPEAN COMMISSION**.** Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the use of canthaxanthin in feedingstuffs for salmon and trout, laying hens, and other poultry, abril, 2002. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out81_en.pdf. Acesso em 25 nov. 2012.

48. FELLENBERG, M. A.; SPEISKY, H. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. **World´s Poultry Science Journal,** Ithaca, v. 62, p. 53-70, 2006.

49. FERNÁNDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; JARÉN-GALÁN, M.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; PERÉZ-GÁLVEZ, A.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, Sevilha, v. 46, p. 438-450, 2011.

50. FERREIRA, P. B. **Cantaxantina e 25-hidroxicolecalciferol e seus efeitos sobre os aspectos reprodutivos de galos**. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

51. FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F.; PASSOS, M. Carotenóides: cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento,** Brasília, v. 3, n. 1, p. 48-54, 2000.

52. FRANCO, C. F. O. **Corantes naturais de urucum (*Bixa orellana L.*) no tratamento da hiperlipidemia e câncer em animais**. 2008. 193 f. Tese (Pós Doutorado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

53. FRANCO, C. F. O.; SILVA, F. C. P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; FONTINELLI, I. S. C. In: Urucuzeiro - agronegócio de corantes naturais. João Pessoa: EMEPA, 2002. p. 79-97.

54. FRIEDMAN, N. J. **Review of ophthalmology**. Elsevier: Rio de Janeiro, 2005, 294 p.

55. GALOBART, J.; SALA, R.; RINCO, X.; MANZANILLA, E. G.; VIL, B.; GASA, J. Egg yolk color as affected by saponification of different natural pigmenting sources. **Journal Applied of Poultry Research**, Champaign, v. 13, n. 2, p. 328-334, 2004.

56. GARCIA E. A.; MENDES A. A.; PIZZOLANTE C. C.; GONÇALVES H. C.; OLIVEIRA R. P.; SILVA M. A. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Ciência Avícola,** Campinas, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2002.

57. GARCIA, E. A.; MOLINO, A. B.; BERTO, D. A.; PELÍCIA, K.; OSERA, R. H.; FAITARONE, A. B. G. Desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais alimentadas com semente de urucum (*Bixa orellana* L.) moída na dieta. **Veterinaria e Zootecnia**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 689-697, 2009.

58. GIULIANO, G.; CARLO, R.; ROSATI BRAMLEY, P. M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Tendencias em Biotecnologia**, Amsterdan, v. 21, n. 12, p. 513-516, 2003.

59. GONÇALVES, F. M.; RECH, J. L.; RUTZ, F. Influência da fonte de selênio na coloração da gema do ovo. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPel, 14., 2006, Pelotas. **Anais eletrônicos...** Pelotas: UFPel, 2006.

60. GONÇALVES, F. M.; RIBEIRO, E. M.; MONTAGNER, P.; LOPES, M. S.; ANCIUTI, M. A.; GENTILINI, F. P.; DEL PINO, F. A. B.; CORRÊA, M. N. Níveis séricos de enzimas hepáticas em poedeiras comerciais no pré-pico e pico de produção de ovos. **Acta Scientiae Veterinariae,** Porto Alegre, v. 38, n. 3, p. 311-314, 2010.

61. GONZÁLEZ, F. H. D., SCHEFFER, J. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 1, 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2003, p.73-89.

62. GONZÁLES F. H. D.; SILVA S. C. In: **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS Editora, 2006, 360 p.

63. GOODWIN, T. W. **The compative biochemistry of carotenoids**. London: Chapman and Hall, 1952. 356 p.

64. HAILA, K. M.; LIEVONEN, S. M.; HEINONEN, M. I. Effects of lutein, lycopene, annatto and γ-tocopherol on autoxidation of triglycerides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 6, p. 2096-2100, 1996.

65. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: Claredon Press, 1999, p. 285-293.

66. HANNIBAL, L.; LORQUIN, J.; D´ORTOLI, N. A.; GARCÍA, N.; CHAINTREUIL, C.; MASSON-BOIVIN, C.; DREYFUS, B.; GIRAUD, E. Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS 278. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 182; p. 3850-3853, 2000.

67. HARDER, M. N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Avaliação quantitativa por colorímetro digital da cor do ovo de galinhas poedeiras

alimentadas com urucum (*Bixa orellana*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias,** Lisboa, v. 102, p. 339-342 e 563-564, 2007.

68. HARDER, M. N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; SAVINO, V. J. M.; COELHO, A. A. D. Efeito de B*ixa orellana* na alteração de características de ovos de galinhas. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1232-1237, 2008.

69. HARR, K. E. Clinical chemistry of companion avian species: a review. **Veterinary Clinical Pathology,** Madison, v. 31, n. 3, p. 140-151, 2002.

70. HENDRIX, C. M. **Laboratory procedures for veterinary technicians**. 4.ed Philadelphia : Mosby, 2002, 559 p.

71. HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology,** London, v. 13, p. 497-507, 2002.

72. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e silvicultura**, v. 24, 2009. 45p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2009/>. Acesso em: ISSN: 0103-8435. Acesso em 02 nov. 2012.

73. JECFA. JOINT FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2004. Evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organization, Geneva, **WHO Technical Report Series**, n. 925. 83p.

74. JECFA, 2002. Prepared at the 28th (1984), published in FNP 31/1 (1984) and in FNP 52 (1992). Metals and arsenic specifications revised at the 59$^{th}$. A group ADI of 0-5 mg/kg bw expressed as the sum of the carotenoids: beta- carotene, beta-apo-8'-carotenal was established at the 18th JECFA (1974).

75. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Roma, 2006. ISSN 0512-3054. 104p.

76. JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 14. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 2005. 777 p.

77. KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestics animals.** 6. ed. New York: Academic Press, 2008. 896 p.

78. KIOKIAS, S.; OREOPOULOU, V. Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 7, p. 132-139, 2006.

79. KOLAKOWSKA, A. Lipid oxidation in food systems. In: SIKOSKI, Z.; KOLAKOWSKA, A. **Chemical and Functional Properties of Food Lipids**. Boca Raton: CRC Press. 2003, p. 133-166.

80. KOHN, H. I. Y LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, ergotamine, epinephrine, and menadiona. **Journal of Pharmacology**, Baltimore v. 82, p. 292-300, 1944.

81. KRÁL, I.; SUCHÝ, P. Haematological studies in adolescent breeding cocks. **Acta Veterinaria Brunensis,** Brno, v. 69, n. 3, p. 189-194, 2000.

82. KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenois. **Pure Applied Chemistry**, Glasgow, v. 66, p. 1003-1010, 1994.

83. LEMOS, P. M. M.; KUHNEN, S.; PIT, F.; DIAS, P. F.; OGLIARI, J. B.; MARASCHIN, M. Identificação e quantificação de carotenóides de sementes de variedades locais e crioulas de milho (*Zea mays*), desenvolvidas e cultivadas tradicionalmente por agricultores familiares de Anchieta. REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBPC, 2006.

84. LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliações em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

85. LIMA, J. P.; LOPES, C. O.; DIAS, N. A. A.; PEREIRA, M. C. A. Atividade e biodisponibilidade dos carotenóides no organismo (artigo de revisão). **Revista Ciências em Saúde,** Lavras v. 2, n.1, p. 65-73, 2012.

86. LIU J.; GOYER, L. A.; WAALKES, M. P. Toxic effects of metals**.** In: **Klassen C. D. Casarrett and Doull's toxicology: The Basic science of poisons**. United States: Mc Graw Hill, 2008, 1309 p.

87. LLOBET, J. A. C., PONTES, M. P., GONZALEZ, F. F. Factores que afectan a la calidad del huevo. In: **Producción de huevos**. Barcelona, Espanha: Tecnograf S.A., 1989. p. 255-274.

88. LOZANO-ALCÁZAR, J. Manifestaciones oftalmológicas de la terapéutica médica general. **Revista Mexicana de Oftalmologia,** Cidade do México, v. 69, n. 5, p. 171-174, 1995.

89. LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals.** 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. 932p.

90. MACHADO, F. M. V. F, CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; PIEDADE, S. M. S. Avaliação da disponibilidade de ferro em ovo, cenoura e couve e em suas misturas**. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 610-618, 2006.

91. MAIA, F. S.; LIMA-FILHO, D. O.; SAUER, L. Atributos indicadores de qualidade na carne de frango fresca. **Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 9, p. 53-56, 2005.

92. MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v. 107, n. 1, p. 145-150. 2008.

93. MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress e male infertility. **Indian Journal Medical Research**, Nova Delli, v. 129, p. 357-367, 2009.

94. MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The America Journal of Clinical Nutrition,** Bethesda, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

95. MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A. M.; RUGGIERE, S.; FREGA, N.; STRABBIOLI, R.; MURCIA, M. A. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, 2001.

96. MELENDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARI, I. M.; HEREDIA, F. J. Importância nutricional de pigmentos carotenóides. **Archives Latino-American of Nutricion,** São Paulo**,** v. 54, p. 149-55, 2004.

97. MENDES, F. R. **Qualidade física, química e microbiológica de ovos lavados armazenados sob duas temperaturas e experimentalmente contaminados com *Pseudomonas aeruginosa*.** 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

98. MERCADANTE, A. Z.; CAPITANI, C. D.; DECKER, E. A.; CASTRO, I. A. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, Barking, v. 84, p. 718-726. 2010.

99. MICHAUD, D. S.; FESKANICH, D.; RIMM, E. B.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C.; GIOVANNUCCI, E. Intake of specific carotenoides and risk

of lung cancer in 2 prospective US cohorts. **American Journal of Clinical Nutrition,** New York, v. 72, n. 4, p. 990-997, 2000.

100. MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

101. MOURA, A. M. A; FONSECA, J. B.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G; SANTOS, P. A.; SILVA, Q. J. Características sensoriais de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica* temminck e schlegel, 1849) suplementadas com pigmentantes sintéticos e selenometionina. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 33, n. 6, p.51-55, 2009.

102. OLIVEIRA, N. T. E. **Energia metabolizável de alimentos e qualidade de ovos e carne de codornas japonesas alimentadas com rações contendo colorífico do urucum e niacina suplementar**. 2004. 47 p. Tese (Doutorado em Produção Animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.

103. OLIVEIRA, V. P. l **Composição do urucum**. 2005a. Disponível em: http://www.globorural.com.br/edic./180gr responde1.htm.

104. OLIVEIRA, J. S. **Purificação de compostos de urucum por processo absortivo**. 2005b. 185f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

105. OLIVEIRA, N. T. E.; FONSECA, J. B.; SOARES, R. T. R. N.; FERREIRA, K. S.; THIÉBAUT, J. T. L**.** Pigmentação de gemas de ovos de codornas japonesas alimentadas com rações contendo colorífico. **Ciências. Agrotecnicas**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1525-1531, 2007.

106. ORMENESE, R. C. S. C.; MISUMI, L.; ZAMBRANO, F.; FARIA, E. V. Influência do uso de ovo líquido pasteurizado e ovo desidratado nas

características da massa alimentícia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 255-260, 2004.

107. OUYANG, D.; ZANG, R.; YI, L.; XI, Z. A synergistic effect of $Cu^{2+}$ and carotene on DNA damage. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 8, p. 2802-2807, 2008.

108. PASCHOINI, J. R. Nutricum: a proteína e o corante natural do urucum**.** **Paschoini Agro Ltda**, São Sebastião do Paraíso, 2000, 7p.

109. PEREIRA, A. V. Bixina como agente pigmentantes das gemas de ovos de poedeiras comerciais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/SBZ, 2001. P. 839-840.

110. PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA NETO, M.; LACAVA, P. M. *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for egg yolk pigmentation. **Journal Applied Poultry Research**, Stanford, v. 13, p. 421-425, 2004.

111. PRADO-SERRANO, A.; GARCÍA-CARMONA, K. P. Maculopatía por abuso en la ingesta de cantaxantina. **Revista Mexicana de Oftalmología**, Cidade do México, v. 80, n. 5, p. 279-281, 2006.

112. QUEIROZ, E. A.; AGOSTINHO, T. S. P.; CALIXTO, L. F. L. Níveis de farelo de urucum (*Bixa orellana l.*) na dieta e seus efeitos sobre o desempenho e a intensidade de pigmentação da gema de ovos de poedeiras comerciais**. Avisite,** Campinas, n. 24, p. 12-14, 2010.

113. RAO, A. V.; SHEN, H. Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 22, n. 10, p. 1125-1131, 2002.

114. RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2004. 196 p.

115. RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em “snacks” extrusados por CLAE. **Alimentos e Nutrição**, Marília, v.15, n. 3, p. 203-213, 2004.

116. ROCHA, J. S. R. Efeito da cantaxantina dietética para matrizes pesadas com idade avançada e do período de armazenamento dos ovos sobre a fertilidade, rendimento de incubação, nutrientes da gema e desenvolvimento embrionário. 2011. 80 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

117. RODRIGUES, S.M.; SOARES, V. L. F.; DE OLIVEIRA, T.M.; GESTEIRA, A.S.; OTONI, W. C.; COSTA, M. G. C. Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 37, n. 3, p. 220-224, 2007.

118. RODRÍGUEZ-ÁVILA, N. L.; NARVÁEZ-ZAPATA, J. A.; RAMÍREZ-BENÍTEZ, J. E.; AGUILAR-ESPINOSA, M. L.; RIVERA-MADRID, R. Identification and expression pattern of a new carotenoid cleavage dioxygenase gene member from *Bixa orellana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 15, p. 5385–5395, 2011.

119. ROSA, A. P.; SCHER, A.; DUARTE, V.; BOEMO, L.; VIEIRA, T. N. N.; FERREIRA JÚNIOR, J. A. G.; SORBARA, J. O. B. Suplementation of canthaxanthin to broiler breeders diet on broiler chick hatchery parameters and egg yolk TBARS. In: INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM, 2010, Atlanta. **Abstracts**… Atlanta: Georgia World Congress Center, 2010, p. 39.

120. SALDANHA, E. P. B. S.; LAGANÁ, C; TURCO, P. H. N.; GARCIA, E. A; KAKIMOTO, S. K. Tempo de pigmentação e despigmentação de ovos de galinhas

poedeiras alimentadas com pigmentantes naturais na dieta**.** In: CONGRESSO DE PRODUÇÃO, COMERCIALIZAÇÃO E CONSUMO DE OVOS, 7., 2009, São Pedro. **Anais...** São Pedro: SBZ. P.10-12.

121. SANTANA, K. C.; GUEDES, P. A.; REBOUÇAS, T. N. H.; SÃO JOSÉ, A. R.; LEMOS, O. L.; VILA, M. T. R; SOUZA, M. J. L. Teores de bixina em urucum (*Bixa orellana*) “Piave Vermelha”, em diferentes acondicionamentos e temperaturas. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 2, n. 1, p. 19-22, 2008.

122. SATYANARAYANA, A.; RAO, P. P. G.; RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 40, n. 2, p. 131-141, 2003.

123. SCHMIDT E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH R.; SANTIN E.; PAULILLO A. C. Patologia clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.

124. SCOTTER, M. J. Emerging and persistent issues with artificial food colors: natural color additive as alternatives to synthetic colors in food and drink. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, Viena, v. 3, p. 28-39, 2011.

125. SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição PUC**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 277-236, 2004.

126. SCHER, A.; ROSA, A. P.; SORBARA, J. O. B.; DUARTE, V.; BOEMO, L.; VIEIRA, T. N. N. Efeitos da adição de HyD e carophyll red à dieta de matrizes de corte sobre a incubação artificial. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Campinas: Facta, 2009. P. 36.

127. SHEU, J.; KU, H.; TSENG, W.; CHEN, M.; TSAI, L.; HUANG, Y. Determination of thiobarbituric acid addust of malondialdehyde using online

microdialysis coupled with high-performance liquid chromatography. **Analytical Sciences**, Tokio, v. 19, n. 4, p. 621-623, 2003.

128. SILVA JÚNIOR, A. C. T.; ASAD, L.; OLIVEIRA, E.; KOVARY, K.; ASAD. N; FELZENSZWALB, I. Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. **Genetics and Molecular Research,** Ribeirão Preto, v. 4, n. 1, p. 94-99, 2005.

129. SILVA, J. H. V. Efeito do extrato de urucum na pigmentação da gema de ovos. **Revista Brasileira de Zootecnia,** Viçosa, v. 29, p. 1435-1439, 2000.

130. SILVA, G. F.; GAMARRA, F. M. C.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F. A. Extraction of bixin from annatto seeds using supercritical carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 419-426, 2008.

131. SILVA, R. B.; ALMEIDA, C. R.; CHAVASCO, J. M.; CHAVASCO, J. K. Antimycobacterial activity evaluation and MIC determination of liophilizated hydroalcoholic extracts of *Bixa orellana* L., Bixaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 20, n. 2, p. 171-174, 2010.

132. SILVA, F. A. L.; SILVA, M. G.; FABRI, E. G.; CARVALHO, P. R. N. Avaliação dos teores de geranilgeraniol em diferentes acessos de urucum. Extração, separação e purificação de geranilgeraniol extraídos de sementes de urucum. In: CONGRESSO INTERISTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 45, 2011, Campinas. **Anais...** Campinas: CIIC, 2011.

133. SOUZA, R. A.; SOUZA, P. A.; SOUZA, R. C.; NEVES, A. C. R. S. Efeito da utilização de carophyll red nos índices reprodutivos de matrizes de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO 2008 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia Avícolas.** Campinas: FACTA, 2008. Supl.1. p. 32-32.

134. SPADA, F. P.; CANNIATTI BRAZACA, S. G.; COELHO, A. D.; SAVINO, V. J. M.; FRANÇA, L. C.; CORRER, E.; MARTINS, E.; FISCHER, F. S.; LEMES, D. E. A. Adição de carotenóides naturais e artificiais na alimentação de galinhas poedeiras: efeitos na qualidade de ovos frescos e armazenados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 346-353, 2012.

135. SUJAK, A.; GABRIELSKA, J.; MILANOWSKA, J.; MAZUREK ,P.; STRZABKA, K.; GRUSZECKI, W. I. Studies on canthaxanthin in lipid membranes. **Biochimica e Biophysica Acta,** São Paulo, v. 1712, n. 1, p. 17-28, 2005.

136. SURAI, A. P.; SURAI, P. F.; STEINBERG, W.; WAKEMAN, W. G.; SPEAKE, B. K.; SPARKS, N. H. C. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. **British Poultry Science**, Londres, v. 44, p. 612-619, 2003.

137. TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação por CLAE de bixina e norbixina em colorífico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, p. 310-313, 2001.

138. UTIYAMA, C. E. **Utilização do resíduo de sementes processadas de urucum (*Bixa orellana* L.) na alimentação de suínos em crescimento**. 2001. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

139. VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M.; FURIGO-JUNIOR, A. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova,** São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

140. VASU, S.; PALANIYAPPAN, V.; BADAMI, S. Microwave facilitated extraction of bixin from *Bixa orellana* and it's in-vitro antioxidant activity. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 24, n. 16, p. 1560-1567, 2010.

141. VON SCHANTZ, T., BENSCH S., GRAHN M., HASSELQUIST D., WITTZELL H. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 266, n. 1414, p. 1-12. 1999.

142. WIDEMAN, R. F. Avian kidney anatomy and physiology. **Critical Review Poultry Biology**, v. 1, p.133-176, 1988.

143. YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 385, n. 1, p. 20-27, 2001.

144. YU, L. W.; LATRIANO, L.; DUNCAN, S.; HARTWICK, R.; WITY, G. High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans-trans-muconaldehyde. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 156, p. 326-333, 1986.

145. ZHANG, W.; ZHANG, K. Y.; DING, X. M.; BAI, S. P.; HERNANDEZ, J. M.; YAO, B; ZHU, Q. Influence of canthaxanthin on broiler breeder reproduction, chick quality, and performance. **Poultry Science,** Champaign, v. 90, n. 7, p. 1516-1522, 2011.

# CAPÍTULO 2 – EFEITO DE PIGMENTANTES DIETÉTICOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO FÍGADO E RINS E ESTRESSE OXIDATIVO DOS ERITRÓCITOS DE POEDEIRAS COMERCIAIS


## Resumo

Os radicais livres precisam ser neutralizados por sistemas antioxidantes endógenos para evitar danos celulares. Assim, como alguns carotenoides usados como pigmentantes em rações são potentes antioxidantes, avaliou-se no presente estudo os efeitos tóxicos do farelo de urucum e da mistura cataxantina + apocaroteno sobre o fígado e rins de galinhas poedeiras, bem como a capacidade antioxidante de tais pigmentantes. Para tanto, os animais foram alimentados com três diferentes tipos de ração a base de sorgo: sem pigmentante; com farelo de urucum; ou com cataxantina (8 ppm) + apocaroteno (25 ppm). Posteriormente, determinou-se o desempenho produtivo das galinhas, a qualidade dos ovos, as alterações bioquímicas e histopatológicas dos rins e fígado, bem como os níveis de radicais livres em eritrócitos. Nenhum dos tratamentos alterou o desempenho produtivo das galinhas, a integridade ou funcionalidade hepática e renal, tão pouco o estresse oxidativo (inferido a partir dos níveis de malondealdeído de eritócitos). Contudo, todos os corantes testados produziram coloração e aumentaram o peso das gemas. Assim, os aditivos alimentares estudados no presente trabalho melhoraram a qualidade dos ovos, sem induzir danos hepáticos ou renais e sem alterar a ação dos radicais livres nos eritrócitos das galinhas poedeiras.


**Palavras-chaves:** carotenoides, injúria tecidual malondealdeído, qualidade dos ovos


## Abstract

Free radicals need to be neutralized by the endogenous antioxidant system to avoid cellular damage, and some carotenoids used as meal dying are potent antioxidants. Therefore, in the present study the antioxidant capability, as well as the toxic effects of the bran annatto and canthaxanthin+apocaroten to the liver and kidney of laying hen, were analyzed. Animals were fed with three different

sorghum meal: without dye; with bran annatto (3%); or with cathaxanthin (8 ppm) + apocaroten (25 ppm). Animal performance, eggs quality, biochemical and histopathological analysis, as well as the red blood cells free radicals levels were determined. None of the treatments altered the laying hen performance, the liver and kidney integrity and functions, and the oxidative stress (inferred from the red blood cells malondialdehyde levels). However, all the dyes tested increased yolks egg weight and color. Thus, the addictives tested in the present study improve the egg quality but they neither induce tissue injury nor alter the actions of free radicals on the blood of laying hen.

**Keywords:** carotenoids, egg quality, malonaldehyde, tissue injury

## 2.1 Introdução

O acúmulo de radicais livres no organismo causa estresse oxidativo que pode lesar as células, predispondo o desenvolvimento de várias doenças, como cardiopatias, Alzheimer, diabetes entre outras (SHAMI, 2004). Dependendo da intensidade e tempo de exposição, os radicais livres agindo sobre DNA, RNA e proteínas podem gerar mutagênese e/ou carcinogênese (RAO & SHEN, 2002). Para neutralizar esses radicais, o organismo utiliza antioxidantes endógenos, como a enzima superóxido dismutase (SOD) ou exógenos, como a vitamina E (MACHADO et al., 2006; LIMA et al., 2012).

Segundo GASTELL & ALEJO (2000), para quantificar o dano oxidativo causado pelos radicais livres pode ser utilizado o teste de “determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico” (TBARS). É um método simples e eficiente, que consiste na reação do malonaldeído (MDA) com o ácido tio-barbitúrico (TBA) produzindo um complexo de cor rosa, com absorção a 530-532 nm (KOLAKOWSKA, 2003; SHEU, 2003).

Avaliando a capacidade antioxidante dos carotenoides, SURAI et al. (2003) observaram que praticamente todos os carotenoides possuem ação antioxidante em maior ou menor grau. Essa característica se deve ao sistema de duplas ligações conjugadas e grupos funcionais presentes na molécula (RIOS et al., 2009). A cantaxantina, um poderoso antioxidante, é o carotenoide sintético mais utilizado para intensificar a cor da gema de ovos de galinhas poedeiras e

codornas (HANNIBAL et al., 2000). A União Europeia, desde 01/12/2003, padronizou o uso desse corante em 25 mg/kg de ração para salmão e frango e 8 mg/kg de ração para galinhas poedeiras (DIRECTIVA 2003/7/CE). É aprovado também pelo FDA para ser usado como corante artificial em alimentos e produtos farmacêuticos (LOZANO-ALCÁZAR, 1995).

A capacidade antioxidante do urucum já é conhecida há muito tempo (HAILA et al., 1996; GARCIA et al., 2012). O urucum, corante extraído da semente do urucuzeiro é um carotenoide natural utilizado há anos pelos índios brasileiros e peruanos como fonte de matéria prima para tinturas vermelhas (GIULIANO et al., 2003). A polpa que envolve as sementes é rica em carotenoides, sendo o mais importante a bixina ($C_{25}H_{30}O_4$), que corresponde a mais de 80% dos carotenoides presentes. É seguida pela norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$), obtida pela saponificação da bixina (OLIVEIRA, 2005; SANTANA et al., 2008; RODRIGUES-ÁVILA et al., 2011). O urucum pode ser ingerido, na forma de extrato, na concentração máxima de 2,5 mg/kg de peso corpóreo/dia, e a bixina ou norbixina, isoladas não devem ultrapassar 0,065 mg/kg de peso corpóreo/dia (JOINT-FAO, 2006).

Nas aves, as provas laboratoriais do sangue, como o perfil bioquímico, podem ser ferramentas importantes no monitoramento da saúde, do sistema imune, no diagnóstico de doenças e tratamento, já que os sinais clínicos nessas espécies são inespecíficos (SCHIMIDT et al., 2007).

Dentre os parâmetros bioquímicos, o ácido úrico e a creatinina são os mais indicados para avaliar a função renal, em galinhas poedeiras (HARR, 2002) (BARBOSA et al., 2011) e dentre as enzimas, as que melhor refletem a integridade morfofuncional do fígado, são a AST, considerada um marcador sensível de distúrbio hepatocelular embora, em função da influência muscular na sua atividade, ela não possa ser utilizada como ferramenta isolada na avaliação hepática (SCHIMIDT et al., 2007) e a GGT, por ser específica do epitélio biliar, cujo aumento da atividade sérica indica colestase e desordens desse epitélio (GOZALES & SILVA, 2006).

Com esse estudo objetivou-se avaliar a influência de 3% do farelo de urucum e da associação de carotenóides sintéticos (8mg/g de cantaxantina + 25 mg/g de apocaroteno) nos padrões bioquímicos sanguíneos, na estrutura celular

do fígado e rins, no estresse oxidativo dos eritrócitos, na produtividade das aves, na qualidade física do ovo, inclusive na cor da gema, de ovos produzidos por poedeiras vermelhas.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Local e período de realização

O estudo foi desenvolvido na Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus de Goiânia, e as atividades experimentais executadas no período de 10/02/2012 a 18/12/2012. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG, sob o Protocolo n. 015/12.

### 2.2.2 Fase pré-experimental

Foram utilizadas 108 aves de postura, da linhagem IsaBrown, devidamente debicadas e vacinadas, doadas pela Granja Bom Princípio Avicultura Ltda.

As aves chegaram ao aviário com 17 semanas de idade, sendo mantidas em galpões de produção para poedeiras e alojadas em gaiolas individuais de arame galvanizado, recebendo água e ração comercial a base de milho até completarem 22 semanas de idade.

O fornecimento das rações experimentais teve início no período de adaptação, isto é, duas semanas antes da instalação do experimento. Portanto, o experimento propriamente dito foi iniciado quando as aves tinham 24 semanas de idade.

### 2.2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo três tratamentos, com seis repetições, sendo que cada unidade experimental foi representada por seis aves homogeneizadas pelo peso. Os grupos experimentais ficaram assim constituídos:

Grupo 1: aves alimentadas com ração à base de sorgo (ração basal);

Grupo 2: aves alimentadas com ração basal contendo 8mg/g de cantaxantina (Carophyll red 10%®. DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda. São Paulo, SP. Brasil) + 25mg/g de apocaroteno (Carophyl yellow 10%®. DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda. São Paulo, SP. Brasil).

Grupo 3: aves alimentadas com ração basal com adição de 3% de farelo de urucum (Nutricum®. Paschoini Agro Ltda. São Sebastião do Paraíso, MG. Brasil).

O farelo de urucum utilizado foi obtido de sementes submetidas à extração de bixina em água e posteriormente desidratado e triturado, sem adição de outro ingrediente ou grão. O produto tem como garantia no mínimo 12% de proteína bruta e no máximo 13% de fibra bruta. Não foi informada a quantidade de bixina contida no farelo, mas o fabricante recomenda 3% do farelo na ração de poedeira para a obtenção de uma coloração de gema aceitável no mercado brasileiro. Estima-se que o uso de 3% desse farelo forneça 0,18% de bixina (mg/g).

O experimento foi conduzido durante três períodos de três semanas cada (três ciclos), totalizando 63 dias. O primeiro ciclo ocorreu entre a 24ª e 27ª semana de idade das aves, o segundo entre a 27ª e 30ª semanas e o terceiro entre a 30ª e 33ª semanas. Ao final de cada ciclo (27ª, 30ª e 33ª semanas de idade das aves) uma ave por repetição foi submetida à eutanásia.

### 2.2.4 Alimentação e manejo dos animais no período experimental

As aves foram alimentadas duas vezes ao dia e receberam água à vontade. As rações eram iso-energéticas e iso-protéicas e foram formuladas para atender as exigências nutricionais de poedeiras vermelhas em produção segundo ROSTAGNO et al. (2011).

A composição nutricional das três rações experimentais está descrita na Tabela 1.

### 2.2.5 Colheita das amostras

Os ovos foram recolhidos diariamente, contados e pesados. Aqueles produzidos nos três últimos dias de cada ciclo foram avaliados externa e internamente, no mesmo dia em que foram colhidos.

No último dia de cada ciclo foi colhido sangue de uma ave por repetição, por meio de venopunção cardíaca, em tubos à vácuo com e sem anticoagulante, sem jejum prévio. Imediatamente após a colheita as aves sofreram eutanásia por deslocamento cervical. Em seguida, foram colhidos fragmentos do fígado (um de cada lobo hepático) e rins (um de cada rim) e fixados em solução de formaldeído a 10%.

TABELA 1 – Composição nutricional calculada das rações

| Ingrediente | Rações experimentais | | |
|---|---|---|---|
| | Basal | Urucum[1] | Carotenóides sintéticos[2 e 3] |
| Sorgo baixo tanino | 56,412 | 53,170 | 56,379 |
| Soja farelo 45% | 26,768 | 26,539 | 26,768 |
| Calcário | 10,350 | 10,350 | 10,350 |
| Óleo de soja | 3,810 | 4,280 | 3,810 |
| Farelo de urucum[1] | 0,000 | 3,000 | 0,000 |
| Fosfato bicálcico | 1,108 | 1,109 | 1,108 |
| Sal comum | 0,555 | 0,523 | 0,555 |
| Premix-APP | 0,500 | 0,500 | 0,500 |
| DL-metionina | 0,327 | 0,339 | 0,327 |
| L-treonina | 0,090 | 0,100 | 0,090 |
| L-lisina | 0,080 | 0,090 | 0,080 |
| Cantaxantina 10%*[2] | 0,000 | 0,000 | 0,008 |
| Apocaroteno 10%[3] | 0,000 | 0,000 | 0,025 |
| Total | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| | Composição calculada | | |
| EM (kcal/kg) | 2800 | 2800 | 2800 |
| Proteína bruta (%) | 17,500 | 17,500 | 17,500 |
| Metionina+cisteína dig.(%) | 0,770 | 0,770 | 0,770 |
| Metionina dig.(%) | 0,541 | 0,546 | 0,541 |
| Lisina dig.(%) | 0,846 | 0,846 | 0,846 |
| Cálcio (%) | 4,330 | 4,33 | 4,330 |
| Fósforo disponível (%) | 0,309 | 0,309 | 0,309 |
| Sódio (%) | 0,237 | 0,237 | 0,237 |
| Cantaxantina (mg/g) | 0,000 | 0,000 | 8,0 |
| Apocaroteno (mg/g) | 0,000 | 0,000 | 25,0 |

[1] Nutricum® . Paschoini Agro Ltda. São Sebastião do Paraíso, MG. Brasil.
[2] Carophyll red 10%®. DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda. São Paulo, SP. Brasil.
[3] Carophyl yellow 10%®. DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda. São Paulo, SP. Brasil.

2.2.6 Avaliação produtiva e determinação da qualidade dos ovos

O desempenho das aves foi avaliado diariamente por meio do consumo de ração, produção de ovos, pesagem dos ovos, produção de massa de ovos e conversão alimentar (kg/kg e kg/dz).

O consumo de ração, avaliado ao término de cada período de 21 dias, foi determinado por diferença entre o peso da ração fornecida e o peso da sobra de ração no comedouro e recipientes em g/ave/dia.

Os ovos foram colhidos diariamente no período da manhã, sendo a produção de ovos calculada por número de ovos/ave/dia.

Todos os ovos íntegros colhidos nos três últimos dias de cada um dos três períodos de 21 dias foram pesados, em balança de precisão de 0,1g, para cálculo do peso médio, em gramas. A média do peso foi obtida pela divisão do peso total dos ovos pelo número de ovos colhidos, por unidade experimental.

A massa de ovo, expressa em gramas de ovos por ave por dia (g/ave/dia), foi obtida multiplicando o peso médio dos ovos no período pelo número total de ovos produzidos no respectivo período, dividido pelo número total de aves dos dias relativos a esse período.

A conversão alimentar foi medida em quilogramas de ração consumida por dúzia de ovos produzidos (kg/dz) e em quilogramas de ração consumida por quilogramas de ovos produzidos (kg/kg).

Para definir a qualidade física dos ovos foram analisadas as características internas: diâmetro do albúmen e da gema, altura do albúmen e da gema, coloração e peso da gema, peso da casca e índice de gema e albúmen. O peso do albúmen foi calculado por diferença, isto é, subtraindo do peso do ovo o peso da gema e da casca.

Após serem pesados os ovos foram quebrados cuidadosamente para preservar a integridade da gema. As cascas foram lavadas e após secarem por 24 horas em temperatura ambiente, foram pesadas. Para medir a altura e o diâmetro da gema e albúmen foi utilizado paquímetro digital, e a classificação foi baseada na medida de unidades Haugh (UH) segundo o critério desenvolvido por Haugh em 1937 (USDA 2000).

2.2.7 Armazenamento e processamento das amostras de sangue

As amostras de sangue foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório Multiusuário da Pós-Graduação em Ciência Animal, na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 5.000 rpm durante 10 minutos, para obtenção do soro. A seguir os soros foram divididos em alíquotas e armazenados à temperatura de - 20ºC para posterior análise.

Os tubos com heparina, para a obtenção do concentrado de hemácias, foram centrifugados a 1200 rpm, à 4ºC, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, colocado no tubo solução PBS no dobro do volume de hemácias. O tubo foi então fechado e invertido, levemente, por três vezes, e novamente centrifugado a 3.500 rpm, à 4ºC, por um minuto. Após repetir o procedimento por mais duas vezes foi adicionado 1.900 µL de água Milli-Q para cada 100 µL de hemácia. O protocolo utilizado foi o da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual de São Paulo, UNESP/Botucatu, descrito por FERREIRA et al. (1999). A seguir foram armazenados à temperatura de - 80ºC para posterior análise

2.2.8 Análise bioquímica

Os exames bioquímicos foram realizados com reagentes comerciais padronizados (Labtest®, Lagoa Santa, MG) e analisados em espectrofotômetro semiautomático (Bioplus 2000, Barueri, SP) de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante. As atividades enzimáticas foram determinadas na temperatura de 37ºC. A atividade sérica da aspartato aminotransferase (AST) foi determinada pelo método ultravioleta (UV), otimizado, sem piridoxal fosfato. A atividade sérica da gama glutamiltransferase (GGT) pelo método cinético utilizando-se como substrato glutamil-p-nitroanilida e a aspartato alaninatransferase (ALP) pelo método cinético contínuo, por hidrólise da timolftaleína monofosfato em meio alcalino. As proteínas totais séricas foram quantificadas pelo método colorimétrico de ponto final, por reação com o biureto. A albumina foi quantificada pelo método colorimétrico utilizando o verde de bromocresol. A concentração sérica de colesterol foi determinada pelo método enzimático colorimétrico, em uma reação catalisada pelo colesterol oxidase. Os

triglicerídeos foram determinados pelo método colorimétrico - Trinder. A creatinina foi quantificada por reação cinética com o picrato alcalino e ácido úrico pelo método enzimático - Trinder.

2.2.9 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para testar a resistência e a característica da membrana do eritrócito foi adicionado 1 mL de ácido sulfossalicílico (3,0%) a 1 mL de hemolisado sanguíneo, agitado por 10 segundos, centrifugado a 15.500 x g por 3 minutos e deixado em repouso durante 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA a 0,67%) a 500 μL de hemolisado. A mistura foi aquecida a 80ºC por 30 minutos e a absorbância determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em nM de malonaldeído (MDA) por grama de hemoglobina (gHb) (FERREIRA et al., 1999).

2.2.10 Processamento das amostras de tecido

Os tecidos hepático e renal fixados em solução de formaldeído foram encaminhados para o Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde foram processados segundo a técnica clássica de inclusão em parafina. Com o uso de micrótomo rotativo, cortes de 7 µm foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas de fígado e rins foram avaliadas quanto a possíveis lesões histopatológicas, no Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba (UNIUBE). Tanto para os fragmentos de fígado (um de cada lobo hepático) quanto para os rins (direito e esquerdo) foi estabelecido um único diagnóstico, considerando as alterações presentes nas duas amostras de cada ave.

2.2.11 Análise estatística

Os resultados obtidos na avaliação produtiva e qualidade física dos ovos, exceto a cor, foram analisados por ANOVA. A diferença das médias foi avaliada pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Nos resultados bioquímicos usou-se o teste Kolmogorov-Smirnov para determinar se os dados eram paramétricos ou

não paramétricos. Para as variáveis paramétricas foi aplicado a ANOVA seguida pelo teste de Tukey e para as variáveis não paramétricas, incluindo a cor da gema (escore), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. As diferenças nas distribuições de poedeiras que apresentaram ou não apresentaram degeneração gordurosa, nefrite, pilelite/pileonefrite e degeneração hidrópica renal foram analisadas pelo teste de qui-quadrado de independência de Pearson.

## 2.3 Resultados

Em cada período de produção, a adição de 3% de farelo de urucum (URU) ou 8mg/g de cantaxantina + 25ppm de apocaroteno (CAR+CAY) à ração, não alterou o desempenho das aves em relação ao consumo de ração, produção, peso e massa dos ovos e conversão alimentar (Tabela 2).

A adição do pigmentante natural (urucum) ou sintético (CAR+CAY) à ração não alterou o diâmetro e a altura do albúmen e da gema, o peso da casca e o índice de gema. Já o peso e a coloração da gema de ovos produzidos por galinhas alimentadas com ração contendo os pigmentantes foram maiores ($p<0,05$) que as do grupo controle (Tabela 3).

A ingestão de urucum ou carotenóides sintéticos (CAR+CAY) por 21, 42 e 63 dias não alterou os parâmetros bioquímicos relacionados à função e à integridade morfológica das células renais e hepáticas das aves (Tabela 4).

As concentrações sanguíneas, de creatinina e ácido úrico (Figuras 1 e 2), não foram afetadas ($p\geq0,05$) pelo uso de 3% de farelo de urucum ou de carotenóides sintéticos (mistura de 8mg/g de cantaxantina + 25mg/g de apocaroteno).

A atividade sérica das enzimas AST e GGT não foi afetada ($p\geq0,05$) pelo uso de urucum ou cantaxantina + apocaroteno na ração (Figuras 3 e 4), indicando que não houve lesão de hepatócitos ou de ductos biliares.

TABELA 2 – Valores médios, desvio padrão (desv pad) e coeficiente de variação (CV) dos índices de avaliação produtiva de poedeiras comerciais alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias

| **Índices produtivos** | | **CICLO 1 (24 a 27 semanas)** | | | **CICLO 2 (27 a 30 semanas)** | | | **CICLO 3 (30 a 33 semanas)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Controle** | **CAR+CAY[1]** | **Urucum[2]** | **Controle** | **CAR+CAY[1]** | **Urucum[2]** | **Controle** | **CAR+CAY[1]** | **Urucum[2]** |
| Peso de ovo (g) | Media | 60,03 | 59,60 | 59,98 | 59,61 | 59,74 | 61,08 | 59,56 | 59,59 | 60,56 |
| | Desv pad | 0,82 | 1,76 | 1,72 | 2,76 | 2,70 | 2,98 | 1,18 | 1,26 | 1,15 |
| | CV (%) | 1,40 | 2,86 | 2,85 | 4,58 | 4,46 | 5,01 | 1,97 | 2,07 | 1,93 |
| Consumo de ração (g/ave/dia) | Media | 108,77 | 107,99 | 107,22 | 95,56 | 98,35 | 96,62 | 104,24 | 105,01 | 104,41 |
| | Desv pad | 3,73 | 1,93 | 1,75 | 3,71 | 5,91 | 2,02 | 4,91 | 3,65 | 8,00 |
| | CV (%) | 3,55 | 1,76 | 1,61 | 3,93 | 6,15 | 2,05 | 4,75 | 3,65 | 7,79 |
| Produção de ovo (%/ave/dia) | Media | 94,60 | 94,60 | 91,90 | 86,11 | 94,25 | 90,08 | 93,39 | 94,11 | 92,06 |
| | Desv pad | 8,16 | 4,41 | 2,42 | 7,00 | 8,30 | 7,51 | 4,14 | 5,50 | 4,36 |
| | CV (%) | 8,49 | 4,83 | 2,51 | 8,34 | 8,88 | 7,65 | 4,35 | 5,87 | 4,62 |
| Massa de ovos (g) | Media | 56,79 | 56,46 | 55,80 | 54,38 | 56,15 | 54,96 | 59,97 | 56,46 | 55,73 |
| | Desv pad | 5,29 | 3,85 | 2,51 | 5,31 | 5,01 | 3,56 | 8,44 | 3,07 | 3,10 |
| | CV (%) | 9,42 | 6,78 | 4,35 | 10,34 | 9,14 | 6,35 | 14,70 | 5,39 | 5,56 |
| Conversão alimentar (kg/dz) | Media | 1,38 | 1,37 | 1,46 | 1,33 | 1,26 | 1,29 | 1,34 | 1,33 | 1,36 |
| | Desv pad | 0,09 | 0,08 | 0,04 | 0,06 | 0,06 | 0,13 | 0,04 | 0,12 | 0,08 |
| | CV (%) | 6,60 | 3,19 | 2,82 | 4,79 | 4,73 | 11,29 | 2,91 | 9,22 | 6,36 |
| Conversão alimentar (kg/kg) | Media | 1,92 | 1,92 | 1,95 | 1,87 | 1,76 | 1,76 | 1,87 | 1,86 | 1,88 |
| | Desv pad | 0,15 | 0,10 | 0,09 | ,,15 | 0,07 | 0,13 | 0,08 | 0,15 | 0,14 |
| | CV (%) | 7,72 | 5,44 | 4,99 | 7,98 | 4,20 | 7,85 | 4,63 | 8,09 | 7,60 |

Teste de Tukey ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa.

[1]Cantaxantina (CAR) 8mg/g + apocaroteno(CAY) 25mg/g (carotenóides sintéticos)

[2]Farelo de urucum 3%

TABELA 3 - Valores médios, desvio padrão (desv pad) e coeficiente de variação (CV) dos índices de qualidade física interna e externa de ovos de poedeiras comerciais alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias

| **Índices de qualidade** | | **CICLO 1 (24 a 27 semanas)** | | | **CICLO 2 (27 a 30 semanas)** | | | **CICLO 3 (30 a 33 semanas)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Controle** | **CAR+CAY[1]** | **Urucum[2]** | **Controle** | **CAR+CAY[1]** | **Urucum[2]** | **Controle** | **CAR+CAY[1]** | **Urucum[2]** |
| Peso ovo (g) | Media | 59,84 | 59,86 | 5991 | 60,08 | 60,85 | 59,49 | 59,95 | 59,96 | 60,50 |
| | Desv pad | 1,32 | 2,40 | 2,35 | 3,18 | 3,20 | 3,36 | 2,54 | 2,07 | 1,80 |
| | CV (%) | 2,26 | 3,89 | 3,90 | 5,34 | 5,30 | 5,61 | 4,29 | 3,40 | 3,00 |
| Peso gema (g) | Media | 14,19[b] | 14,99[a] | 15,01[a] | 14,90[b] | 15,26 [a] | 14,85 [a] | 14,30[b] | 15,06[a] | 15,25[a] |
| | Desv pad | 0,65 | 0,78 | 1,01 | 1,05 | ,98 | 1,07 | 0,67 | 0,76 | 0,66 |
| | CV (%) | 4,43 | 5,14 | 6,81 | 7,10 | 6,61 | 7,26 | 4,64 | 5,09 | 4,50 |
| Peso casca (g) | Media | 5,71 | 5,79 | 5,81 | 5,73 | 5,64 | 5,82 | 5,69 | 5,84 | 5,88 |
| | Desv pad | 0,36 | 0,39 | 0,37 | 0,33 | 0,32 | 0,33 | 0,45 | 0,40 | 0,31 |
| | CV (%) | 6,15 | 6,68 | 6,23 | 5,57 | 5,65 | 5,70 | 7,98 | 6,88 | 5,42 |
| Índice gema | Media | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| | Desv pad | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | CV (%) | 4,86 | 2,21 | 4,36 | 3,86 | 2,05 | 3,86 | 7,45 | 5,98 | 8,95 |
| Unidade Haugh | Media | 90,78 | 86,79 | 90,09 | 91,26 | 90,85 | 91,48 | 90,87 | 90,20 | 90,45 |
| | Desv pad | 4,13 | 6,61 | 4,22 | 4,65 | 5,02 | 6,08 | 4,79 | 6,94 | 5,60 |
| | CV (%) | 4,56 | 7,44 | 4,71 | 5,30 | 5,49 | 6,48 | 5,41 | 7,70 | 6,18 |
| Albúmen % | Media | 66,65 | 65,19 | 65,79 | 65,97 | 66,03 | 65,34 | 65,98 | 65,23 | 65,12 |
| | Desv pad | 2,10 | 1,63 | 1,58 | 1,87 | 1,72 | 2,71 | 1,67 | 1,38 | 0,92 |
| | CV (%) | 3,21 | 2,46 | 2,41 | 2,38 | 2,59 | 4,16 | 2,55 | 3,23 | 3,43 |
| Gema % | Media | 23,76 | 25,09 | 24,65 | 24,85 | 24,62 | 24,99 | 25,34 | 25,90 | 23,89 |
| | Desv pad | 2,18 | 1,70 | 1,26 | 1,53 | 1,47 | 2,21 | 1,38 | 1,72 | 2,14 |
| | CV (%) | 8,73 | 6,99 | 5,12 | 6,06 | 5,98 | 8,74 | 5,67 | 6,91 | 8,84 |
| Casca % | Media | 9,40 | 9,72 | 9,56 | 9,18 | 9,34 | 9,67 | 8,68 | 8,87 | 8,99 |
| | Desv pad | 0,62 | 0,76 | 0,68 | 0,70 | 0,67 | 1,04 | 0,92 | 0,94 | 0,84 |
| | CV (%) | 6,15 | 7,89 | 7,09 | 6,85 | 7,21 | 10,65 | 9,49 | 9,81 | 8,70 |
| Cor Gema | Media | 0,66[C] | 12,25[A] | 7,84[B] | 0[C] | 11,11[A] | 6,85[B] | 0[C] | 10,11[A] | 8,30[B] |
| | Desv pad | 0,0 | 0,31 | 0,74 | 0,0 | 0,47 | 0,50 | 0,0 | 0,63 | 0,83 |
| | CV (%) | 0 | 4,15 | 6,14 | 0 | 5,89 | 4,52 | 0 | 8,98 | 7,56 |

Na linha, valores seguidos de letras minúscula diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)
Na linha, valores seguidos de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$)
[1]Cantaxantina (CAR) 8mg/g + apocaroteno(CAY) 25mg/g (carotenóides sintéticos) [2] Farelo de urucum 3%

TABELA 4 - Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos, proteína total, albumina, globulina, relação albumina/globulina, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), ALP (fosfatase alcalina) e GGT (gama glutamiltransferase) de poedeiras comerciais alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias

| **Ciclos/Tratamentos/** | **CICLO 1 (24 a 27 semanas)** | | | **CICLO 2 (27 a 30 semanas)** | | | **CICLO 3 (30 a 33 semanas)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Analito** | **Controle** | **CAR+CAY[1]** | **Urucum[2]** | **Controle** | **CAR+CAY[1]** | **Urucum[2]** | **Controle** | **CAR+CAY[1]** | **Urucum[2]** |
| Proteína total | 5,03 | 5,45 | 5,82 | 6,07 | 7,46 | 7,28 | 6,83 | 7,41 | 7,34 |
| (g/dL) | ± 0,83 | ± 1,29 | ± 0,85 | ± 1,78 | ± 1,96 | ± 2,15 | ± 0,72 | ± 1,83 | ± 1,22 |
| Albumina | 1,85 | 2,18 | 2,87 | 1,85 | 2,01 | 2,04 | 1,83 | 2,09 | 2,10 |
| (g/dL) | ± 0,19 | ± 0,41 | ± 1,97 | ± 0,82 | ± 0,70 | ± 0,25 | ± 0,32 | ± 0,23 | ± 0,58 |
| Globulina | 3,28 | 3,27 | 3,84 | 4,22 | 5,46 | 5,24 | 5,00 | 5,32 | 5,24 |
| (g/dL) | ± 0,98 | ± 1,22 | ± 1,02 | ± 1,62 | ± 1,37 | ± 2,24 | ± 0,96 | ± 1,83 | ± 1,75 |
| Relação | 0,62 | 0,83 | 0,56 | 0,49 | 0,37 | 0,40 | 0,39 | 0,43 | 0,57 |
| (A:G) | ± 0,25 | ± 0,58 | ± 0,25 | ± 0,17 | ± 0,08 | ± 0,19 | ± 0,14 | ± 0,15 | ± 0,38 |
| Creatinina | 0,30 | 0,34 | 0,30 | 0,32 | 0,33 | 0,34 | 0,32 | 0,27 | 0,28 |
| (mg/dL) | ± 0,07 | ± 0,04 | ± 0,03 | ± 0,06 | ± 0,04 | ± 0,04 | ± 0,04 | ± 0,06 | ± 0,06 |
| Ácido úrico | 4,99 | 6,16 | 5,05 | 4,15 | 4,43 | 4,97 | 4,41 | 3,87 | 4,46 |
| (mg/dL) | ± 1,83 | ± 2,38 | ± 1,59 | ± 1,76 | ± 1,83 | ± 1,95 | ± 2,41 | ± 1,11 | ± 1,71 |
| Colesterol | 75,2 | 109,78 | 77,53 | 113,39 | 100,68 | 85,36 | 98,41 | 103,79 | 115,07 |
| (mg/dL) | ± 32,44 | ± 31,03 | ± 15,29 | ± 42,51 | ± 27,25 | ± 40,35 | ± 44,20 | ± 36,72 | ± 36,77 |
| Triglicerídeos | 871,70 | 1.346,08 | 853,46 | 1.339,32 | 910,72 | 1.212,00 | 1.056,55 | 1.587,86 | 1.289,21 |
| (mg/dL) | ± 613,51 | ± 502,99 | ± 364,03 | ± 660,56 | ± 457,75 | ± 239,12 | ± 595,73 | ± 683,61 | ± 634,92 |
| AST | 140,24 | 187,33 | 146,40 | 305,60 | 261,63 | 264,17 | 307,13 | 283,17 | 295,77 |
| (U/L) | ± 28,68 | ± 49,36 | ± 26,19 | ± 61,20 | ± 32,80 | ± 33,73 | ± 36,75 | ± 63,88 | ± 58,40 |
| ALT | 43,21 | 33,33 | 27,16 | 38,27 | 38,28 | 38,28 | 38,27 | 28,39 | 39,51 |
| (U/L) | ± 20,11 | ± 9,07 | ± 8,98 | ± 13,60 | ± 8,66 | ± 12,76 | ± 5,57 | ± 9,85 | ± 7,65 |
| ALP | 1.734,83 | 460,53 | 486,00 | 3.156,15 | 1.913,83 | 1.281,57 | 854,80 | 1.539,08 | 570,88 |
| (U/L) | ± 1.343,79 | ± 259,67 | ± 323,58 | ± 2.818,07 | ± 2.144,50 | ± 730,63 | ± 436,18 | ± 2.014,97 | ± 698,08 |
| GGT | 34,24 | 23,09 | 32,00 | 51,57 | 35,07 | 41,25 | 47,05 | 28,87 | 33,00 |
| (U/L) | ± 14,71 | ± 10,11 | ± 17,82 | ± 16,45 | ± 16,46 | ± 10,10 | ± 12,61 | ± 6,39 | ± 15,00 |

Teste de Tukey ($p < 0,05$) e teste de Kruskal Wallis($p < 0,05$). Não houve diferença significativa

[1]Cantaxantina (CAR) 8mg/g + apocaroteno(CAY) 25mg/g (carotenóides sintéticos)

[2] Farelo de urucum 3%

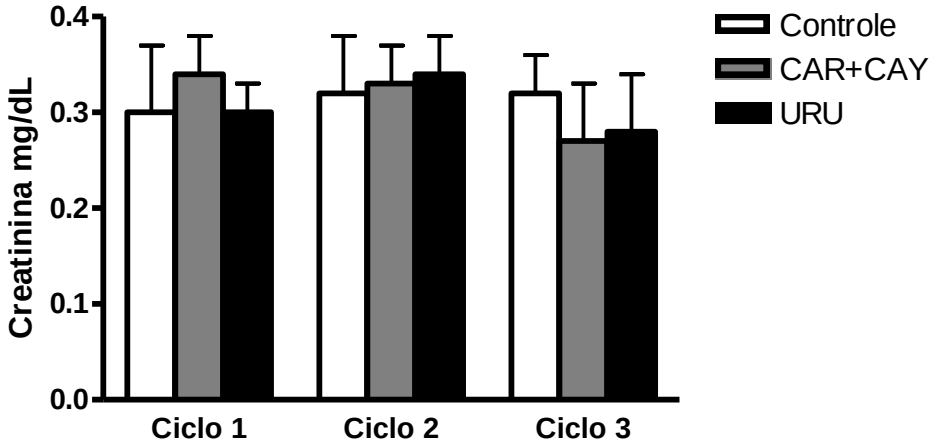


FIGURA 1 - Concentração sanguínea de creatinina de poedeiras comerciais alimentadas com dietas à base de sorgo (controle), cantaxantina + apocaroteno (CAR+CAY) e farelo de urucum (URU). Os dados representam a média ± DP de 18 animais

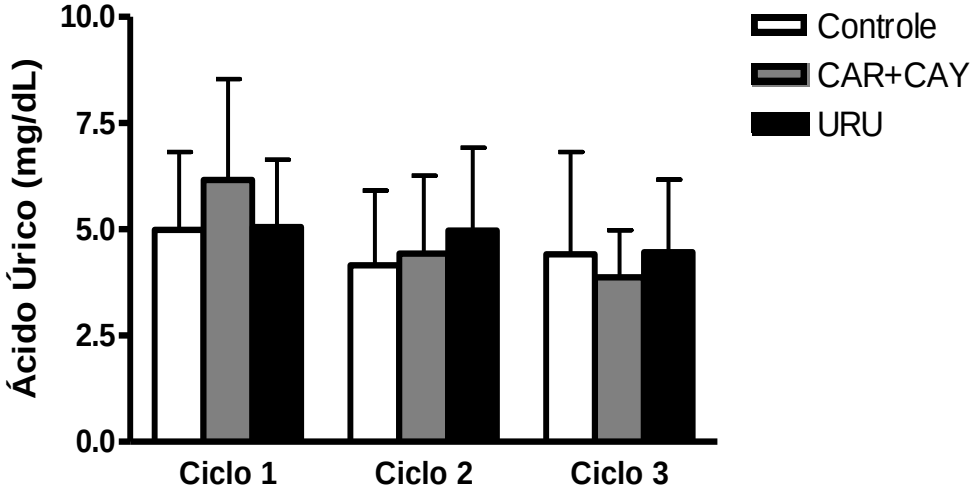


FIGURA 2 - Concentração sanguínea de ácido úrico de poedeiras comerciais alimentadas com dietas à base de sorgo (controle), cantaxantina + apocaroteno (CAR+CAY) e farelo de urucum (URU). Os dados representam a média ± DP de 18 animais

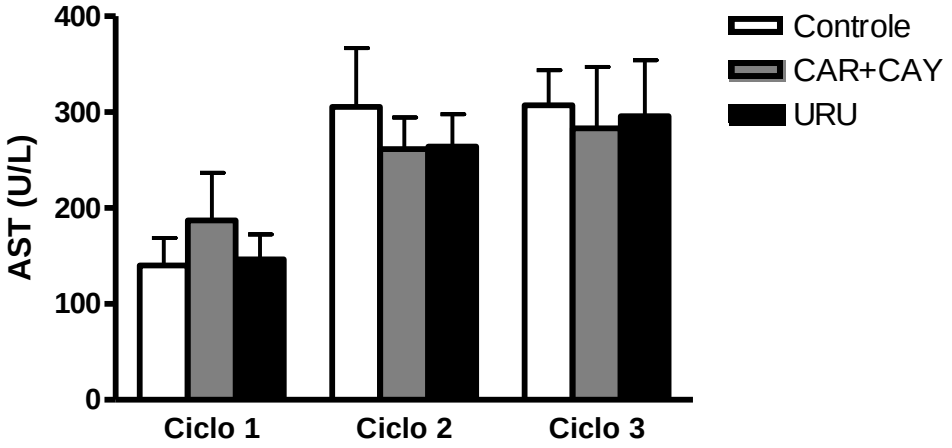


FIGURA 3 - Concentração sanguínea de aspartato aminotransferase (AST) de poedeiras comerciais alimentadas com dietas à base de sorgo (controle), cantaxantina + apocaroteno (CAR+CAY) e farelo de urucum (URU). Os dados representam a média ± DP de 18 animais

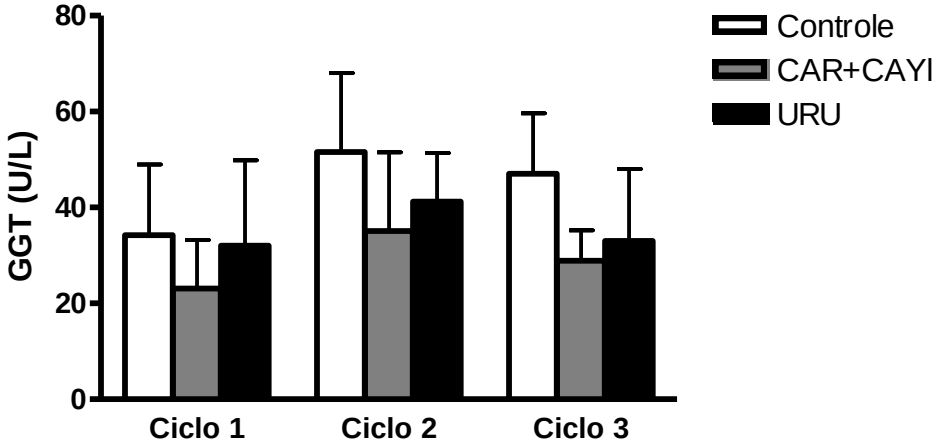


FIGURA 4 - Concentração sanguínea de GGT de poedeiras comerciais alimentadas com dietas à base de sorgo (controle), cantaxantina + apocaroteno (CAR+CAY) e farelo de urucum (URU). Os dados representam a média ± DP de 18 animais

No exame histológico do fígado várias aves desenvolveram degeneração gordurosa discreta, independente do ciclo e dos tratamentos. Porém as alterações observadas nas células hepáticas não podem ser atribuídas à adição do farelo de urucum ou dos carotenóides sintéticos na ração (Tabela 5 e Figura 5), já que foram também observadas no fígado das aves que receberam ração sem pigmentante ($p \geq 0,05$).

TABELA 5 – Número e porcentagem de poedeiras alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (basal/controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias, que apresentaram degeneração gordurosa do fígado

| Ciclos (semanas) Valor do P[1] | Tratamentos | Degeneração Gordurosa | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Sim | | Não | |
| | | Nº | (%) | Nº | (%) |
| Ciclo 1: 24 a 27 (P=1,00) | Basal | 5 | (83,4) | 1 | (16,6) |
| | CAR+CAY[2] | 5 | (83,4) | 1 | (16,6) |
| | Urucum[3] | 5 | (83,4) | 1 | (16,6) |
| Ciclo 2: 27 a 30 (P=0,39) | Basal | 3 | (50,0) | 3 | (50,0) |
| | CAR+CAY[2] | 5 | (83,4) | 1 | (16,6) |
| | Urucum[3] | 3 | (50,0) | 3 | (50,0) |
| Ciclo 3: 30 a 33 (P=0,79) | Basal | 3 | (50,0) | 3 | (50,0) |
| | CAR+CAY[3] | 2 | (33,4) | 4 | (66,6) |
| | Urucum[3] | 2 | (33,4) | 4 | (66,6) |

[1]Dados analisados pelo teste de Qui-quadrado de independência de Pearson
[2]Cantaxantina (CAR) 8mg/g + apocaroteno (CAY) 25mg/g
[3] Farelo de urucum 3%

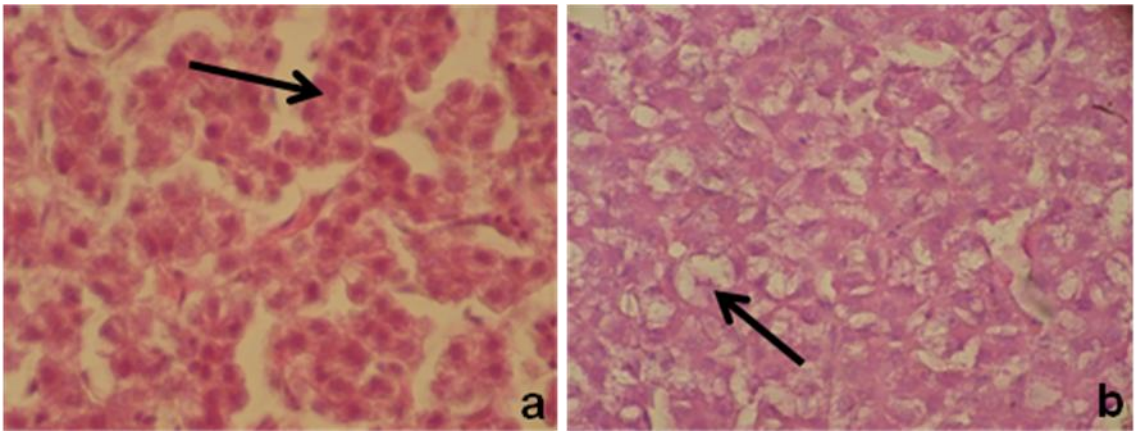


FIGURA 5 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de poedeiras vermelhas. A) hepatócitos normais (seta); B) hepatócitos com degeneração gordurosa (seta). Coloração HE, aumento de 40 x.

Na avaliação histológica dos rins diversas aves apresentaram alteração renal (nefrite, pielite pielonefrite ou degeneração hidrópica), independente do ciclo ou dos tratamentos (Tabelas 6, 7 e 8 e Figura 6). A presença dos pigmentantes (farelo de urucum e carotenóides sintéticos) na ração, não pode ser a causa das lesões (Tabela 6 e Figura 6), já que essas foram também observadas nos rins das aves que receberam ração sem pigmentante ($p \geq 0,05$).

TABELA 6 – Número e porcentagem de poedeiras alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (basal/controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias que apresentaram nefrite

| Ciclos (semanas) (Valor do P[1]) | Tratamentos (n=6) | Nefrite | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Sim | | Não | |
| | | Nº | (%) | Nº | (%) |
| Ciclo 1 (24 a 27) (P=0,33) | Basal | 1 | (16,6) | 5 | (83,4) |
| | CAR+CAY[2] | 3 | (50,0) | 3 | (50,0) |
| | Urucum [3] | 1 | (16,6) | 5 | (83,4) |
| Ciclo 2 (27 a 30) (P=0,39) | Basal | 1 | (16,6) | 5 | (83,4) |
| | CAR+CAY[2] | 3 | (50,0) | 3 | (50,0) |
| | Urucum [3] | 3 | (50,0) | 3 | (50,0) |
| Ciclo 3 (30 a 33) (P=0,79) | Basal | 4 | (66,6) | 2 | (33,4) |
| | CAR+CAY[3] | 3 | (50,0) | 3 | (50,0) |
| | Urucum [3] | 3 | (50,0) | 3 | (50,0) |

[1]Dados analisados pelo teste de Qui-quadrado de independência de Pearson
[2]Cantaxantina (CAR) 8mg/g + apocaroteno (CAY) 25mg/g.
[3] Farelo de urucum 3%

TABELA 7 – Número e porcentagem de poedeiras alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (basal/controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias que apresentaram pielite ou pielonefrite

| Ciclos (semanas) (Valor do P[1]) | Tratamentos (n=6) | Pielite ou Pielonefrite | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Sim | | Não | |
| | | Nº | (%) | Nº | (%) |
| Ciclo 1 (24 a 27) (P=0,51) | Basal | 3 | (50,0) | 3 | (50,0) |
| | CAR+CAY[2] | 4 | (66,6) | 2 | (33,4) |
| | Urucum [3] | 2 | (33,4) | 4 | (66,6) |
| Ciclo 2 (27 a 30) (P=0,35) | Basal | 0 | (0,00) | 6 | (100) |
| | CAR+CAY[2] | 1 | (16,6) | 5 | (83,4) |
| | Urucum [3] | 0 | (0,00) | 6 | (100) |
| Ciclo 3 (30 a 33) (P=0,35) | Basal | 1 | (16,6) | 5 | (83,4) |
| | CAR+CAY[3] | 0 | (0,00) | 6 | (100) |
| | Urucum [3] | 0 | (0,00) | 6 | (100) |

[1]Dados analisados pelo teste de Qui-quadrado de independência de Pearson
[2]Cantaxantina (CAR) 8mg/g + apocaroteno (CAY) 25mg/g.
[3] Farelo de urucum 3%

TABELA 8 – Número e porcentagem de poedeiras alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (basal/controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum), em três ciclos de 21 dias que apresentaram degeneração hidrópica renal

| Ciclos (semanas) (Valor do P[1]) | Tratamentos (n=6) | Degeneração Hidrópica Renal | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Sim | | Não | |
| | | Nº | (%) | Nº | (%) |
| Ciclo 1 (24 a 27) (P=0,33) | Basal | 3 | (50,0) | 3 | (50,0) |
| | CAR+CAY[2] | 1 | (16,6) | 5 | (83,4) |
| | Urucum [3] | 1 | (16,6) | 5 | (83,4) |
| Ciclo 2 (27 a 30) (P=0,054) | Basal | 5 | (83,4) | 1 | (16,6) |
| | CAR+CAY[2] | 1 | (16,6) | 5 | (83,4) |
| | Urucum [3] | 4 | (66,6) | 2 | (33,4) |
| Ciclo 3 (30 a 33) (P=1,00) | Basal | 4 | (66,6) | 2 | (33,4) |
| | CAR+CAY[3] | 4 | (66,6) | 2 | (33,4) |
| | Urucum [3] | 4 | (66,6) | 2 | (33,4) |

[1]Dados analisados pelo teste de Qui-quadrado de independência de Pearson
[2]Cantaxantina (CAR) 8mg/g + apocaroteno (CAY) 25mg/g.
[3] Farelo de urucum 3%

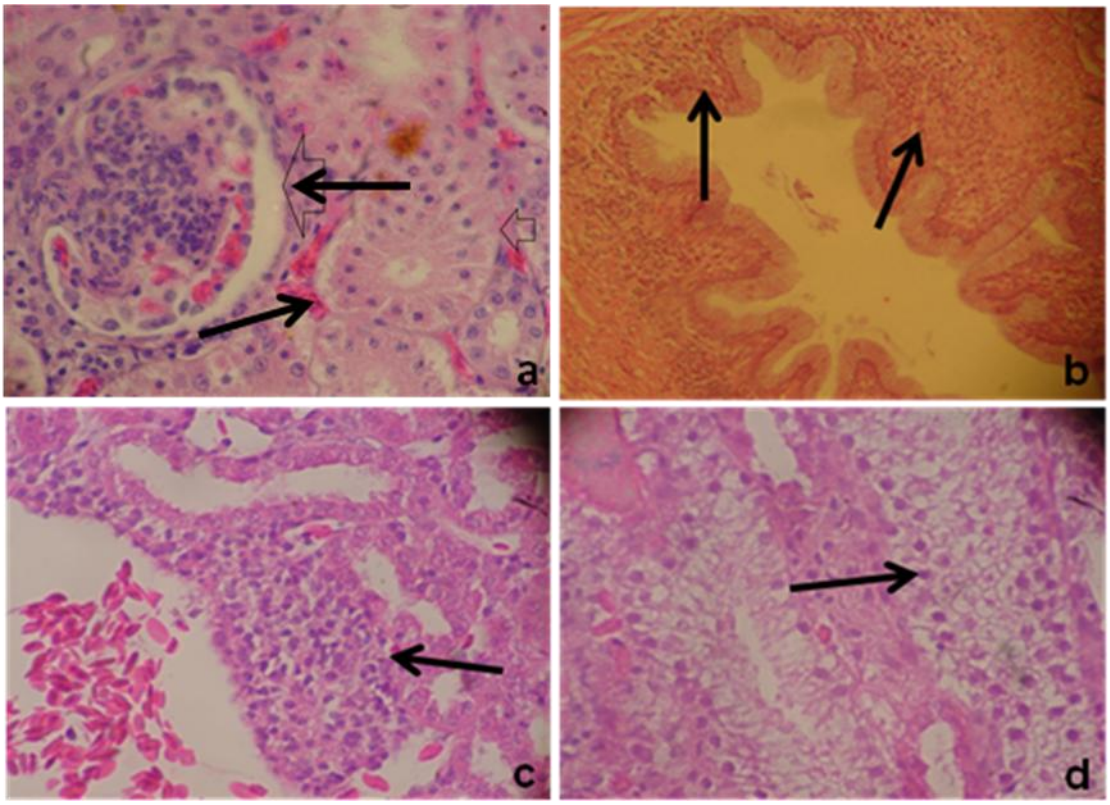


FIGURA 6 - Fotomicrografia de corte histológico de rins das galinhas poedeiras: A) glomérulo e túbulos normais (setas); B) infiltrado inflamatório caracterizando pielite (setas); C) infiltrado inflamatório no parênquima renal caracterizando nefrite (seta); D) degeneração hidrópica de células tubulares (seta). Coloração HE e aumento de 40 x

A adição de 3% de farelo de urucum e carotenóides sintéticos (mistura de 8mg/g de cantaxantina + 25mg/g de apocaroteno) na ração, durante 63 dias não alterou a concentração de MDA no sangue das aves (Tabela 9 e Figura 7), indicando que a adição desses pigmentantes, nessa concentração não protegeu as aves contra o estresse oxidativo (p≥0,05).

TABELA 9 – Média e desvio padrão da dosagem de malonaldeido no sangue das aves aos 21 dias (Ciclo 1) e aos 63 dias (Ciclo 3) do início do experimento (TBARS), alimentadas com ração a base de sorgo sem pigmentante (controle) e com pigmentantes sintéticos (CAR+CAY) e natural (urucum)

| | CONTROLE | | CAR+CAY[1] | | URUCUM[2] | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ciclo 1 | Ciclo 3 | Ciclo 1 | Ciclo 3 | Ciclo 1 | Ciclo 3 |
| Médias ± DP | 3.575,51 ±1.768,59 | 21.074,55 ± 3.126,00 | 3.032,92 ± 932,21 | 17.338,88 ± 6.089,62 | 4.002,38 ± 964,64 | 22.661,51 ± 4.396,37 |

Teste de Tukey (p < 0,05). Não houve diferença significativa
[1]Cantaxantina (CAR) 8mg/g + apocaroteno(CAY) 25mg/g (carotenóides sintéticos)
[2] Farelo de urucum 3%

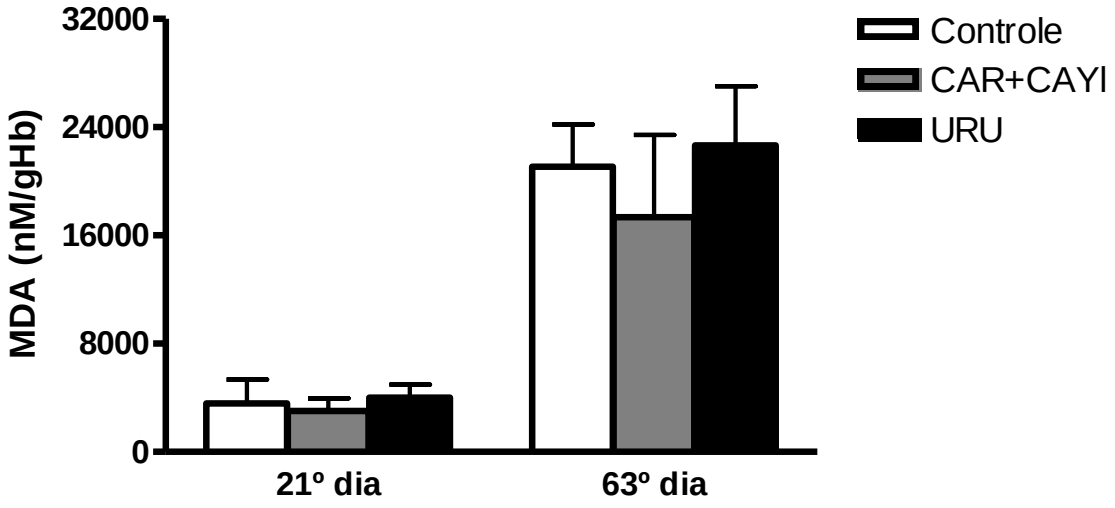


FIGURA 7 - Concentração sanguínea de malonaldeído (MDA) de poedeiras comerciais alimentadas com dietas à base de sorgo (controle), cantaxantina + apocaroteno (CAR+CAY) e farelo de urucum (URU). Os dados representam a média ± DP de 18 animais aos 21º dias (Ciclo 1) e 63º dias (Ciclo 3) do experimento.

## 2.4 Discussão

Em relação à avaliação produtiva das aves observou-se que a adição de pigmentantes, nas concentrações estudadas, não alterou nenhum dos parâmetros analisados no período experimental. Considerando a qualidade física dos ovos observou-se que tanto a adição de farelo de urucum quanto a de carotenóides sintéticos (cantaxantina e apocaroteno) promoveram aumento significativo do peso ($p<0,05$) da gema além de intensificar a sua cor. Esse aumento no peso e a coloração mais intensa da gema devem ter sido provocados pela maior quantidade de carotenóide transferido à gema ou estar relacionado a maior deposição de elementos que compõem as gemas, como as proteínas e os lipídeos, promovido pelos pigmentantes.

Resultados semelhantes aos obtidos nesse estudo foram descritos na literatura. Trabalhos realizados por BAIÃO et al. (1996), ANGELES & SCHEIDELER (1998), GARCIA, et al. (2002), ROCHA (2011), indicaram que a presença de cantaxantina na ração não influenciou no desempenho das aves e na qualidade dos ovos, exceto em relação à cor da gema, que em todos os experimentos se intensificou. Porém em estudos realizados com urucum foram observados resultados conflitantes sobre o seu efeito no desempenho e qualidade dos ovos. SILVA et al. (2000), CARVALHO et al. (2009) e CURVELO et al. (2009) constataram que a adição de urucum na dieta melhorou a qualidade dos ovos, além de promover um efeito linear crescente na produção dos mesmos. No entanto BRAZ et al. (2007), HARDER et al. (2008), GARCIA et al. (2009) e CURVELO et al. (2009) observaram que a adição de urucum não interferiu na produção e qualidade dos ovos. QUEIROZ et al. (2010) observaram que a inclusão de 12% de farelo de urucum à ração de poedeiras comerciais semi-pesadas causou redução de 3,7% no consumo da ração, de 10% na produção, além do peso dos ovos, que passou de 720 g para 660 g/dz.

Os resultados da bioquímica e da histologia sugerem que a inclusão de 3% de farelo de urucum à ração não prejudicou a função hepática e renal das aves. Esse fato se deve, provavelmente, à sua elevada $DL_{50}$ (dose letal média), o que torna esse pigmentante um produto extremamente seguro. A $DL_{50}$ em rato, por via intraperitoneal, é de 700 mg/kg segundo o CATÁLOGO RURAL (2008).

Porém de acordo com FREITAS (2011), o urucum poderia apresentar toxicidade seletiva, pois quando adicionou (*in vitro*) extrato metanólico da semente de urucum à cultura de astrócitos normais e de linhagem neoplásica, o extrato mostrou citotoxicidade do tipo dose-dependente nas células neoplásicas, induzindo morte por necrose e apoptose tardia, sem alterar as células normais.

Também a adição da mistura dos carotenoides sintéticos (8mg/g de cantaxantina + 25mg/g de apocaroteno) não alterou as funções renais e hepáticas das aves, embora a concentração utilizada tenha sido bem superior (8mg/g) à proposta pelo FDA que é de 8mg/kg de ração para poedeiras (DIRECTIVA 2003/7/CE).

Embora o número de trabalhos para determinar os valores bioquímicos de referência, em aves, seja muito limitado e, várias lacunas ainda permaneçam (BORSA et al., 2006). No presente trabalho a média da atividade enzimática da AST foi de 223,5 UI/L e da GGT foi de 37,33 UI/L, valores acima dos estabelecidos por GONÇALVES et al. (2010) e BARBOSA et. al (2011), de 57,29 UI/L e 54,8 UI/L para a AST e 17,37 UI/L e 20,78 UI/L para a GGT respectivamente, em galinhas poedeiras. Porém segundo CAMPBEL (2004), a AST acima de 275 UI/L sugere aumento da sua atividade, que pode estar relacionada a distúrbios hepáticos ou musculares e, apenas valores acima de 800 UI/L, seriam sugestivos de dano hepático severo. Além disso, as aves não apresentaram alteração macroscópica no fígado durante a necropsia.

As concentrações sanguíneas de creatinina, nesse experimento, oscilaram entre 0,27 a 0,34 mg/dL e as de ácido úrico entre 3,87 e 6,16 mg/d. Esses valores indicam que a função renal não foi alterada pelos pigmentantes adicionados à ração, pois BARBOSA et al. (2011) encontraram concentrações sanguíneas de creatinina entre 1,2 a 2,2 mg/dL e BENEZ (2004) encontraram de 2 a 10 mg/dL de ácido úrico, em aves com filtração glomerular normal. De acordo com CAMPBELL (2004), apenas concentrações de ácido úrico acima de 15 mg/dL estão relacionadas a comprometimento da atividade renal.

A adição de farelo de urucum ou de carotenóides sintéticos na ração, também não causou diferença significativa ($p>0,05$) na concentração de ácido úrico e creatinina e na atividade da AST e GGT, quando comparado com a ração

controle, indicando que esses pigmentantes, nessa concentração, não são tóxicos para os rins, fígado e vias biliares.

A concentração sanguínea de triglicerídeos observada nas aves do experimento foi elevada (entre 853,46 e 1339,32 mg/dL), porém durante o pico de postura, devido ao metabolismo hepático muito intenso para a formação do vitelo, é normal o aumento desses lipídeos (HERMIER, 1997). Entretanto, comparando as aves que receberam pigmentantes na ração com as que receberam a ração controle, não houve diferença significativa ($p>0,05$) na sua concentração sanguínea.

A concentração média do colesterol no sangue das aves desse experimento foi 104,75 mg/dL naquelas que receberam ração com carotenóides sintéticos, de 92,65 mg/dL nas alimentadas com ração contendo farelo de urucum e de 95,6 mg/dL nas que receberam ração sem pigmentante. Os valores estão abaixo daqueles descritos para aves sadias que variou de 115,20 mg/dL (RIBEIRO et al., 2008) a 183,8 mg/dL (KANEKO et al., 2008), embora espera-se maiores concentrações sanguíneas nas aves produtoras de ovos vermelhos (BASMACIOGLU & ERQÜI, 2005), como as utilizadas nesse trabalho.

A concentração sérica da proteína total nas aves desse experimento não foi alterada pela adição de pigmentantes na ração, já que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os valores encontrados nesse trabalho (proteína total de 5,03 a 7,46, albumina de 1,83 a 2,87 e globulina de 3,27 a 5,46 g/dL) e os de KANEKO et al. (2008), em aves sadias (proteína total de 2,5 a 5,6 g/dL, albumina de 0,8 a 2,5 g/dL e globulina em torno de 3,1 g/dL).

Embora algumas lesões hepáticas e renais de baixa gravidade tenham sido observadas nas lâminas de fígado e rins, nem o farelo de urucum nem os carotenóides sintéticos podem ser responsabilizados por estas patologias, pois elas apareceram tanto nas aves alimentadas com ração contendo pigmentante quanto naquelas que receberam ração sem pigmentante.

A alteração histopatológica hepática evidenciada nesse estudo foi a degeneração gordurosa, observada em 59,3% das aves. Em galinhas poedeiras, segundo HERMIER (1997), a lipogênese hepática é drasticamente aumentada por estrógenos, a fim de atender a demanda de vitelogênese. Embora os principais produtos da síntese *de novo* dos lipídios hepáticos sejam os triglicerídeos, o

fígado é também o principal local de síntese do colesterol Esses lipídios, juntamente com a proteína, são os principais componentes das lipoproteínas

As principais alterações observadas nos rins foram, em 40,7% das aves, nefrite e, em 25,6%, pielite ou pielonefrite, que são lesões inflamatórias inespecíficas, frequentes em aves poedeiras.

A concentração de malonaldeído (MDA) no sangue não foi reduzida pela adição dos pigmentantes na ração, indicando que esses elementos não foram eficientes em proteger as aves contra o estresse oxidativo, embora os carotenóides apresentem propriedades antioxidantes. MARTINÉZ TOMÉ et al. (2001) comparando a capacidade antioxidante do extrato de urucum com butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e galato de propila (antioxidantes sintéticos não carotenóides) confirmaram a supremacia do produto natural. MERCADANTE et al. (2010), ao compararem o efeito antioxidante de produtos naturais (norbixina, beta caroteno, licopeno e zeaxantina) com um produto sintético (eritorbato de sódio) em salsichas, verificaram que a norbixina e zeaxantina foram os mais eficientes, reduzindo em torno de 20% os níveis de MDA. ROSA et al. (2010) observaram que as gemas de ovos das aves que receberam ração com cantaxantina quando comparadas às gemas de ovos das aves alimentadas com ração sem cantaxantina, continham menor concentração MDA/mg de proteína após serem incubados por quatro, oito e doze dias. A adição de cantaxantina à ração de galos promoveu a redução do estresse oxidativo dos espermatozoides, aumentando a sua fertilidade (ROCHA 2011).

## 2.5 Conclusões

O farelo de urucum na concentração de 3% e a mistura de carotenóides sintéticos (8mg/g de cantaxantina + 25mg/g de apocaroteno) são seguros para serem utilizados na ração de poedeiras vermelhas, uma vez que não alteram a função hepática, renal e índices produtivos das aves; não interferem na qualidade física dos ovos e intensificam a cor da gema. Adicionalmente, a inclusão desses pigmentantes na ração, nas concentrações testadas, não protege as aves do estresse oxidativo.

**Referencias**

1. ANGELES M.; SCHEIDELER S. Effect of diet, level, and source of xantophyll on hen performance and egg yolk pigmentation. PSA ’98. Annual Meeting Abstracts Pinnstater Conference Center, Inc. **Official Journal of the Poultry Science Association,** Louisville, v. 77, p. 1-18, 1998.

2. BAIÃO N. C, MENDEZ J, MATEOS J, MATEOS G. G. Influence of type and source of xanthophylls and level of use on yolk pigmentation. ANNUAL MEETING OF POULTRY SCIENCE ASSOCIATION, 85. **Inc Official Journal of the Poultry Science Association.** Louisville, v. 1, p. 84, 1996.

3. BARBOSA, T. S.; MORI, C. K.; POLÔNIO, L. B.; PONSANO, E. H. G.; CIARLINI, P. C. Perfil bioquímico sérico de galinhas poedeiras na região de Araçatuba, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1583-1588, 2011.

4. BASMACIOGLU, H.; ERGÜL, M. Research on the factors affecting cholesterol content and some other characteristics of eggs in laying hens. **Turkey Journal of Veterinary Animal Sciences,** Kirikkale, v. 9, p. 157-164. 2005.

5. BENEZ, S. M. **Aves: criação, clínica, teoria, prática: silvestres, ornamentais, avinhados.** 4. ed. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 600 p.

6. BORSA, A.; KOHAYAMA, A.; BORETTI, L. P.; SAITO, M. E.; KUIBIDA, K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industriais clinicamente saudáveis**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 675-677, 2006.

7. BRAZ, N. M.; FUENTES, M. F. F.; FREITAS, E. R.; SUCUPIRA, F. F.; MOREIRA, R. F.; LIMA, R. C. Semente residual do urucum na alimentação de poedeiras comerciais: desempenho e características dos ovos. **Acta Scientarium Animal Science**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 129-33, 2007.

8. CAMPBELL, T. W. Clinical chemistry of birds. In: THRALL, M. A. **Veterinary hematology and clinical chemistry.** Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004, p. 479-492.

9. CARBÓ, C. B. **La gallina ponedora**. Madrid. Ediciones Mundi – Prensa, 1987, 519 p.

10. CARVALHO, P. R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B; ORMENESE, R. C. S. C.; CARVALHO, P. R. N.; SIVA, M. G. Supplementation carotenoid compounds derived from seed integral ground annatto (*Bixa orellana* L.) in the feed laying hens to produce eggs special. **Pakistan Journal of Nutrition,** Faisalabad, v. 8, n. 12, p. 1906-1909, 2009.

11. CATÁLOGO RURAL 2008. In: http://www.agrov.com/vegetais/fru/urucum.htm. Acesso em: 25 nov. 2012.

12. CURVELO, E. R.; GERALDO, A.; SILVA, L. M., SANTOS, T. A.; VIEIRA FILHO, J. A.; PINTO, E. R. A.; OLIVEIRA, M. L. R.; FERREIRA, C. B. Níveis de inclusão de extrato de urucum e açafrão em dietas para poedeiras semi pesadas e seus efeitos sobre o desempenho e coloração da gema dos ovos**.** In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFMG, 2, 2009, Bambuí. **Anais...** Campus Bambuí, 2009. p. 22-24.

13. DIRECTIVA 2003/7/CE DA COMMISSION of 24 January 2003 amending the conditions for authorisation of canthaxanthin in feedingstuffs in accordance with Council Directive 70/524/EEC (Official Journal of the European Communities en 25. 01. 2003).

14. FERREIRA, A. L. A.; MACHADO, P. E. A.; MATSUBARA, L. S. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide in vitro. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 6, p. 689-694, 1999.

15. FREITAS, V. S. **Investigação do efeito citotóxico do extrato metanólico de B*ixa orellana* l. sobre células astrocíticas tumorais e astrócitos *in vitro.*** 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana). Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

16. GARCIA E. A.; MENDES A. A.; PIZZOLANTE C. C.; GONÇALVES H. C.; OLIVEIRA R. P.; SILVA M. A. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Ciência Avícola,** Campinas, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2002.

17. GARCIA, E. A.; MOLINO, A. B.; BERTO, D. A.; PELÍCIA, K.; OSERA, R. H.; FAITARONE, A. B. G. Desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais alimentadas com semente de urucum (*Bixa orellana* L.) moída na dieta. **Veterinaria e Zootecnia**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 689-697, 2009.

18. GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G. M.; COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1510-1517, 2012.

19. GASTELL, P. L. P.; ALEJO, J. L. P. Métodos para medir el daño oxidativo. **Revista Cubana Médica Militar**, Havana, v. 29, n. 3, p. 192-198, 2000.

20. GIULIANO, G.; CARLO, R.; ROSATI BRAMLEY, P. M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends in Biotechnology**, Amsterdan, v. 21, n. 12, p. 513-516, 2003.

21. GONÇALVES, F. M.; RIBEIRO, E. M.; MONTAGNER, P.; LOPES, M. S.; ANCIUTI, M. A.; GENTILINI, F. P.; DEL PINO, F. A. B.; CORRÊA, M. N. Níveis séricos de enzimas hepáticas em poedeiras comerciais no pré-pico e pico de produção de ovos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 3, p. 311-314, 2010.

22. GONZÁLES F. H. D.; SILVA S. C. In: **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS Editora, 2006, 360p.

23. HAILA, K. M.; LIEVONEN, S. M.; HEINONEN, M. I. Effects of lutein, lycopene, annatto and γ-tocopherol on autoxidation of triglycerides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 6, p. 2096-2100, 1996.

24. HANNIBAL, L.; LORQUIN, J.; D´ORTOLI, N. A.; GARCÍA, N.; CHAINTREUIL, C.; MASSON-BOIVIN, C.; DREYFUS, B.; GIRAUD, E. Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS 278. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 182; p. 3850-3853, 2000.

25. HARDER, M. N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; SAVINO, V. J. M.; COELHO, A. A. D. Efeito de B*ixa orellana* na alteração de características de ovos de galinhas. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1232-1237, 2008.

26. HARR, K. E. Clinical chemistry of companion avian species: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v. 31, n. 3, p. 140-151, 2002.

27. HAUGH, R. R. The Haugh unit for measuring egg quality. **U.S. Egg and Poultry Management**, v. 4, p. 552, 1937.

28. HERMIER, D. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 805S–808S, 1997.

29. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Roma, 2006. 104p.

30. KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 6. ed., San Diego: Academic Press, 2008, 932p.

31. KOLAKOWSKA, A. Lipid oxidation in food systems. In: SIKOSKI, Z.; KOLAKOWSKA, A. **Chemical and functional properties of food lipids**. Boca Raton: CRC Press 2003, p. 133-166.

32. LIMA, J. P.; LOPES, C. O.; DIAS, N. A. A.; PEREIRA, M. C. A. Atividade e biodisponibilidade dos carotenoides no organismo (artigo de revisão). **Revista Ciências em Saúde,** Lavras, v. 2, n. 1, p. 187.120.100.11, 2012.

33. LLOBET, J. A. C., PONTES, M. P., GONZALEZ, F. F. Factores que afectan a la calidad del huevo. In: **Producción de huevos**. Barcelona, Espanha: Tecnograf S.A., 1989. p. 255-274.

34. LOZANO-ALCÁZAR, J. Manifestaciones oftalmológicas de la terapéutica médica general. **Revista Mexicana de Oftalmologia,** Cidade do México, v. 69, n. 5, p. 171-174, 1995.

35. MACHADO, F. M. V. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; PIEDADE, S. M. S. Avaliação da disponibilidade de ferro em ovo, cenoura e couve e em suas misturas**. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 610-618, 2006.

36. MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A. M.; RUGGIERE, S.; FREGA, N.; STRABBIOLI, R.; MURCIA, M. A. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, 2001.

37. MERCADANTE, A. Z.; CAPITANI, C. D.; DECKER, E. A.; CASTRO, I. A. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, Barking, v. 84, p. 718-726. 2010..

38. OLIVEIRA, V. P. l **Composição do urucum**. 2005. Disponível em: http://www.globorural.com.br/edic./180gr responde1.htm.

39. QUEIROZ, E. A.; AGOSTINHO, T. S. P.; CALIXTO, L. F. L. Níveis de farelo de urucum (*Bixa orellana l.*) na dieta e seus efeitos sobre o desempenho e a intensidade de pigmentação da gema de ovos de poedeiras comerciais**. Avisite,** Campinas, n. 24, p. 12-14, 2010.

40. RAO, A. V.; SHEN, H. Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 22, n. 10, p. 1125-1131, 2002.

41. RIBEIRO, E. M.; GONÇALVES, F. M.; MONTAGNER, P.; LOPES, M. S.; DEL PINO, F. A. B.; ANCIUTI, M. A.; CORRÊA, M. N.; GENTILINI, F. P; PROVENCI, M.; NOVELINI, L. Níveis de proteínas plasmáticas totais, albumina e colesterol séricos em poedeiras comerciais em diferentes fases de produção de ovos. In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO. Universidade Federal de Pelotas, 2008. <http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CA/CA_01567.pdf>

42. RIOS, A. O.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 2, p. 343-350, 2009.

43. ROCHA, J. S. R. **Efeito da cantaxantina dietética para matrizes pesadas com idade avançada e do período de armazenamento dos ovos sobre a fertilidade, rendimento de incubação, nutrientes da gema e desenvolvimento embrionário**. 2011. 81 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

44. RODRÍGUEZ-ÁVILA, N. L.; NARVÁEZ-ZAPATA, J. A.; RAMÍREZ-BENÍTEZ, J. E.; AGUILAR-ESPINOSA, M. L.; RIVERA-MADRID, R. Identification and expression pattern of a new carotenoid cleavage dioxygenase gene member from *Bixa orellana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 15, p. 5385–5395, 2011.

45. ROSA, A. P.; SCHER, A.; DUARTE, V.; BOEMO, L.; VIEIRA, T. N. N.; FERREIRA JÚNIOR, J. A. G.; SORBARA, J. O. B. Suplementation of canthaxanthin to broiler breeders diet on broiler chick hatchery parameters and egg yolk TBARS. In: INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM, 2010, Atlanta. **Abstracts**… Atlanta: Georgia World Congress Center, 2010, p. 39.

46. ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELI, 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. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGENCIAS NUTRICIONAIS DE AVES E SUÍNOS, 3, 2011, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: Departamento de Zootecnia da Universidade Federal.

47. SANTANA, K. C.; GUEDES, P. A.; REBOUÇAS, T. N. H.; SÃO JOSÉ, A. R.; LEMOS, O. L.; VILA, M. T. R; SOUZA, M. J. L. Teores de bixina em urucum (*Bixaorellana*) 'Piave Vermelha', em diferentes acondicionamentos e temperaturas. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 2, n. 1, p. 19-22, 2008.

48. SCHMIDT, E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. C. Patologia clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.

49. SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição PUC**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 277-236, 2004.

50. SHEU, J.; KU, H.; TSENG, W.; CHEN, M.; TSAI, L.; HUANG, Y. Determination of thiobarbituric acid addust of malondialdehyde using online microdialysis coupled with high-performance liquid chromatography. **Analytical Sciences**, Tokio, v. 19, n. 4, p. 621-623, 2003.

51. SID, H.; FETTAH, A. Kidney damage is emerging in laying hens. **World Poultry**, Surrey, 2011. http://www.worldpoultry.net/Breeders/General /2011/4/Kidney-damage-is-emergingin-laying-hens-WP008719W/

52. SILVA, J. H. V. Efeito do extrato de urucum na pigmentação da gema de ovos. **Revista Brasileira de Zootecnia,** Viçosa, v. 29, p. 1435-1439, 2000.

53. SURAI, A. P.; SURAI, P. F.; STEINBERG, W.; WAKEMAN, W. G.; SPEAKE, B. K.; SPARKS, N. H. C. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. **British Poultry Science**, London, v. 44, p. 612-619, 2003.

# CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO COMPUTACIONAL DA COR DA GEMA: UMA OPÇÃO AO MÉTODO TRADICIONAL


## Resumo

O método do leque colorométrico (Roche®) é o ensaio tradicional utilizado na determinação da coloração das gemas dos ovos. Contudo, erros de análise são comuns uma vez que esse método depende da acuidade visual do avaliado; assim, um método computadorizado, mais barato, simples, rápido e não subjetivo para a análise da coloração das gemas é desejável. No presente estudo, realizaram-se comparações entre o método tradicional e um novo método computadorizado baseado em fotografias digitais. Assim, galinhas poedeiras marrons foram alimentadas, por 63 dias, com três diferentes tipos de ração a base de sorgo: sem pigmentante; com 3% de urucum ou com cataxantina (8 ppm) + apocaroteno (25 ppm). Os ovos foram colhidos e preparados para a análise a cada 21 dias, totalizando três períodos de amostragem. As gemas foram classificadas com base na escala do leque colorimétrico e imediatamente fotografadas para a realização das análises computadorizadas. Os resultados obtidos sugerem claramente que a intensidade da coloração das gemas (amarela ou amarela-alaranjada) foi determinada com maior precisão pelo método computadorizado quando comparado ao ensaio colorimétrico tradicional.


**Palavras-chaves:** análise colorimétrica, coloração das gemas, leque colorimétrico,


## Abstract

The colorimetric fan method (Roche®) is the traditional assay used to determine the yolk egg color. However, errors are common since the method depends on the visual acuity of the referee; thus, the use of a cheaper, simple, fast and nonsubjective computerized method to analyze the egg color is desired. In the present study comparison between the traditional method and a new computerized assay based on digital pictures was conducted. Therefore, laying hens of the *ISA Brown* lineage were fed, during 63 days, with three different sorghum meal: without dye; with bran annatto (3%); or with cathaxanthin (8 ppm) + apocaroten (25 ppm). Eggs were collected and prepared for yolks analysis every 21 days, i.e.,

three sampling in total. The yolks were classified based on the colorimetric fan scale and immediately photographed and analyzed by the computerized assay. The results clearly suggest that yolks color (yellow and orange-yellow) intensity was more accurately determined by the computerized methods when compared to the traditional colorimetric fan assay.

**Key worlds:** color analysis, color fan, yolk pigments.

## 3.1 Introdução

A cor não é um fenômeno físico, é luz e sensação. Um mesmo comprimento de onda pode ser percebido diversamente por diferentes pessoas, ou seja, a cor é um fenômeno fisiológico, de caráter subjetivo e individual (LIMA, 2007).

O olho humano consegue discernir aproximadamente 10 milhões de cores (MARTINS, 2010), enquanto que um computador digital, que usa 8 *bits* para cada canal de cor, é capaz de representar mais de 16 milhões de cores diferentes. Isto porque, num computador, cada ponto da imagem (*pixel*) é representado por um conjunto de três canais (vermelho, verde e azul) e cada um desses canais é capaz de exibir 256 intensidades diferentes. Essa forma de representar a cor é chamada de sistema de cores RGB (*red, green, blue*). Dessa forma, combinando as intensidades dos três canais RGB, é então possível exibir quase 17 milhões de cores. *Bit* é a menor unidade de informação que pode ser armazenada ou transmitida na comunicação de dados usada na computação e informática. Pixel é o menor componente que forma uma imagem digital e o conjunto de pixels forma a imagem inteira (GONZALEZ & WOODS, 2010).

Entre os diversos atributos sensoriais dos produtos de origem animal, a cor da gema, está diretamente relacionada à qualidade, exercendo papel importante na aceitação do produto pelos consumidores (PEREIRA, 2001; TOCCHINI & MERCADANTE, 2001). Portanto a qualidade dos ovos, entre outros fatores, depende da composição da dieta oferecida à galinha. Os aditivos podem ser incluídos na dieta com o intuito de melhorar a qualidade do ovo, aumentar a

venda ou reduzir os custos da produção. Por esse motivo, os aditivos mais utilizados são os corantes (QUEIROZ et al., 2010).

A coloração da gema do ovo se deve à deposição de xantofilas, um grupo de carotenóides oxigenados, que podem ser encontrados de forma natural no milho amarelo (GARCIA et al., 2002). O uso de substitutos do milho, pobres em xantofilas, exige a adição de pigmentantes naturais ou sintéticos na ração. O substituto mais utilizado é o sorgo com baixo tanino, que pode substituir parcial ou totalmente o milho, na ração para galinhas em fase de postura. A substituição é economicamente viável, não interfere nos índices zootécnicos, mas produz gemas esbranquiçadas (MOURA et al., 2011).

A determinação da cor da gema é utilizada na avaliação da qualidade física do ovo. A técnica tradicional consiste na colocação da gema sobre um fundo preto ou branco, seguida da comparação da sua cor com as do leque colorimétrico Roche®. A tonalidade é expressa em uma escala graduada (escores) de 1 a 15, que corresponde à gradação de cores que vai do amarelo claro ao alaranjado (LLOBET et al., 1989). É uma avaliação subjetiva, uma vez que depende da acuidade visual do indivíduo que está realizando a leitura, o que reduz a exatidão da avaliação da cor conferida pelo pigmentante em teste. Segundo MENDES (2010), a exigência do mercado brasileiro para cor da gema, está entre o número 9 e 10 do leque para ovos comuns; entre 11 e 12 para marcas de grandes redes de supermercados e, maior do que 12, para ovos de qualidade superior. CARBÓ (1987) relatou que para a avaliação mais precisa da cor da gema existem outros métodos colorimétricos menos práticos e econômicos que o leque, uma vez que requerem aparelhagens específicas de alto custo. Para preencher essa lacuna, seria importante o desenvolvimento de um novo método simples, objetivo e de baixo custo para avaliar a cor da gema obtida com o uso de pigmentantes adicionados à ração de poedeiras.

Objetivou-se com esse trabalho comparar dois métodos de classificação da intensidade da cor da gema de ovos de poedeiras vermelhas comerciais, um subjetivo (leque colorimétrico ROCHE®), dependente da acuidade visual do pesquisador e outro objetivo (computacional).

## 3.2 Material e métodos

O estudo foi uma parceria entre a Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus de Goiânia e a Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A etapa experimental com as aves foi realizada na Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG. As gemas analisadas foram obtidas de ovos de 108 galinhas poedeiras da Linhagem Isa Brown, doadas pela Granja Bom Princípio Avicultura Ltda. As aves apresentaram desempenho padrão da linhagem para a idade e foram alimentadas com três tipos de ração á base de sorgo:

Grupo 1: ração basal (controle);

Grupo 2: ração basal com adição de 3% de farelo de urucum;

Grupo 3: ração basal contendo 8 ppm de cantaxantina + 25 ppm de apocaroteno.

Ao longo do estudo foram acompanhados três ciclos de postura (21 dias cada). Os ovos produzidos nos três últimos dias de cada ciclo, totalizando 54 ovos, foram colhidos e avaliados quanto à qualidade física externa. Em seguida foram quebrados para a avaliação interna, que foi finalizada com a determinação da cor da gema.

### 3.2.1 Avaliação tradicional da cor das gemas

As gemas foram, inicialmente, classificadas pelo método tradicional, utilizando o leque colorimétrico (Figura 1), cuja escala de valores vai de um a 15, sendo um para amarelo bem claro e 15 para alaranjado. O ovo foi quebrado cuidadosamente para não comprometer a integridade da gema. A gema foi colocada sobre uma superfície lisa e preta, e a comparação foi feita aproximando o leque da gema e classificando a cor de acordo com a numeração mais provável. Todas as avaliações foram feitas pelo mesmo indivíduo, no mesmo local e com iluminação controlada.

### 3.2.2 Avaliação computadorizada da cor das gemas

As fotos para a análise computadorizada das gemas foram realizadas imediatamente após a análise pelo leque colorimétrico, sob as mesmas condições de iluminação. Foi utilizada uma máquina digital, Kodak Easy Share de 12 megapixels, M530. A câmera foi fixada em hastes para que não houvesse

interferência do fotógrafo. As gemas foram colocadas sobre um fundo azul (Figura 2), para gerar maior contraste, uma vez que o azul e o amarelo são cores opostas (WARE, 2013)

FIGURA 1 - Avaliação tradicional da cor das gemas utilizando o leque colorimétrico ROCHE®

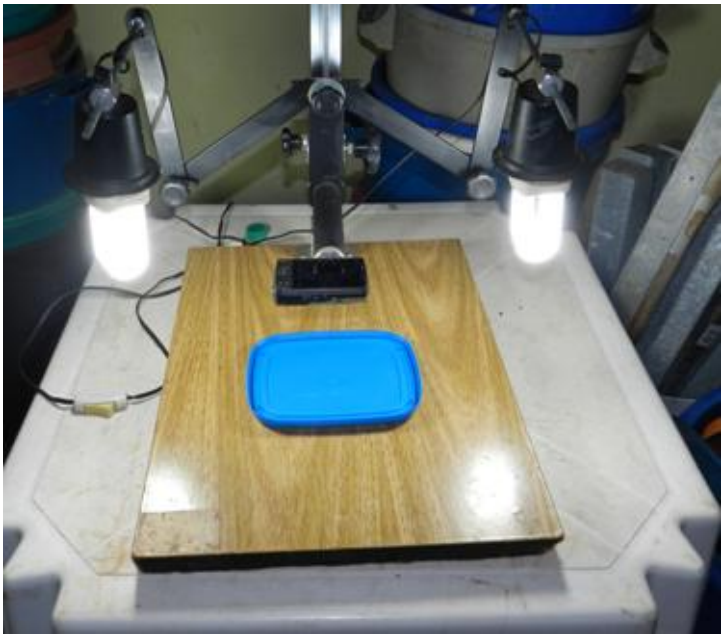

FIGURA 2 - Aparato para fotografar as gemas

As fotos das gemas foram analisadas por meio de um software desenvolvido na Faculdade de Computação da Universidade Federal de Uberlândia (em publicação). O software utiliza diversas rotinas de processamento de imagens (GONZALEZ & WOODS 2010), reconhecimentos de padrões (DUDA et al., 2001; COSTA & CESAR JR., 2009) e visualização computacional (SCHROEDER, 1998; WARE, 2013). Por meio da combinação dessas técnicas, foi feita a identificação da localização da gema na foto. O esquema indicando as etapas para a definição da cor da gema está apresentado na figura 3. Uma vez fotografada a gema (Figura 3a), foi definida a sua região central (Figura 3b). Essa região foi subdividida em três partes iguais, sendo considerada somente a parte central para a análise de cor. A partir dos pixels que compuseram a parte central da gema foi quantificada a sua cor. Vale lembrar que um pixel é composto por três canais de cores (RGB - vermelho, verde e azul). Dessa forma, para quantificar a cor média de uma região da imagem, pode-se calcular, separadamente, a médias das intensidades nos canais vermelho, verde e azul.

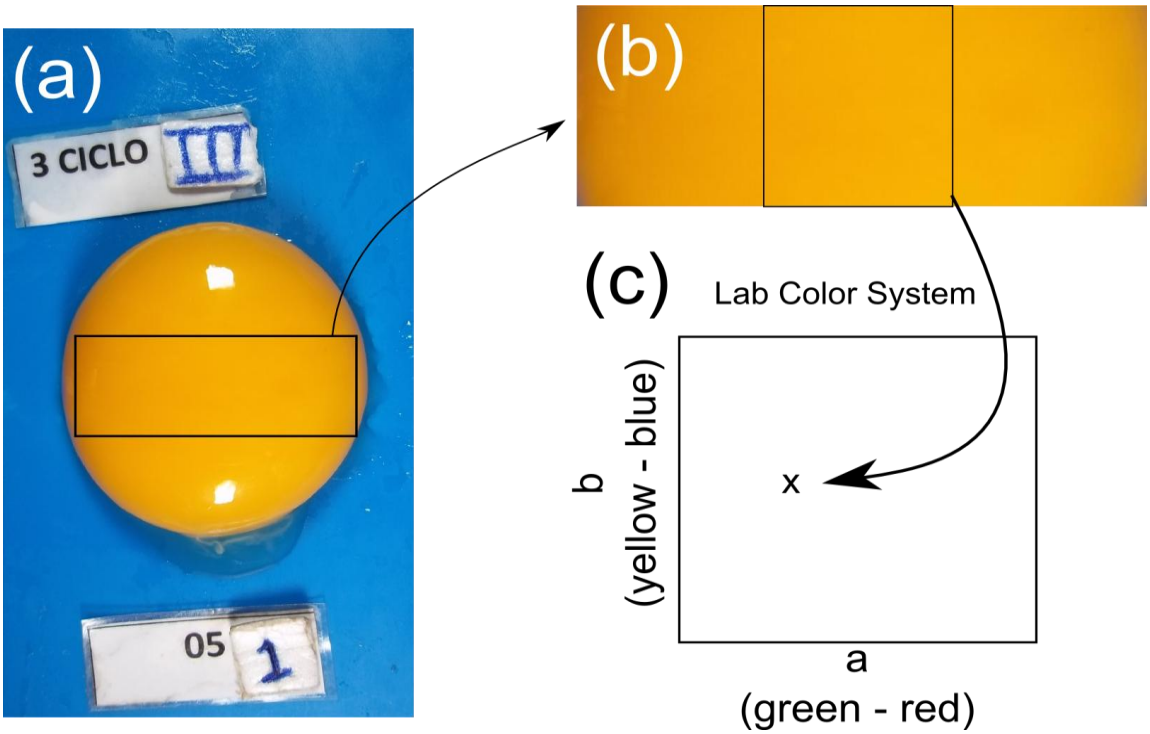


FIGURA 3 – Esquema indicando as etapas para a definição da cor da gema. A) Foto da gema. B) Região central da gema do ovo identificada automaticamente pelo software de processamento de imagens. C) Mapeamento da cor média do centro da gema para o sistema de cores Lab.

Assim, para quantificar a cor de uma gema, foi calculada a média da cor dos seus pixels utilizando o sistema de cores Lab. O componente L da cor foi ignorado, pois ele indica somente a luminância. Dessa forma, cada gema foi associada a uma posição no espaço, formado pelos canais a e b, como ilustrado na figura 3c.

Após a determinação da cor média de cada gema baseando-se no sistema de cores Lab, o software determinou qual o escore que a gema possuia em relação ao leque colorimétrico. Para isso, foi necessário obter uma foto do leque utilizando a mesma câmera usada na obtenção das fotos das gemas (Figura 4a). Essa foto foi então recortada, para que restasse somente a ponta do leque (Figura 4b). Esse processo foi realizado porque a região central do leque apresentou muita reflexão especular e também intersecções entre os diferentes escores.

Em seguida, para cada escore do leque colorimétrico, foi determinada a distribuição espacial das cores dos seus pixels segundo o sistema de cores Lab, (descartando o canal L). Na figura 4c está representado o resultado obtido considerando os 15 diferentes escores. Por fim, cada distribuição de escore foi convoluída com uma máscara Gaussiana (COSTA & CESAR JR., 2009), a fim de estimar a probabilidade de cada escore. Isso resultou na distribuição apresentada na figura 4d, onde cada região do espaço '*a-b*' está mapeada e relacionada a um escore do leque, que indicou a cor da gema.

Dessa forma, para classificar a cor de uma gema, determinou-se a cor média em termos dos canais *a* e *b* (Figura 3c) e consultou-se o diagrama da figura 4d para estabelecer a qual escore do leque a gema pertenceu (para isso, verificou-se qual a cor no diagrama estava associada às coordenadas *a* e *b* da gema). Com isso, essa análise atribuiu automaticamente para cada gema um escore de coloração referente ao leque colorimétrico. Vale observar que, como na ração do grupo controle não havia nenhum tipo de corante, várias gemas oriundas desse grupo apresentaram cor esbranquiçada, não sendo classificada no colorímetro. Nesse caso, atribuiu-se o valor 0 (zero) como escore de coloração para essas gemas.

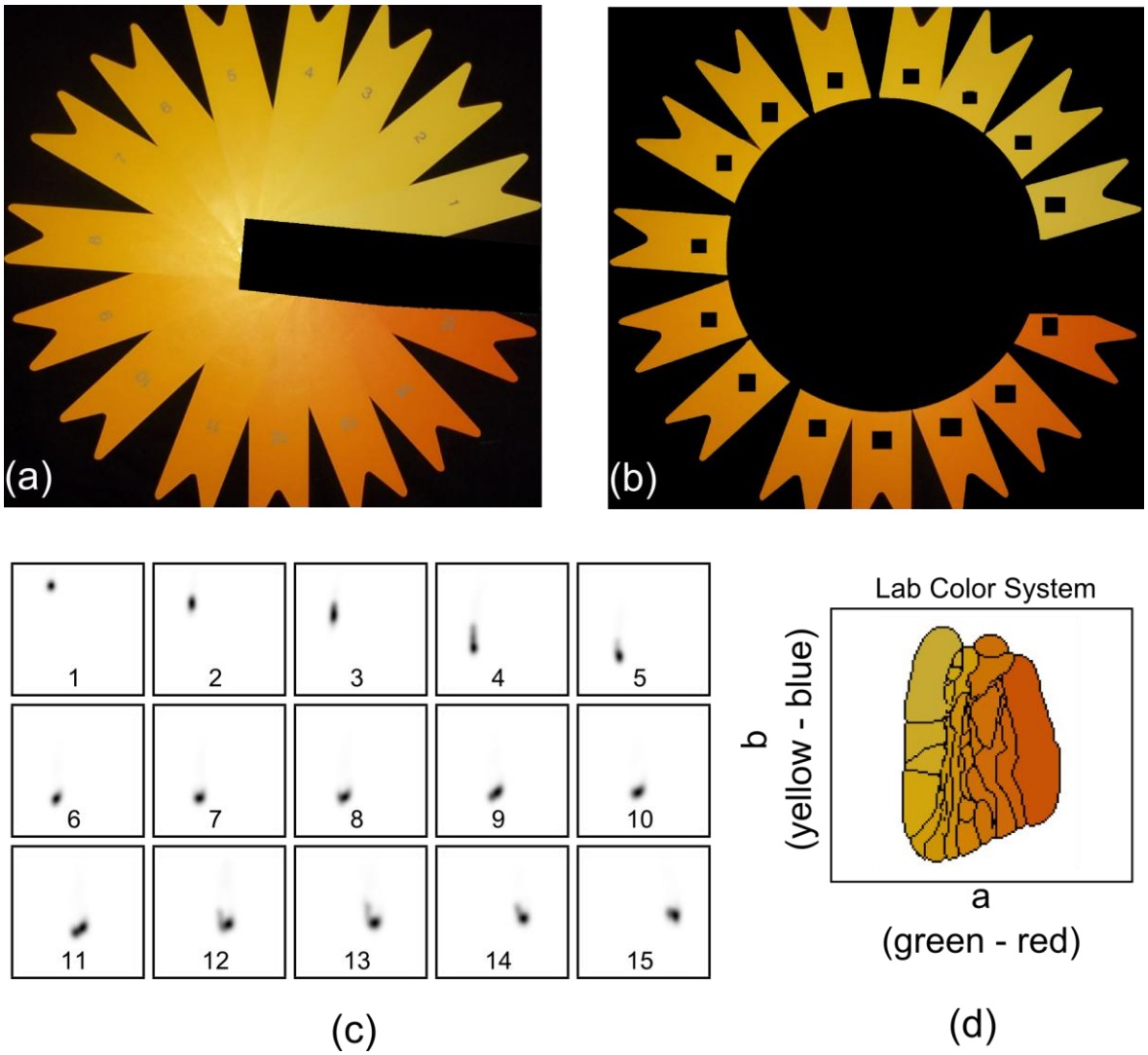


FIGURA 4 - A) Foto do leque colorimétrico obtida com a mesma câmera usada nas coletas das imagens das gemas. B) Seleção das partes do leque que foram passadas ao software para determinação da cor média de cada parte do leque. C) Distribuição das intensidades dos pixels de cada escore do leque colorimétrico no sistema de cores Lab (eixo horizontal – canal *a*; eixo vertical – canal *b*). É possível notar que cada escore está distribuído em uma região diferente dos eixos (*a*-*b*). D) Junção de todas as distribuições de escores após a convolução com uma máscara Gaussiana, formando um mapa de escores baseado nas coordenadas *a* e *b*.

3.2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos no escore de cores foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

## 3.3 Resultados

Os escores médios de cor obtidos nos métodos, tradicional e computadorizado, estão demonstrados na tabela 1.

TABELA 1 - Mediana dos escores para cor da gema avaliados pelo leque colorimétrico (método manual) e pelo computador (método automático)

| Tipo de avaliação\ Tratamento | Controle | Carotenóide natural[1] | Carotenóides sintéticos[2] |
|---|---|---|---|
| Manual | 0,23[a] | 2,83[a] | 11,12[b] |
| Automático | 1,25[a] | 3,24[b] | 7,71[c] |

Letras minúsculas diferentes na mesma linha tem p≤0,05 pelo teste de Kruskal-Wallis
[1]Urucum
[2]Cantaxantina + apocaroteno

Na avaliação visual foi possível observar que a gema apresentou coloração esbranquiçada quando a ração não continha nenhum pigmentante, amarela quando a ração continha farelo de urucum e alaranjada na ração com cantaxantina + apocaroteno (Figura 5).

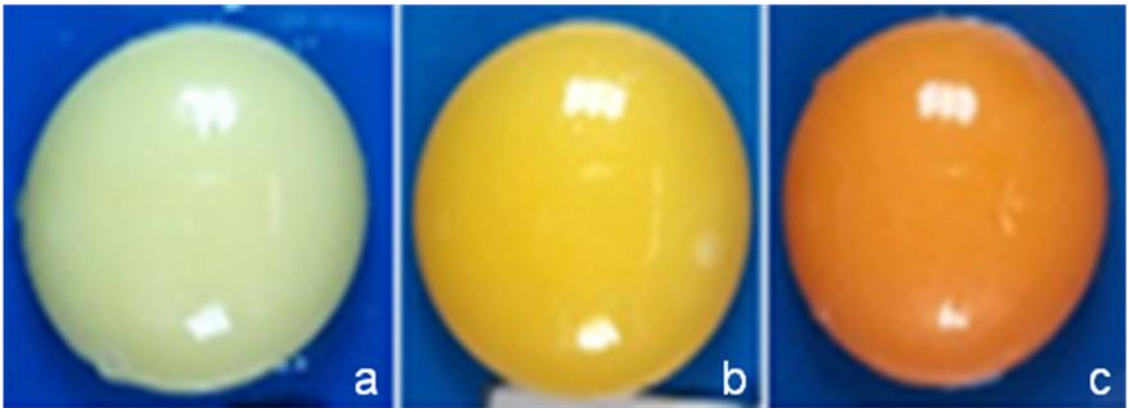


FIGURA 5 – Fotografias digitais das gemas de acordo com os tratamentos: (a) controle, (b) ração com farelo de urucum e (c) ração com cantaxantina + apocaroteno

Comparando, a pele da canela e o tecido adiposo intra-abdominal, das aves alimentadas com ração sem pigmentante e as alimentadas com ração contendo farelo de urucum ou mistura de cantaxantina + apocaroteno, observou-se que tanto a pele quanto o tecido adiposo, das que receberam ração controle, estavam bastante esbranquiçados, o que não foi observado naquelas alimentadas com ração adicionada de pigmentante, que permaneceram amarelos (Figura 6).

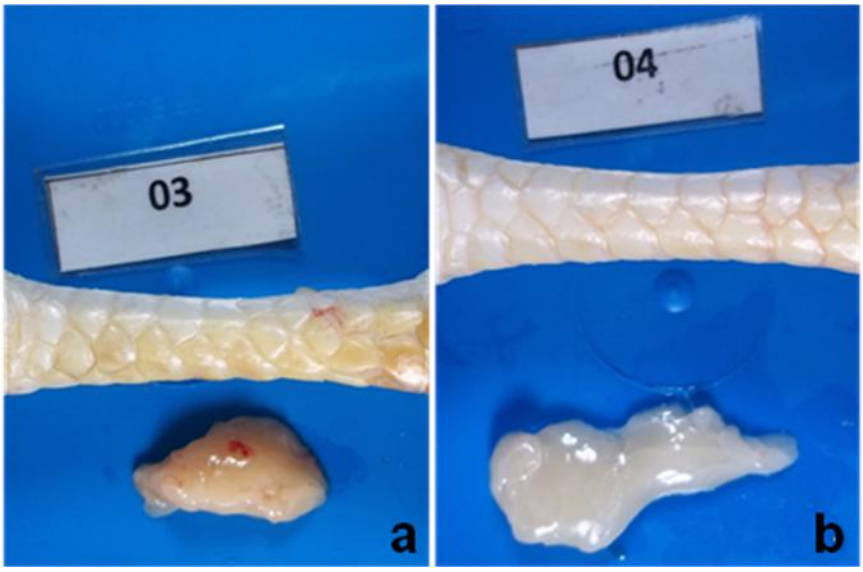


FIGURA 6 - Canela e tecido adiposo das aves. A) Alimentadas com ração contendo pigmentante B) Alimentadas com ração sem pigmentante

Na Figura 7 (a, b, c) está representado o histograma da classificação subjetiva, indicando a quantidade de gemas que foram classificadas para cada valor do leque colorimétrico. Nesse caso, obteve-se média próxima de zero para as aves alimentadas com ração sem corante, em torno de sete para as aves alimentadas com ração adicionada de farelo de urucum e próxima de 11 com a adição de cantaxantina + apocaroteno. Na classificação manual nenhuma gema contendo urucum foi classificada entre zero e quatro, enquanto que no grupo controle houve somente classificação menor ou igual a um. Na classificação automática também foi constatado que a adição de pigmentantes alterou a cor das gemas (Figura 7d, 7e, 7f). Foram encontrados valores médios próximos a um

para o grupo controle, três para o farelo de urucum e oito para a cantaxantina + apocaroteno.

A diferença da coloração da gema entre o método automático e o manual foi calculada, para cada gema, utilizando a diferença absoluta entre o escore obtido automaticamente e o escore manual. Quando comparados os dois métodos percebeu-se que a classificação manual foi mais uniforme do que a automática. Por exemplo, com a ração contendo farelo de urucum, a classificação manual variou entre cinco e nove (Figura 7b), enquanto que a automática ficou entre um e sete, com picos em um, três e quatro (Figura 7e).

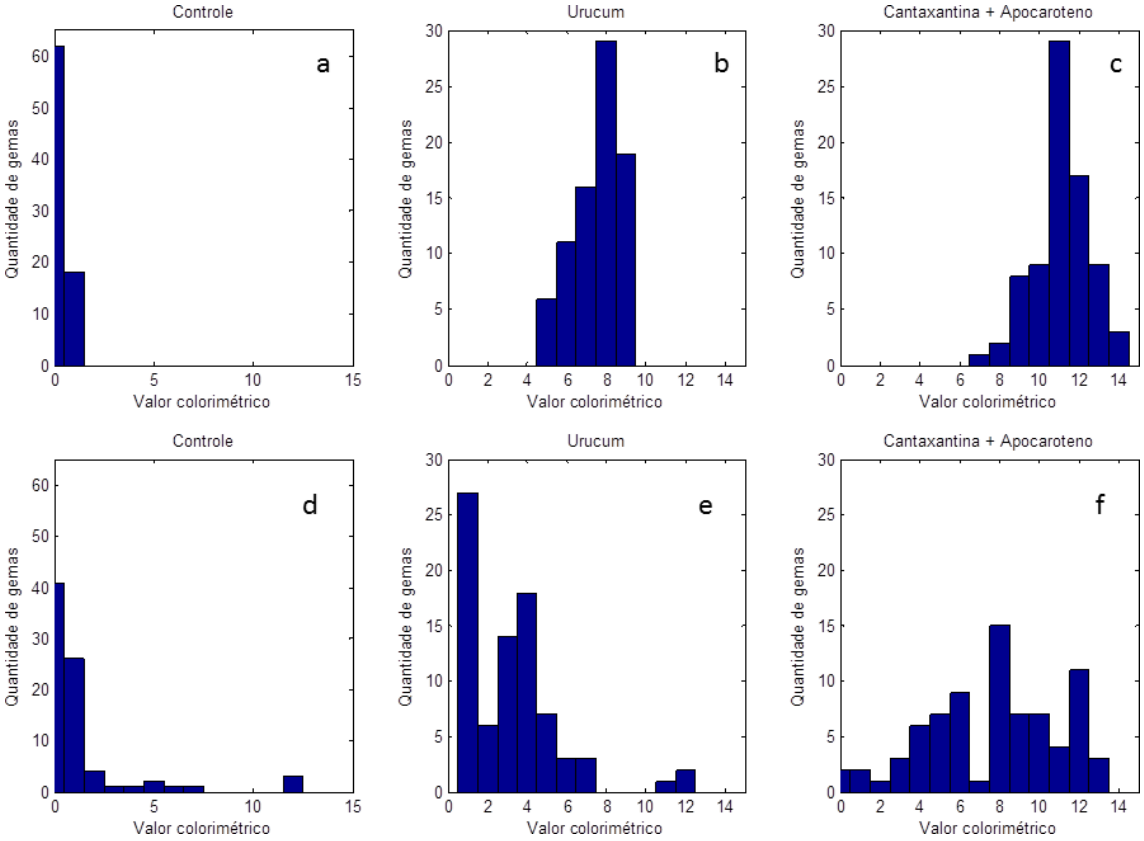


FIGURA 7 - Distribuição do escore de coloração (valor colorimétrico definido pelo leque Roche®) de acordo com a alimentação. Nos controles a barra do zero vai até 60. Histogramas obtidos a partir da classificação manual (a, b, c) e histogramas obtidos a partir da classificação automática (d, e, f)

Observando o mapa de erro entre os dois tipo de classificação é possível perceber que foram atribuídos às gemas, no método manual, números maiores que os do método automático. Também foi possível notar que as duas

classificações foram mais próximas para valores de maior escore de cor (acima de 10), ou seja, não houve diferença acentuada entre as duas classificação, nas gemas mais coradas (Figura 8).

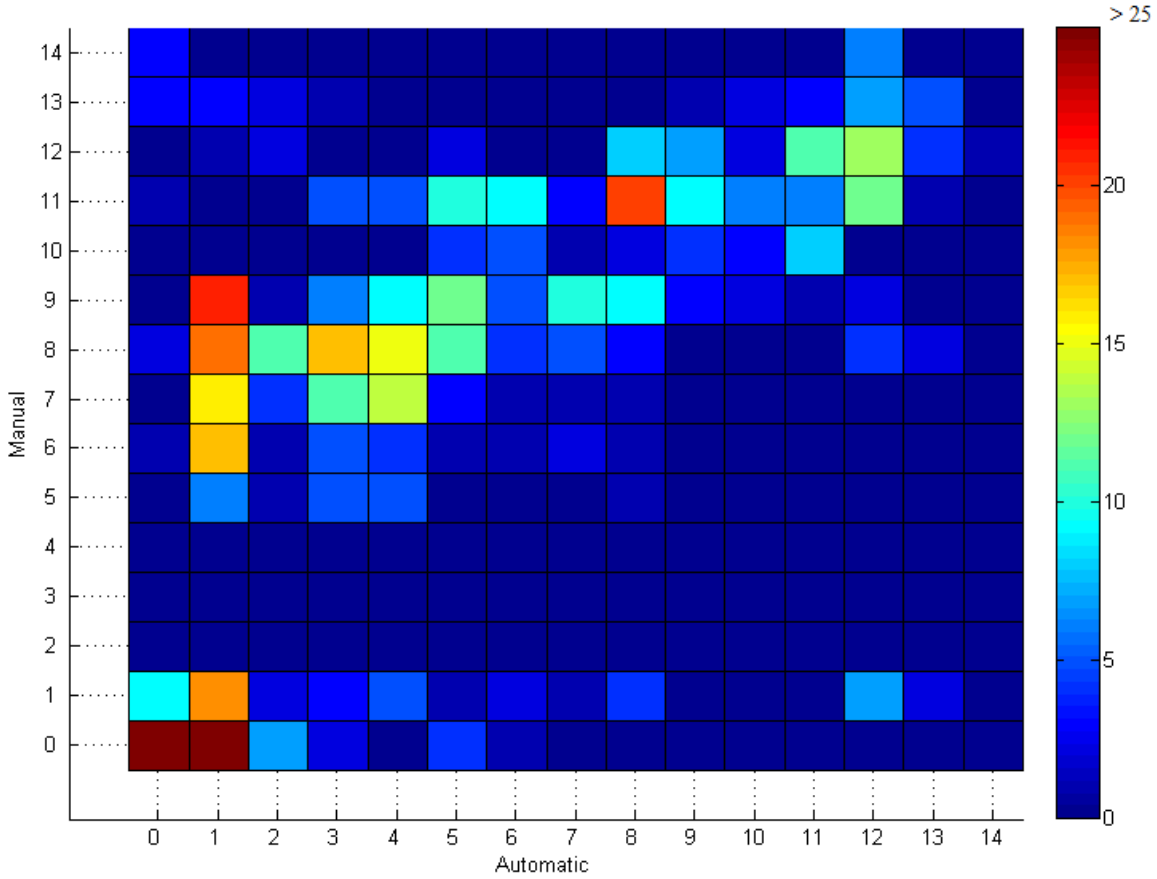


FIGURA 8 - Mapa de erro entre a classificação de cor da gema pelo método automático e manual. Em geral, a cor da gema dada utilizando o leque é maior do que a fornecida pelo computador. Esta divergência tende a diminuir nas gemas de coloração mais alaranjada

Na figura 9a está representada a distribuição espacial de todas as gemas analisadas pelo sistema de cores Lab (WARE, 2013). Nessa plotagem, o eixo x é a variação em “a” do Lab e o eixo y corresponde ao “b”. A componente L foi ignorada, pois ela quantifica a luminância (brilho) da foto e o interesse está restrito a cromaticidade (a cor efetiva da gema e do colorímetro). Cada esfera na imagem representou uma gema e a cor indicada representou a cor média obtida a partir dos pixels da imagem original da gema. É possível observar nessa imagem

duas regiões; uma na parte inferior, onde se concentraram as gemas de cor mais próxima ao branco e uma na parte superior, onde se concentraram as gemas com diferentes tons de amarelo. Nessa última região é possível fazer uma distinção entre tons de amarelo localizado mais a esquerda e os tons alaranjados localizados mais à direita.

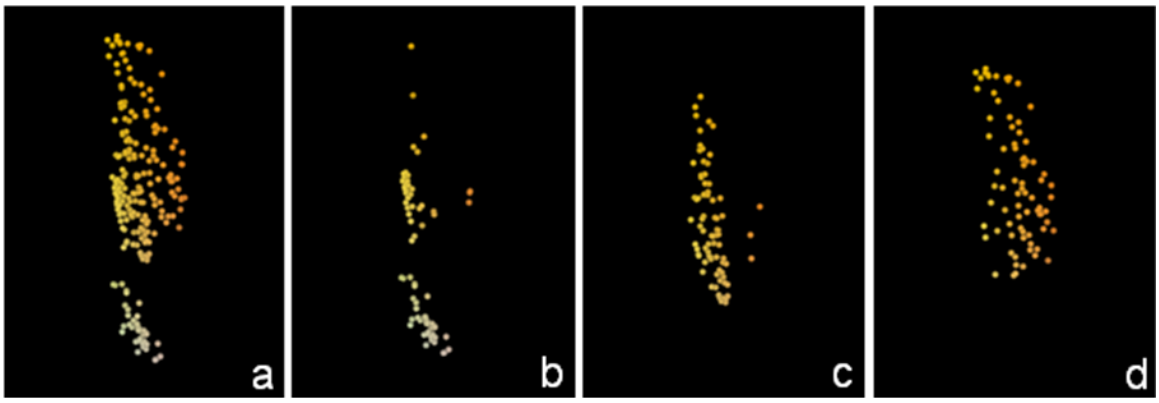


FIGURA 9 - Distribuição espacial das cores das gemas no sistema de cores Lab. A) Disposição das gemas de acordo com a dieta utilizada na alimentação das aves. Na parte inferior se concentram as gemas esbranquiçadas, na parte superior esquerda as amarelas e na superior direita as alaranjadas. B) Gemas de ração controle. C) Gemas de ração com farelo de urucum. D) Gemas de ração com cantaxantina + apocaroteno

Com o sistema Lab foi possível a visualização da distribuição cromática das gemas nos diferentes tratamentos. Aquelas obtidas de galinhas que receberam ração sem pigmentante permaneceram na parte inferior da foto (Figura 9b), as que receberam ração contendo urucum se concentraram no lado superior esquerdo (Figura 9c) e as da ração que continha cantaxantina + apocaroteno se deslocaram para a parte superior direita (Figura 9d).

### 3.4 Discussão

Neste estudo o sistema automático de quantificação da cor da gema utilizou às médias obtidas a partir da cor dos seus pixels, empregando o sistema de cores *Lab*. A representação de cores por meio de canais RGB, apesar de ser

muito eficiente para representar uma imagem para ser exibida em um monitor, nem sempre é adequada para o trabalho com rotinas de processamento de imagens. Existe, na literatura, a descrição de vários outros sistemas de cores que funcionam melhor com rotinas de processamento automático de imagens. Um desses sistemas é o *Lab* (WARE, 2013).

Independente do método de avaliação utilizado, manual ou automático, observou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$), na cor das gemas, na dependência da ração fornecida (Tabela 1), demonstrando com isso, que o tipo de pigmentante adicionado à ração interfere na coloração da gema, assim como a ausência de pigmentante na ração, deixa a gema descorada.

A identificação da cor da gema com o programa computadorizado de análise de fotos foi mais precisa do que com o leque colorimétrico. A homogeneidade do gráfico feito com o método subjetivo e que não existe no gráfico feito com o computador, sugere avaliação tendenciosa do indivíduo, que ao observar a gema a olho nu, pode inferir qual a ração aquela ave estava recebendo. Além disso, diferente do computador, o avaliador pode não ter sido capaz de distinguir entre as tonalidades mais claras de amarelo. Por mais precisa que seja a visão humana, existem algumas variáveis que afetam a percepção, como a menor sensibilidade do olho para determinadas cores e, ainda, o cansaço visual decorrente de tempos prolongados de observação (MELCHIADES & BOSCHI, 1999).

Observando a distribuição das gemas do tratamento controle foi possível perceber que se formaram dois grupos principais, um de gemas sem tons de amarelo e outras amareladas (Figura 9). Esse resultado mostrou que apesar de não haver corantes na ração das galinhas desse grupo, algumas delas ainda conseguiram transferir carotenoides de algumas regiões do corpo (pele e tecido adiposo) para as gemas. Esse fato fica bem evidente quando se compara a pele e a gordura intra-abdominal das aves que receberam ração contendo pigmentante com aquelas que receberam ração sem pigmentante (Figura 6).

Na comparação do processo de classificação automático com o manual, esse último classificou aproximadamente 70% das amostras (ração

controle) como zero e o restante como um. Já a classificação automática distribuiu melhor a classificação das amostras, mantendo a grande maioria como zero, mas também identificando diferentes tons de amarelo, e até alaranjado (duas gemas). Foi possível perceber que, de fato, existem diferentes tons de amarelo para as amostras controle, indicando que o método de classificação automático foi mais preciso que o manual.

A análise do grupo que teve o urucum adicionado à ração mostrou que essas gemas apresentaram o tom amarelo como dominante, variando do amarelo claro a tons mais saturados. Apenas três gemas apresentaram tons alaranjados. A predominância de gemas amarelas foi condizente com o esperado, pois da forma como foi construído o colorímetro, os tons de amarelo entre um e seis podem ser considerados tons de diferentes saturações. A partir do número sete percebem-se alterações na cromaticidade, onde tons de vermelho são adicionados à pigmentação amarela (amarelo + vermelho = amarelo alaranjado). Dessa forma, parece ser mais plausível a classificação obtida pelo método automático, onde as galinhas alimentadas com urucum produziram ovos na cor amarela, com diferentes saturações.

Saturação é a intensidade da cor, isto é, a saturação é o que permite a distinção entre uma cor forte e uma fraca (PEDROSA, 1978). Na análise de distribuição das gemas que receberam mistura de cantaxantina + apocaroteno notou-se que não há uma concentração específica em uma faixa de cores, havendo gemas em tons amarelos e alaranjados. Como o pigmentante utilizado é uma mistura de vermelho (cantaxantina) com amarelo (apocaroteno), a mistura dos ingredientes da ração pode não ter sido homogênea, de modo que algumas aves ingeriram maior quantidade de um determinado pigmentante em relação a outra. Esse fato não foi detectado na classificação manual, pois nessa foi encontrado somente valores acima de seis enquanto que nas amostras avaliadas pelo método automático, um grupo de gemas foi classificado entre os valores zero e sete do colorímetro enquanto o outro grupo ficou na faixa de oito a 14.

## 3.5 Conclusão

A técnica computadorizada que identifica a cor da gema por meio da análise de fotos digitais é mais precisa na determinação da intensidade da cor do que a classificação subjetiva feita com o leque colorimétrico.

## Referencias

1. CARBÓ, C. B. **La gallina ponedora**. Madrid. Ediciones Mundi – Prensa, 1987, 519 p.

2. COSTA, L. F; CESAR J. R., R. **Shape classification and analysis: theory and practice**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2009, 653 p.

3. DUDA, R. O.; HART, P. E.; STORK, D. G. **Pattern classification**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons. 2001, 637 p.

4. GARCIA E. A.; MENDES A. A.; PIZZOLANTE C. C.; GONÇALVES H. C.; OLIVEIRA R. P.; SILVA M. A. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Ciência Avícola,** Campinas, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2002.

5. GONZALEZ, R.; WOODS, R. **Processamento de imagens digitais**. 3 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2010. 510 p.

6. LIMA, L. S. **O uso das cores na arquitetura e na cidade**: **Caso especial do bairro paulistano de Vila Madalena**. 2007.63 f. Dissertação (Mestrado em Arquitetura e Urbanismo) – Escola de Arquitetura, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.

7. LLOBET, J. A. C., PONTES, M. P., GONZALEZ, F. F. Factores que afectan a la calidad del huevo. In: **Producción de huevos**. Barcelona, Espanha: Tecnograf, 1989. p. 255-274.

8. MARTINS, N. **Fotografia - da analógica à digital**. Senac Nacional: Rio de Janeiro, 2010. 280 p.

9. MELCHIADES, F. G.; BOSCHI, A. O. Cores e tonalidades em revestimentos cerâmicos. **Cerâmica Industrial**. São Paulo, v. 4, p. 11-18, 1999.

10. MENDES, F. R.; ANDRADE, M. A.; CAFÉ, M. B.; SANTOS, J. S.; LACERDA, M. J. R.; STRINGHINI, J. H.; STRINGHINI, M. L.; LEANDRO, N. S. M. Physical and chemical quality of sanitized commercial eggs experimentally contaminated with *Pseudomonas aeruginosa* and refrigerated during storage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 10. p. 211- 2218, 2012.

11. MOURA, A. M. A.; TAKATA, F. N.; RODRIGUES DO NASCIMENTO, G.; SILVA, A. F.; MELO, T. V.; CECON, P. R. Pigmentantes naturais em rações à base de sorgo para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 11, p. 2443-2449, 2011.

12. PEDROSA, I. **Da cor à cor inexistente**. 3.ed., Brasilia: Universidade de Brasilia, 1978, 219 p.

13. PEREIRA, A. V. Bixina como agente pigmentantes das gemas de ovos de poedeiras comerciais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/SBZ, 2001. P. 839-840.

14. QUEIROZ, E. A.; AGOSTINHO, T. S. P.; CALIXTO, L. F. L. Níveis de farelo de urucum (*Bixa orellana l.*) na dieta e seus efeitos sobre o desempenho e a intensidade de pigmentação da gema de ovos de poedeiras comerciais**. Avisite,** Campinas, n. 24, p. 12-14, 2010.

15. SCHROEDER, W.; MARTIN, K. M.; LORENSEN, W. E. **The visualization toolkit**. An object-oriented approach to 3D graphics. 2. ed.: Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1998.

16. TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação por CLAE de bixina e norbixina em colorífico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, p. 310-313, 2001.

17. WARE, C. **Information visualization: perception for design**. 3.ed. San Francisco: Morgan Kaufmann, 2013. 486 p.

# CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estes três anos e meio de doutorado estão entre as maiores experiências da minha vida, pois não me proporcionaram somente o aumento do conhecimento acadêmico, mas também uma significativa reavaliação da carreira de docente e da vida.

Foi um desafio assistir aula, fazer provas e apresentar seminários como uma jovem recém-graduada e reaprender técnicas de laboratório há muito esquecidas, além de atualizar conhecimentos adquiridos há muitos anos atrás.

Porém o mais interessante foi a execução do trabalho propriamente dito. Durante a docência não existe tempo para lidar diretamente com os animais da pesquisa, ou fazer as coletas e os testes laboratoriais, por isto delega-se esta função aos orientados, esquecendo-se do quanto estes afazeres são prazerosos, apesar de desgastantes.

Tudo começou com a obtenção das galinhas. Foram mais de oito meses para conseguir a doação de poedeiras na idade certa; ou eram oferecidas pintinhas de um dia, o que não resolvia o problema, pois seria necessário conseguir ração para alimenta-las até o pico de postura, ou eram oferecidas aves idosas, em segundo ou terceiro ciclo de postura, que também não serviam ao propósito do estudo. Afinal conseguiu-se a doação de 120 aves com 17 semanas de idade. Também foi necessária atenção integral a saúde, alimentação e postura das aves, pois ocorreram vários fatos inesperados. Por exemplo, antes do inicio do experimento as galinhas pararam de botar, sendo necessário investigar a razão junto com os pós-graduandos que auxiliavam na execução do projeto, para que o problema pudesse ser solucionado. Da mesma forma, em um determinado momento da adaptação todas as aves foram infestadas por piolho. A solução foi dar banho em cada uma com inseticida (120 galinhas grandes e pesadas), além de dedetizar todo o aviário.

As dificuldades estavam sempre presentes, mas o prazer de supera-las e conseguir atingir o objetivo proposto sempre foram muito recompensadores.

Tudo o que foi vivido neste período permitiu perceber que ainda existe muito a ser oferecido aos alunos e à Universidade.

Considerando os resultados obtidos fica a sugestão de que a adição de farelo de urucum ou mistura de cantaxantina + apocaroteno à ração de aves, não seja restringida somente à intensificação da cor da gema, mas que outras concentrações sejam avaliadas, buscando aquela capaz de reduzir o estresse oxidativo nas poedeiras comerciais, assim como nos ovos selecionados para incubação, com o intuito de aumentar o desempenho das aves e o índice de eclosão e a sobrevivência dos pintos.

Também seria interessante testar outras proporções entre a cantaxantina e o apocaroteno, aumentando ou reduzindo a concentração de cada um dos pigmentantes na mistura, de forma que a gema ficasse mais amarelada ou mais alaranjada, de acordo com a preferência do consumidor. Essa alteração nas concentrações dos pigmentantes pode também trazer benefícios econômicos, já que os dois corantes têm custos diferentes.

Seria importante ainda determinar a quantidade exata de bixina e norbixina contidas no farelo de urucum comercial, além de determinar a $DL_{50}$ do farelo de urucum e da mistura de cantaxantina+apocaroteno em galinhas poedeiras.

Existe, também, a necessidade de desenvolver uma forma de utilizar a técnica automática de detecção da cor da gema, para facilitar uma classificação precisa e rápida, dos ovos, na própria granja.