

Atividades iniciais para validação de método analítico para quantificação de betacaroteno no colostro de vacas¹

*Aloysio João Fellet Neto*²

*Isis Reigosa*³

*Antonio Maurício Tannure*³

*Danielle dos Santos Cinelli Pinto*⁴

*Juliana Carine Gern*⁵

*Marcelo Porto Bemquerer*⁵

*Michelle Daiane de Almeida Loures*⁶

Humberto de Mello Brandão^{5,7}

Resumo: Os carotenoides, mais especificamente o betacaroteno, são de suma importância para todos os animais. Isso porque, esses compostos são precursores da vitamina A ou apenas provitamina A, ou seja, será originada vitamina A partir da síntese desses carotenoides, vitamina esta, que possui grande relevância. Tomando por base o que foi citado, a quantificação dos carotenoides se torna uma importante avaliação, para poder identificar a concentração dos mesmos, de modo a aferir se o indivíduo está sofrendo um déficit ou não, e caso haja baixas concentrações, adotar as devidas estratégias de correção, para que não ocorra nenhum tipo de prejuízo em longo prazo ao animal. Contudo, o principal meio para coleta de amostra para quantificação dos carotenoides ainda é por meio da coleta de sangue, o que gera estresse e desconforto ao animal e, com isso, novas alternativas para a coleta vem sendo pesquisadas com o intuito de prover bem estar ao animal.

Palavras-chave: betacaroteno, vitamina A, quantificação, bem-estar

Initial activities for validating an analytical method for quantification of beta-carotene in colostrum of cows

Abstract: Carotenoids, more specifically beta-carotene, are of paramount importance for all animals. This is because these compounds are precursors of vitamin A or just provitamin A, that is, vitamin A will be originated from the synthesis of these carotenoids, a vitamin that has great relevance. Based on what has been mentioned, the quantification of carotenoids becomes an important evaluation, in order to identify their concentration, in order to assess whether the individual is suffering from a deficit or not, and if there are low concentrations, adopt the appropriate correction strategies, so that there is no long-term damage to the animal. However, the main way to collect samples for the quantification of carotenoids is still through blood collection, which causes stress and discomfort to the animal, and with that, new alternatives for collection have been researched in order to provide animal welfare.

Keywords: beta-carotene, vitamin A, quantification, animal welfare

¹ O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil: (a) Parte do projeto "Atividades iniciais para validação do método analítico para quantificação de carotenoides no colostro de vacas", liderado por Humberto de Mello Brandão; (b) Parte da tese de doutorado do segundo autor, financiada pela Embrapa.

² Graduando em Medicina Veterinária - UFJF. e-mail: aloysiofellet@gmail.com

³ Farmacêutico, Programa de Pós-Graduação CiPharma – UFOP. e-mail: isis.r@outlook.com

⁴ Médica-veterinária, Programa de Pós-Graduação Ciências Veterinárias - UFLA

⁵ Pesquisador, Embrapa Gado de Leite - Bolsista do CNPq. e-mail: humberto.brandao@embrapa.br, marcelo.bemquerer@embrapa.br.

⁶ Analista, Embrapa Gado de Leite. e-mail: michelle.loures@embrapa.br.

⁷ Orientador

Introdução

O betacaroteno é um carotenoide precursor da vitamina A (provitamina A), podendo ser encontrado, por exemplo, em vegetais de folhas verdes. Do ponto de vista fisiológico, em mamíferos, a vitamina A possui grande importância, haja vista que esta molécula participa em diversas etapas de bioquímicas de distintos tipos celulares. Como consequência, a deficiência desta vitamina pode gerar disfunções da atividade reprodutiva dos animais; da acuidade visual, principalmente quando a incidência de luz é menor; do desenvolvimento do sistema nervoso; e desenvolvimento embrionário. Adicionalmente, a vitamina A também desempenha papel relevante na imunidade e diferenciação celular, aumentando a capacidade de resposta de mecanismos de defesa das células do sistema imune, bem como contribuindo para plena diferenciação de células epiteliais (EL BEITUNE *et al.*, 2003). Assim, no que tange saúde animal, mensurar a quantidade plasmática de betacaroteno é clinicamente relevante para auxiliar no diagnóstico causal tanto de doenças quanto de quedas de produção em bovinos leiteiros. Contudo, o principal meio de estimativa desta vitamina se dá por venopunção e sua quantificação no soro.

Por outro lado, nos dias atuais, questões relacionadas ao bem-estar animal estão ganhando importância junto ao consumidor de leite e derivados. Com isso, práticas de manejo que minimizem o estresse animal, seja pela contenção ou pelo ato de promover a venopunção são uma tendência em sistemas de produção de leite modernos. Assim, buscar alternativas para estimar de forma indireta a concentração de betacaroteno plasmático podem contribuir de forma positiva para o bem-estar animal em fazendas de produção de leite. Especificamente a quantificação de betacaroteno em colostro pode ser utilizada para esta finalidade, isso porque o betacaroteno é uma molécula lipofílica que é facilmente excretada em sua gordura.

Dentro deste contexto, o objetivo do presente estudo é realizar as atividades iniciais do processo de validação de um método analítico para quantificação de betacarotenoides na matriz biológica colostro bovino. Tal atividade, por questões de disponibilidade e custo, está sendo realizada de forma precedente às etapas de espectrometria de massas.

Material e Métodos

Foram coletadas quatro amostras de colostro do quarto dianteiro direito em diferentes tubos Falcon (50mL): Jatos iniciais (JI); Jatos médios (JM); Jatos finais (JF); Misturado (MI); Foram realizados três ciclos de congelamento e descongelamento, das quatro amostras, em triplicata, a fim de quantificar o betacaroteno no colostro, em comprimento de onda de 450 nanômetros (nm), seguindo o procedimento conforme descrito por GENTILI *et al.* (2013) e STOUT *et al.* (2018), conforme segue.

Os betacarotenoides totais foram extraídos seguindo os procedimentos:

- Adição de 3 mL de colostro + 9 mL álcool etílico com 0,1% (p/v) de BHT + 1,5 mL de solução de saponificação contendo 25% KOH + água deionizada;
- Sonicação por 5 min e estabilização em temperatura de 40°C por 30 min;
- Adição de 6 mL de hexano: acetato de etila (70:30) e homogeneização em vórtex;
- Ressonância por 5 min seguida de centrifugação a 800 x g por 10 min a 25°C;
- Recuperação e separação da fase orgânica (sobrenadante), seguida da adição de 3 mL de solução hexano: acetato de etila (70:30), seguida de agitação sonicação e centrifugação (conforme parâmetros acima)

A determinação da quantidade de carotenoides foi realizada de forma direta no sobrenadante, com o auxílio em leitora de microplacas para leitura em comprimento de onda de 450 nanômetros. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Resultados e Discussão

A partir das análises realizadas, foi identificado que o terço final da ordenha do colostro apresenta uma concentração estimada de carotenoides total cerca de 6,38% superior ao terço inicial da ordenha. Tal condição pode ser explicada pelo fato de o betacaroteno apresentar alta lipofilicidade em função de seu logP de 14,62 (PubChem), o que favorece seu acúmulo na gordura do colostro. Em função disso, seu acúmulo pode ser favorecido no terço final da ordenha, uma vez que esta é mais rica em gordura quando comparada com o terço inicial (GENTILI *et al.*, 2013).

Por sua vez, o processo de estocagem/congelamento da amostra seguida de degelo pode levar a uma grande redução na quantidade total de carotenoides (Tabela 1).

Tabela 1. Ciclos de descongelamento de colostro

	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
	UA*	UA*	UA*
Jl	0,94	0,83	0,65
JM	0,96	0,84	0,63
JF	1	0,82	0,57
MI	0,97	0,84	0,22

*Valores ajustados para Unidade Arbitrária (U.A.), onde 1 U.A. equivale a 2,374 (JF do ciclo 1)

Ao se ampliar os ciclos de congelamento/descongelamento as perdas de carotenoides se acentuam com o avanço no número de ciclos e ficam mais intensas após o terceiro ciclo. Tal resultado sugere que tanto o transporte de amostras congeladas (evitar o descongelamento), quanto sua estocagem em propriedades rurais devem ser alvo de controle de processo, isso porque a frequente instabilidade de rede elétrica rural brasileira pode promover o degelo, ou mesmo para transporte de amostras congelamentos das amostras. Apesar de não ter sido estudado o mecanismo de tal variação pode ser explicada pela degradação do analito, cuja principal forma de degradação pode ocorrer por oxidação, seja pela presença de luz ou oxigênio. Contudo uma eventual falha no processo de extração não pode ser descartada, haja vista que o maior número de ciclos de congelamento pode gerar a precipitação mais acentuada da micela de caseína e, com isso, “aprisionar” os glóbulos de gordura.

Conclusões

Com base nos estudos e nos resultados obtidos, e tendo em vista o objetivo proposto, conclui-se que os o número de ciclos de congelamentos/descongelamentos do amostra podem influenciar nos resultados analíticos e que para reduzir a variação de resultados quantitativos nas próximas etapas do experimentos deve-se utilizar para análise o jato final

da ordenha do colostro.

Agradecimentos

Às agências de fomento: FAPEMIG (CVZ-PPM-00691/17) e CNPq processo 313757/2019; DSM.

Referências

EL BEITUNE, P., DUARTE, G., NUNES DE MORAIS, E., QUINTANA, S. M., & VANNUCCHI, H. Deficiência da vitamina A e associações clínicas: revisão. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.53, p. 355-363, 2003.

GENTILI, A., CARETTI, F., BELLANTE, S., VENTURA, S., CANEPARI, S., CURINI, R. Comprehensive profiling of carotenoids and fat-soluble vitamins in milk from different animal species by LC-DAD-MS/MS hyphenation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1628-1639, 2013.

STOUT, M. A., BENOIST, D. M., DRAKE, M. A. Simultaneous carotenoid and vitamin analysis of milk from total mixed ration-fed cows optimized for xanthophyll detection. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 4906-4913, 2018.