MAXI CHICK

ROVIMIX® MaxiChick™

Más y mejores pollitos

ROVIMIX® MaxiChick™ está recomendado para la fase completa de producción. Maximiza el efecto de los nutrientes en el pienso de los reproductores:

- ✔ Más huevos incubables
- ✔ Mejora la fertilidad y la supervivencia del embrión
- ✔ Mejora la calidad del pollito de un día

DSM Nutritional Products Iberia, S.A.
C/ Honduras - P. 26A
28806 Alcalá de Henares - Madrid
Tel. +34 91 104 55 00
Nutricion-animal.madrid@dsm.com
www.dsmnutritionalproducts.com

HEALTH · NUTRITION · MATERIALS

DSM
BRIGHT SCIENCE. BRIGHTER LIVING.

Un nuevo test rápido para la cuantificación de los carotenoides totales en la yema de huevo(*)

FLORIAN J. SCHWEIGERT[1], ANDREA HURTINNE[1], RALF MOTHES[2] y JOSEPH SCHIERLE[3]

1. Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Nutritional Science, University of Potsdam, Arthur-Scheunert-Allee 114-116; Potsdam-Rehbrücke, Alemania.

2. BioAnalyt GmbH, Rheinstr. 17, Teltow, Alemania.

3. DSM Nutritional Products Ltd., R&D, Analytical Research Center, Kaiseraugst, Suiza

Los carotenoides son ingredientes esenciales en la alimentación animal, tanto por su función pigmentaria como por su papel en la promoción de la salud, ya que presentan propiedades antioxidantes y son precursores de la vitamina A -Schweigert, 1998-. El color de la yema del huevo, un factor cultural diferencial en las preferencias de los consumidores, sólo puede ser controlado mediante el manejo del contenido en carotenoides en el alimento de las gallinas.

El método más simple de estimación del contenido de carotenoides de la yema es una valoración visual. Así, el Abanico de Color de Yema de DSM –"DSM-YCF"- se ha convertido en el instrumento más comúnmente utilizado para determinar el color del huevo. Sin embargo, este método sólo otorga información del color, pero no del contenido de carotenoides.

Para este segundo fin se han desarrollado diferentes métodos químicos de cuantificación en el huevo, tanto de carotenoides totales como individuales. De estos, el método más sencillo es la determinación espectroscópica de los carotenoides totales como equivalentes del ß-caroteno -AOAC, 1958, 1973-. Luego, para determinar la concentración de carotenoides individuales, estos deben ser previamente separados por cromatografía líquida de alta presión –HPLC- (Hamilton, 1992).

Tanto la HPLC como las determinaciones espectroscópicas necesitan de un laboratorio con un equipo técnico sofisticado, por lo que DSM ha querido desarrollar un nuevo sistema de determinación de los carotenoides totales en el huevo y sus productos, rápido, fácil de realizar y que no requiera de tal equipamiento. Este tan solo necesita de un espectrofotómetro portátil, fácil de manejar, y una unidad analítica descartable. A continuación se describe el nuevo sistema y se exponen los resultados de las mediciones realizadas con dicho sistema y los métodos de referencia de la AOAC -Association of Official Analytical Chemists- y por HPLC.

El metodo iEx/iCheck® consiste en una unidad de extracción y medición, el iEx(TM), y en un fotómetro manual a batería, el iCheck(TM): 400 mg de yema de huevo se diluyen a un peso final de 2 g con una dilución tampón utilizando una balanza incluida en el kit, inyectándose luego 400 µl de dicha dilución en un vial de extracción para agitarlos vigorosamente durante 10 segundos, y dejarlos en reposo para una completa separación de fase durante al menos 5 minutos. Así se extraen completamente todos los carotenoides presentes en la muestra hacia la fase orgánica superior para la medición de su concentración en el fotómetro portátil.

Para la comparación de medidas se tomaron huevos de un mercado local y se separó la yema, que fue homogeneizada y dividida en partes iguales para cada huevo para ser sometida a los distintos métodos de análisis -el iEx/iCheck®, el de referencia de la AOAC-. Para la comparación con HPLC se alimentó a gallinas ponedoras con dietas de concentraciones variadas y combinaciones de apoester (etil-β-apo-8'-carotenoato, CAROPHYLL® Amarillo 10%), cantaxantina (CAROPHYLL® Rojo 10%) y extractos de Marigold en base a los carotenoides luteína y zeaxantina. Para cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones con 12 aves cada uno y se tomaron cuatro yemas de cada repetición.

(*) Publicado en XIII Conferencia Europea de Avicultura. Tours, agosto 2010.

Artículo patrocinado por

DSM
BRIGHT SCIENCE. BRIGHTER LIVING.

Tabla 1. Comparación de niveles de carotenoides totales (mg/kg yema de huevo) medidos con el nuevo método y con el método AOAC estándar.

Grupo	iCheck	AOAC%	% iCheck de AOAC
1	22,01±2,82	22,73 ± 3,30	97,2 ± 4,7
2	25,62 ± 6,78	26,45 ± 6,99	96,8 ± 3,0
3	22,88 ± 4,23	22,08 ± 3,68	103,5 ± 6,0
4	15,27 ± 5,47	16,40 ± 5,42	92,5 ± 5,2
5	30,84 ± 3,18	31,43 ± 4,17	98,5 ± 5,0
Promedio	23,28 ± 6,73	23,77 ± 6,77	97,7 ± 5,8

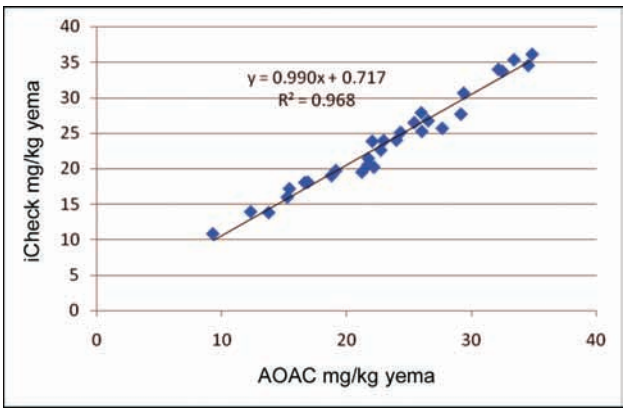

Fig. 1. Correlación de los resultados de carotenoides totales con el nuevo método y el método AOAC estándar.

Los resultados se analizaron estadísticamente por distintos métodos: la correlación de los resultados obtenidos se realizó utilizando análisis estadístico regresivo y el grado de concordancia entre los dos métodos se evaluó mediante diagrama de cajas –«plots»- de diferencias de Bland-Altman. El intervalo de confianza se fijó en el 95%.

La Tabla 1 muestra los resultados para cinco grupos diferentes con cinco muestras cada uno, del nuevo sistema comparándolo con el de la AOAC. Estos resultados indican que no existe una diferencia significativa entre los dos métodos utilizados. Para los carotenoides totales las correlaciones fueron superiores a 0,98.

El test de Bland-Altman reveló para los grupos individuales que ambos métodos estaban en buena concordancia, sin un sesgo real para la medición de carotenoides totales -figura 2-. En base a 5 determinaciones de cada muestra se calculó el coeficiente de variación –CV- intra-individual para cada método. De promedio, el CV estuvo en un orden de magnitud generalmente aceptado para un análisis de este tipo. Con 2,3% contra 3,5%, el CV fue mayor para el método de referencia de la AOAC que con el nuevo método.

La tabla 2 muestra una comparación del contenido de carotenoide medido por HPLC con la medición realizada con iCheck en yemas de huevos que contenían cantidades crecientes del carotenoide amarillo apoester, además de algunas trazas de luteína y zeaxantina. El iCheck encontró contenidos mayores de carotenoides totales en comparación con el método HPLC. Esta sobrestimación dependió de la cantidad de muestra extraída.

Las concentraciones bajas de apoester -hasta 10 ppm- fueron claramente sobrestimadas por el método iCheck cuando se extraían de muestras de hasta 0,4 g. Esta sobrestimación puede reducirse a menos de un 10% cuando se extraen de muestras de 0,8 g. Para concentraciones de apoester de entre 15 y 300 ppm la sobrestimación con iCheck fue de menos del 10% cuando se utilizó un tamaño de muestra de 0,4 g -para muestras con menos de 100 ppm de carotenoides totales- y de 0,2 g (para muestras de más de 100 ppm de carotenoides totales).

Cuando la yema contenía principalmente cantaxantina, además de cantidades menores de los carotenoides amarillos luteína y zeaxantina, el método iCheck tendió a subestimar el contenido de carotenoides totales comparado con el método HPLC -tabla 3-. Esta subestimación era esperable ya que la cantaxantina es un pigmento rojizo con una absorción máxima de aproximadamente 466 nm, cuando el nuevo método trabaja a una longitud de onda de 450 nm.

Cuando las concentraciones totales de carotenoides eran muy bajas -menores a 10 ppm- la subestimación fue más pronunciada para muestras de 0,8 g que para las de 0,4 g. Esta observación sugiere que el efecto de subestimación debido a una longitud de onda no ideal resultó en una sobrestimación debido a la limitada linealidad del ensayo a concentraciones tan bajas.

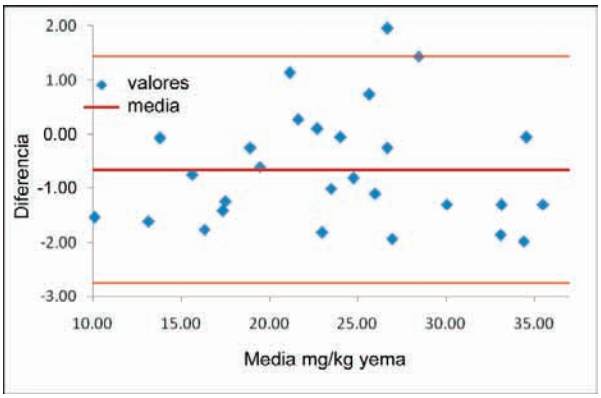

Fig. 2. Análisis de Bland-Altman de los niveles de carotenoides totales de la yema dehuevo determinados con el nuevo método (iCheck) comparado con el método estándar AOAC.

Tabla 2. Comparación del contenido de carotenoides totales (TCA: sus siglas en inglés) encontrados por HPLC e iCheck en yemas de huevo conteniendo apoester y luteína zeaxantina en varias concentraciones.

Contenido Carotenoides Medido por HPLC (mg/kg)				Porciones Muestras iCheck (g)							
				0,8	0,4	0,2	0,1	0,8	0,4	0,2	0,1
LUT	ZEA	APO	TCA	TCA encontrado por iCheck (mg/kg)				Desviación iCheck – HPLC para TCA (%)			
0,90	0,09	-	1,41	1,43	2,63			1,8	87		
0,94	0,11	2,99	4,33	4,66	5,95			7,5	38		
0,97	0,11	8,32	9,73	10,1	11,2			3,9	15		
1,01	0,11	16,7	18,2		19,6				7,7		
1,09	0,12	35,7	37,4		39,4				5,4		
1,09	0,13	71,1	72,9		77,1	75,8			5,8	3,9	
1,10	0,13	136	138			144				4,0	
1,13	0,14	271	273			300	303			9,6	11

LUT = luteína, ZEA = zeaxantina, APO = apoester, CAN = cantaxantina, TCA = carotenoide total, En caso de HPLC, TCA se determinó como la suma de los carotenoides mencionados y no identificados (contenidos no expuestos), Para comparación con iCheck, los datos de HPLC se fijaron al 100%, Los contenidos mostrados son los promedios de 4 extracciones independientes y medidas HPLC, para TCA (%)

Este hallazgo posee más un interés académico que una importancia práctica ya que la cantaxantina y otros carotenoides rojos son generalmente provistos en el alimento en combinación con carotenoides amarillos para obtener un color de yema aceptable.

En aquellas yemas con combinaciones variadas de cantaxantina y apoester, el análisis por iCheck de las yemas de huevo difirió en un 12% con los resultados del método HPLC -Tabla 3-. En concordancia con lo expuesto, las mezclas de carotenoide con altas concentraciones de cantaxantina y baja contribución de carotenoide amarillo tendieron a ser subestimadas, mientras que aquellas con concentraciones más altas de apoester fueron sobrestimadas por el método iCheck.

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos para aquellas yemas de huevo que principalmente contienen luteína, xantofila y zeaxantina en concentraciones que varían desde aproximadamente 10 hasta 100 ppm. En

Tabla 3. Comparación del contenido de carotenoides totales (TCA) encontrados por HPLC yiCheck en yemas de huevo de los grupos tratamiento P – X con cantaxantina y mezclas variadas de apoester y cantaxantina.

Contenido Carotenoides Medido por HPLC (mg/kg)					Porciones Muestras iCheck (g)					
					0,8	0,4	0,2	0,8	0,4	0,2
LUT	ZEA	APO	CAN	TCA	TCA encontrado por iCheck (mg/kg)			Desviación iCheck – HPLC para TCA (%)		
1,03	0,12		5,28	6,88	5,17	6,81		-25	-0,6	
1,06	0,12		20,1	22,4	15,9	17,8		-29	-21	
0,93	0,11	6,97	2,08	10,4	10,4	11,7		0,3	12	
1,17	0,12	8,96	5,68	16,4		16,4			0,4	
0,11	0,13	8,79	10,2	20,9		19,8			-5,3	
1,16	0,13	17,9	17,0	37,3		33,9			-9,1	
1,09	0,15	16,5	19,7	38,8		35,4			-8,5	
1,01	0,13	131	4,58	137			146			6,0
1,13	0,16	139	14,7	156			163			4,6

LUT = luteína, ZEA = zeaxantina, APO = apoester, CAN = cantaxantina, TCA = carotenoide total, En caso de HPLC, TCA se determinó como la suma de los carotenoides mencionados y no identificados (contenidos no expuestos), Para comparación con iCheck, los datos de HPLC se fijaron al 100%, Los contenidos mostrados son los promedios de 4 extracciones independientes y medidas HPLC, para TCA (%)

Tabla 4, Comparación del contenido de carotenoide total (TCA) encontrado por HPLC yiCHeck en yemas de huevo de los grupos tratamiento Y – AB con concentraciones varias de Tagetes xanthophylls.

Contenido Carotenoide Medido por HPLC (mg/kg)			Porciones Muestra iCheck (g)					
LUT	ZEA	TCA	0,8	0,4	0,2	0,8	0,4	0,2
			TCA encontrado por iCheck (mg/kg)			Desviación Check – HPLC (mg/kg) por TCA (%)		
6,18	0,46	8,86	6,88	9,30		-22	5,0	
6,80	0,54	9,73	8,24	9,37		-15	3,7	
5,93	0,42	8,05	6,88	9,60		-19	19	
5,99	0,44	8,51	7,74	8,18		-9,1	-3,9	
6,23	0,47	8,79	7,43	9,11		-15	4,2	
21,9	1,87	30,9		27,9			-9,7	
22,6	1,69	30,6		29,0			-5,3	
24,6	1,73	32,6		29,4			-10	
22,9	1,82	32,3		31,8			-1,5	
23,0	1,78	31,6		29,5			-6,7	
50,8	4,05	69,7		58,6	60,2		-16	-14
50,0	3,77	69,2		60,4	64,0		-13	-8
49,0	3,96	68,0		58,7	62,7		-14	-8
43,0	3,58	60,1		52,2	50,8		-13	-16
48,2	3,84	66,8		57,5	59,4		-13	-11
75,6	6,01	109		111	109		1,5	0,2
72,0	5,50	104		92,7	93,8		-11	-9,5
72,3	5,71	102		90,9	96,8		-11	-5,1
75,1	5,73	106		92,3	99,2		-13	-6,7
73,8	5,74	105		96,6	99,8		-5,3	-8,3

LUT = luteína, ZEA = zeaxantina, APO = apoester, CAN = cantaxantina, TCA = carotenoide total, En caso de HPLC, TCA se determinó como la suma de los carotenoides mencionados y no identificados (contenidos no expuestos), Para comparación con iCheck, los datos de HPLC se fijaron al 100%, Los contenidos mostrados son los promedios de 4 extracciones independientes y medidas HPLC, para TCA (%)

estos casos el ensayo de iCheck encontró hasta un 15% menos de contenido de carotenoide total. Para aquellas yemas de huevo con concentraciones más altas a 10 ppm no hubo un efecto significativo del tamaño de la muestra (0,2-0,4g), pero a concentraciones más bajas, la extracción de 0,8 g de yema de huevo ocasionó una mayor subestimación -alrededor del 15%- comparado con la extracción de 0,4 g. Esto puede indicar que a bajas concentraciones en la solución medidora la subestimación ocurrió por un defecto de linealidad.

En conclusión, la comparación del nuevo ensayo iCheck para el análisis de carotenoides totales en la yema de huevo demostró una concordancia excelente con el método AOAC estándar. Esto era esperable ya que ambos métodos utilizan la absorción total de todos los carotenoides presentes en la yema de huevo y se basan en la calibración con β-caroteno como estándar externo. Sin embargo, los resultados del iCheck también concordaron bien -en un rango del 15% de discordancia- con los contenidos de carotenoide total medidos por HPLC en un amplio rango de concentraciones y combinaciones de carotenoides. Esto debe remarcarse ya que los resultados de HPLC derivan de una cuantificación diferente, basada en la suma de mediciones específicas separadas.

Considerando el tiempo necesario y el equipamiento técnico, este innovador sistema de extracción en un paso es superior a los métodos tradicionales, teniendo en cuenta la facilidad de su aplicación, ya que otorga resultados comparables a otros métodos estándar. Su calidad analítica se encuentra en excelente concordancia con los análisis de laboratorio por el método estándar de la AOAC y en una concordancia aceptable con la HPLC. Además de su facilidad de utilización y sensibilidad analítica, este sistema es ecológicamente superior a los métodos utilizados previamente. También el reducido tamaño de su presentación reduce considerablemente la exposición del personal de laboratorio a solventes orgánicos potencialmente peligrosos.

Referencias

(Se enviarán a quienes las soliciten).

DSM BRIGHT SCIENCE. BRIGHTER LIVING.