UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
ÁREA DE BROMATOLOGIA

**ANÁLISE DE VITAMINAS DO COMPLEXO
B EM CARNES PREPARADAS EM
SERVIÇO DE ALIMENTAÇÃO**

HELENA MARIA PINHEIRO SANT'ANA

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

**ORIENTADORA: PROF^a TIT. MARILENE DE VUONO CAMARGO
PENTEADO**

SÃO PAULO - SP

1998

HELENA MARIA PINHEIRO SANT'ANA

**ANÁLISE DE VITAMINAS DO COMPLEXO B EM CARNES
PREPARADAS EM SERVIÇO DE ALIMENTAÇÃO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Profª Tit. Marilene De Vuono Camargo Penteado
Presidente e Orientadora

Prof. Tit. Sebastião César Cardoso Brandão
1º Examinador

Profª Dra. Helena Teixeira Godoy
2º Examinador

Profª Dra. Úrsula Maria Lanfer Marquez
3º Examinador

Profª Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
4º Examinador

São Paulo, 20 de março de 1998.

A DEUS,
fonte de toda bondade e sabedoria.

Ao meu pai José Leles,
pelo exemplo de trabalho e coragem,
pelo amor e incentivo em todas as etapas da minha vida.

Ao meu marido Lúcio,
pelo incentivo, paciência, amor e companheirismo.

Aos nossos filhos Larissa e Jader,
razão maior da nossa luta.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profª Dra. Marilene De Vuono Camargo Penteado, pela orientação, pelo apoio e incentivo, pela compreensão e amizade, pela atenção e agilidade, especialmente durante as etapas de redação desta tese.

Ao Prof. Dr. Sebastião César Cardoso Brandão (UFV - Viçosa), pela atenção constante, pelas orientações na parte experimental, pelas sugestões na redação e por colocar à disposição seu Laboratório para realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo César Stringheta (UFV - Viçosa), pelo exemplo de otimismo, pelo incentivo e amizade e por abrir as portas de seu Laboratório para realização de parte deste trabalho.

À ENGEFOOD, na pessoa de seu diretor José Carlos Dias Reis, pela prontidão e gentileza em nos ceder como empréstimo o forno combinado Rational, sem o que não seria possível a preparação das carnes para esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me apoiou com amor e paciência em todos os momentos.

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pela oportunidade de realização deste curso.

À Prof^a Dra. Úrsula Lanfer Marquez e ao Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno, pelas valiosas sugestões apresentadas na redação desta tese.

Aos funcionários do Restaurante Universitário da Universidade Federal de Viçosa, pela atenção, prontidão e colaboração na etapa experimental.

Ao Prof. Dr. José Benício Paes Chaves (UFV - Viçosa), pelo exemplo de profissionalismo e contribuição ímpar na análise estatística dos resultados.

À Magda Rios e à Inês, do Laboratório de Análise de Alimentos, por toda atenção, colaboração e amizade durante a etapa prática deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Nutrição e Saúde (UFV - Viçosa), pelo apoio e pela colaboração durante mais esta etapa.

À Elaine Moreira, pela prontidão e atenção constantes e ao estagiário Francisco, pela importante colaboração na parte experimental.

Aos colegas de curso, especialmente às amigas Geni Varéa Pereira e Graciella C. Kotas pela força, amizade e convivência inestimável.

À Sra. Lígia Santana, Valério Poletto e José Tomás, pela colaboração valiosa na parte experimental e pela alegre convivência.

À Prof^a Dra. Lígia B. A. Muradian, pela atenção, convivência e amizade.

Às secretárias do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Ângela, Isabel e Mônica e à Benê, Elaine e Jorge da Secretaria de Pós-Graduação pela atenção durante todo este período.

À Moema Rodrigues dos Santos, pela atenção e agilidade na revisão das referências bibliográficas.

Ao Prof. Efraim Lázaro Reis (UFV - Viçosa), pela prontidão no empréstimo de equipamentos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

CONTEÚDO

LISTA DAS FIGURAS.....	xii
LISTAS DAS TABELAS.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	1
Referências Bibliográficas.....	4
 Capítulo 1 - TIAMINA, RIBOFLAVINA E NIACINA EM CARNES. UMA REVISÃO.....	6
1. Introdução.....	7
2. Aspectos Químicos e Biológicos.....	10
2.1. Tiamina.....	10
2.2. Riboflavina.....	14
2.3. Niacina.....	18
3. Conteúdo de Tiamina, Riboflavina e Niacina em Carnes.....	22
3.1. Teor em Carnes Cruas.....	22
3.2. Estabilidade no Processamento e na Estocagem.....	24
3.3. Efeito dos Procedimentos de Preparo em Serviço de Alimentação.....	29
4. Metodologia para Análise de Tiamina, Riboflavina e Niacina.....	33
4.1. Métodos Gerais.....	33
4.2. Métodos Físico-Químicos.....	34
4.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	35
4.2.1.1. Procedimentos para Extração.....	35
4.2.1.2. Purificação do Extrato.....	38
4.2.1.3. Derivatização.....	39
4.2.1.4. Análise Cromatográfica.....	40
4.2.1.5. Detecção.....	43
4.2.1.6.. Análise Qualitativa.....	44
4.2.1.7. Análise Quantitativa.....	44
5. Referências Bibliográficas.....	45

Capítulo 2 - DEFINIÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE TIAMINA, RIBOFLAVINA E ÁCIDO NICOTÍNICO EM CARNES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	55
1. Introdução.....	56
2. Materiais e Métodos.....	59
2.1. Materiais.....	59
2.1.1. Matéria Prima.....	59
2.1.2. Reagentes e Outros Materiais.....	59
2.1.3. Equipamentos.....	60
2.2. Métodos.....	60
2.2.1. Determinação das Condições de Extração das Vitaminas nas Amostras de Carnes.....	60
2.2.1.1. Tiamina.....	61
2.2.1.2. Riboflaviina.....	61
2.2.1.3. Ácido Nicotínico.....	61
2.2.2. Determinação das Condições Cromatográficas.....	61
2.2.2.1. Tiamina.....	62
2.2.2.2. Riboflavina.....	62
2.2.2.3. Ácido Nicotínico.....	63
2.2.3. Procedimentos para Otimização da Metodologia - Preparo das Amostras e Condições de Análise por CLAE.....	64
2.2.3.1. Análise da Tiamina.....	65
2.2.3.1.1. Extração da Vitamina....	65
2.2.3.1.2. Preparo do Padrão de Tiamina.....	66
2.2.3.1.3. Deteminação da Tiamina.	67
2.2.3.2. Análise da Riboflavina.....	67
2.2.3.2.1. Extração da Vitamina...	67
2.2.3.2.2. Preparo do Padrão de Riboflavina.	67
2.2.3.2.3. Deteminação da Riboflavina.....	68

2.2.3.3. Análise do Ácido Nicotínico.....	68
2.2.3.3.1. Extração da Vitamina....	68
2.2.3.3.2. Preparo do Padrão de Ácido Nicotínico.....	69
2.2.3.3.3. Deteminação do Ácido Nicotínico.	69
2.2.3.4. Determinação da Faixa de Linearidade.....	70
2.2.3.5. Determinação do Limite de Detecção Quantitativo.....	70
2.2.3.6. Análise da Recuperação dos Padrões.....	71
2.2.3.7. Análise dos Resultados.....	71
3. Resultados.....	71
3.1. Otimização da Metodologia de Preparação das Amostras.....	71
3.1.1. Tiamina.....	71
3.1.2. Riboflavina.....	73
3.1.3. Ácido Nicotínico.....	75
3.2. Otimização das Condições Cromatográficas.....	77
3.2.1. Determinação da Tiamina.....	77
3.2.2. Determinação da Riboflavina.....	79
3.2.3. Determinação do Ácido Nicotínico.....	83
3.3. Análises Cromatográficas Quantitativas.....	90
3.3.1. Faixa de Linearidade e Limite de Detecção...	90
3.3.2. Recuperação dos Padrões Adicionados às Amostras.....	91
4. Conclusões.....	93
5. Referências Bibliográficas.....	94
 Capítulo 3 - RETENÇÃO DA TIAMINA EM CARNES PREPARADAS EM SERVIÇO DE ALIMENTAÇÃO.....	 97
1. Introdução.....	98
2. Materiais e Métodos.....	101
2.1. Materiais.....	101
2.1.1. Matéria Prima.....	101

2.1.2. Reagentes e Outros Materiais.....	101
2.1.3. Equipamentos.....	101
2.2. Métodos.....	101
2.2.1. Delineamento Experimental.....	101
2.2.2. Preparo das Amostras.....	102
2.2.3. Determinação de Umidade e de Sólidos Totais.	114
2.2.4. Análise da Tiamina por Cromomatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	114
3. Resultados e Discussão.....	115
3.1. Análise Qualitativa da Tiamina.....	115
3.2. Análise Quantitativa da Tiamina.....	117
3.3. Avaliação da Estabilidade da Tiamina.....	122
4. Conclusões.....	130
5. Referências Bibliográficas.....	131
 Capítulo 4- RETENÇÃO DA RIBOFLAVINA EM CARNES PREPARADAS EM SERVIÇO DE ALIMENTAÇÃO.....	135
1. Introdução.....	136
2. Materiais e Métodos.....	137
2.1. Materiais.....	137
2.1.1. Matéria Prima.....	137
2.1.2. Reagentes e Outros Materiais.....	137
2.1.3. Equipamentos.....	137
2.2. Métodos.....	137
2.2.1. Delineamento Experimental.....	137
2.2.2. Preparo das Amostras.....	138
2.2.3. Determinação de Umidade e de Sólidos Totais.	138
2.2.4. Análise da Riboflavinina por Cromomatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	138
3. Resultados e Discussão.....	138
3.1. Análise Qualitativa da Riboflavina.....	138
3.2. Análise Quantitativa da Riboflavina.....	140
3.3. Avaliação da Estabilidade da Riboflavina.....	145

4. Conclusões.....	152
5. Referências Bibliográficas.....	153
 Capítulo 5 - RETENÇÃO DO ÁCIDO NICOTÍNICO EM CARNES PREPARADAS EM SERVIÇO DE ALIMENTAÇÃO.....	155
1. Introdução.....	156
2. Materiais e Métodos.....	157
2.1. Materiais.....	157
2.1.1. Matéria Prima.....	157
2.1.2. Reagentes e Outros Materiais.....	157
2.1.3. Equipamentos.....	157
2.2. Métodos.....	158
2.2.1. Delineamento Experimental.....	158
2.2.2. Preparo das Amostras.....	158
2.2.3. Determinação de Umidade e de Sólidos Totais.....	158
2.2.4. Análise do Ácido Nicotínico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	158
3. Resultados e Discussão.....	159
3.1. Análise Qualitativa do Ácido Nicotínico.....	159
3.2. Análise Quantitativa do Ácido Nicotínico.....	163
3.3. Avaliação da Estabilidade do Ácido Nicotínico.....	167
4. Conclusões.....	174
5. Referências Bibliográficas.....	175
 CONCLUSÕES GERAIS.....	177
RESUMO.....	179
SUMMARY.....	181

LISTA DAS FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura		Página
1	Estruturas da tiamina e dos compostos correlatos.....	11
2	Oxidação da tiamina a tiocromo.....	11
3	Estruturas da riboflavina, FMN (flavina mononucleotídeo), e FAD (flavina adenina dinucleotídeo).....	15
4	Estruturas dos compostos de niacina.....	18

CAPÍTULO 2

Figura		Página
1	Análise por CLAE da tiamina em carnes cruas. (a) padrão de tiamina, (b) alcatra bovina, (c) lombo suíno; (d) peito de frango. Fase móvel: 40% de metanol + 60% de cloreto de potássio 0,25%; coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 0,8ml/min.....	78
2	Análise por CLAE da tiamina em carnes cruas. (a) alcatra bovina; (b) lombo suíno; (c) peito de frango após adição de 50 ng/ml do padrão de tiamina. Fase móvel: 40% de metanol + 60% de cloreto de potássio 0,25%; coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 0,8ml/min.....	78
3	Espectro de absorção do hidrocloreto de tiamina em tampão fosfato 0,1M, pH 5,5.....	79
4	Análise por CLAE da riboflavina em carne crua. (a) solução padrão, (b) contra-filé bovino. Fase móvel: 50% de metanol + 50% de cloreto de potássio 0,25%; coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 0,5 ml/min.....	80
5	Análise por CLAE da riboflavina em carne crua. (a) solução padrão, (b) contra-filé bovino. Fase móvel: 39% de metanol + 60% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico); coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 0,8 ml/min.....	80
6	Análise por CLAE da riboflavina carnes cruas. (a) padrão de riboflavina, (b) alcatra bovina, (c) lombo suíno; (d) peito de frango. Fase móvel: 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico); coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 1 ml/mi.....	81

7	Análise por CLAE da riboflavina em amostras de carnes cruas. (a) alcatra bovina, (b) lombo suíno; (c) peito de frango após adição 250 ng/ml do padrão de riboflavina. Fase móvel: 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico); coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 1 ml/min.....	82
8	Espectro de absorção da riboflavina em ácido acético 0,02N.....	83
9	Análise por CLAE do ácido nicotínico em carnes cruas. (a) solução padrão de ácido nicotínico; (b) carne bovina, hidrólise ácida (c) carne suína, hidrólise ácida; (d) carne de frango, hidrólise ácida; (e) carne bovina, hidrólise alcalina (f) carne de frango, hidrólise alcalina. Fase móvel: 16% de acetonitrila + 84% de água contendo 0,005M de fosfato de tetrabutylamônio; coluna RP 18; detecção UV a 254 nm; vazão: 1 ml/min.....	84
10	Análise por CLAE do ácido nicotínico em carnes cruas. (a) solução padrão; (b) carne bovina; (c) carne suína; (d) carne de frango. Fase móvel: 9% de acetonitrila + 91% de água contendo 0,5% de trietilamina + 0,005M de ácido heptano sulfônico; pH ajustado para 2,74 com ácido fosfórico; coluna RP18; detecção UV a 254 nm; vazão: 1 ml/min.....	85
11	Análise por CLAE do ácido nicotínico (AN) em carnes cruas. (a) solução de H ₂ SO ₄ 1N onde foi preparado o padrão; (b) solução padrão de AN; (c) carne bovina; (d) carne suína; (e) carne de frango. Fase móvel: 5% de acetonitrila + 95% de água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico + 0,15% de trietilamina, pH ajustado para 2,8 com H ₂ SO ₄ 1N; coluna RP 18; detecção UV a 261 nm; vazão: 0,8 ml/min.....	87
12	Análise de ácido nicotínico (AN) em carnes cruas por CLAE. (a) carne bovina; (b) carne suína; (c) carne de frango após adição do padrão de AN. Fase móvel: 5% de acetonitrila + 95% de água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico + 0,15% de trietilamina; pH ajustado para 2,8 com H ₂ SO ₄ 1N; coluna RP 18; detecção UV a 261 nm; vazão: 0,8 ml/min.....	88
13	Espectro de absorção do ácido nicotínico em H ₂ SO ₄ 0,1N...	88
14	Perfil espectral do pico de (a) ácido nicotínico, (b) do pico correspondente na amostra de peito de frango e (c) sobreposição dos dois anteriores analisados pelo detector de arranjos de diodos.....	89

CAPÍTULO 3

Figura		Página
1	Forno combinado (CM6, RATIONAL), mostrando em destaque o painel de controle utilizado para programar as preparações.....	104
2	Forno combinado (CC 201, RATIONAL). Em destaque, o interior da câmara contendo frangos assados.....	105
3	Forno combinado (CC 101, RATIONAL). Em destaque, o uso do sensor térmico para controle da temperatura do centro em carne bovina.....	105
4	Análise por CLAE da tiamina em carnes preparadas em Serviço de Alimentação. (a) padrão de tiamina, (b) coxão mole grelhado no forno combinado, (c) pernil suíno assado no forno combinado; (d) pernil suíno assado no forno convencional; (e) coxa e sobrecoxa de frango frita no forno combinado; (f) coxa e sobrecoxa de frango frita na fritadeira. Condições cromatográficas: fase móvel: 40% de metanol + 60% de cloreto de potássio 0,25%; coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 0,8ml/min.....	116
5	Curva padrão de tiamina (traçada com valores médios das análises em triplicata).....	117
6	Estabilidade da tiamina em carnes bovina, suína e de frango preparadas em Serviço de Alimentação (FC: forno combinado; EC: equipamento convencional).....	129

CAPÍTULO 4

Figura		Página
1	Análise por CLAE da riboflavina em carne bovina preparada em Serviço de Alimentação. (a) solução padrão de riboflavina; (b) carne grelhada em forno combinado; (c) carne grelhada em equipamento convencional; (d) carne frita em forno combinado. Condições cromatográficas: fase móvel: 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico); coluna RP18; detecção por fluorescência; vazão: 1 ml/min..	139
2	Análise de riboflavina por CLAE em carnes preparadas em Serviço de Alimentação. (a) carne suína refogada em forno combinado; (b) carne de frango assada em forno combinado; (c) carne de frango assada em equipamento convencional. Condições cromatográficas: fase móvel: 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico); coluna RP18; detecção por fluorescência; vazão: 1 ml/min.....	139

3	Curva padrão de riboflavina (traçada com valores médios das análises em triplicata).....	140
4	Estabilidade da riboflavina em carnes bovina, suína e de frango preparadas em Serviço de Alimentação (FC: forno combinado; EC: equipamento convencional).....	151

CAPÍTULO 5

Figura		Página
1	Análise por CLAE do ácido nicotínico (AN) em carne bovina. (a) solução de H ₂ SO ₄ 1N onde o padrão de ácido nicotínico foi diluído; (b) solução padrão de ácido nicotínico; (c) coxão mole cru; (d) peixinho cru; (e) acém cru; (f) coxão mole grelhado em forno combinado; (g) coxão mole grelhado em equipamento convencional. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila + água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico e 0,15% de trietilamina (5 + 95), pH ajustado para 2,8 com H ₂ SO ₄ 1N; coluna RP18; detecção UV a 261 nm; vazão: 0,8 ml/min.....	160
2	Análise por CLAE do ácido nicotínico (AN) em carne suína (pernil). (a) crua; (b) frita no forno combinado; (c) frita em equipamento convencional. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila + água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico e 0,15% de trietilamina (5 + 95), pH ajustado para 2,8 com H ₂ SO ₄ 1N; coluna RP18; detecção UV a 261 nm; vazão: 0,8 ml/min.....	161
3	Análise por CLAE do ácido nicotínico (AN) em carne de frango. (a) coxa e sobrecoxa crua; (b) peito cru; (c) peito cozido no forno combinado; (d) peito cozido em equipamento convencional. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila + água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico e 0,15% de trietilamina (5 + 95), pH ajustado para 2,8 com H ₂ SO ₄ 1N; coluna RP18; detecção UV a 261 nm; vazão: 0,8 ml/min.....	162
4	Curva de calibração do ácido nicotínico (traçada com valores médios das análises em triplicata).....	163
5	Estabilidade do ácido nicotínico em carnes bovina, suína e de frango preparadas em Serviço de Alimentação. (FC: forno combinado; EC: equipamento convencional).....	173

LISTAS DAS TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela	Página
1 Vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis com suas principais formas ativas e principais funções.....	9
2 Teores de tiamina, riboflavina e niacina em carnes cruas (valores expressos na base úmida).....	23

CAPÍTULO 2

Tabela	Página
1 Teores de tiamina determinados por CLAE ($\mu\text{g}/100\text{g}$) em amostras de carnes cruas utilizando diversos métodos de hidrólise (resultados expressos na base úmida).....	72
2 Teores de riboflavina determinados por CLAE ($\mu\text{g}/100\text{g}$) em amostras de carnes cruas utilizando diversos métodos de hidrólise (resultados expressos na base úmida).....	74
3 Teores de ácido nicotínico determinados por CLAE ($\text{mg}/100\text{g}$) em amostras de carnes cruas utilizando diferentes métodos de hidrólise (resultados expressos na base úmida).....	76
4 Dados de calibração, faixa de linearidade e limite de detecção quantitativo (LDQ) obtidos para tiamina, riboflavina e ácido nicotínico.....	90
5 Recuperação da tiamina (B_1) adicionada às amostras cruas de carnes bovina, suína e de frango (resultados expressos em base úmida).....	91
6 Recuperação da riboflavina (B_2) adicionada às amostras cruas de carnes bovina, suína e de frango (resultados expressos em base úmida).....	91
7 Recuperação do ácido nicotínico (AN) adicionado às amostras cruas de carnes bovina, suína e de frango (resultados expressos em base úmida).....	92

CAPÍTULO 3

Tabela	Página
1 Métodos de preparo em Serviço de Alimentação e condições de preparação de carne bovina, carne suína e carne de frango.....	107

2	Preparações e condições de preparo de carne bovina em Serviço de Alimentação utilizando-se o forno combinado....	108
3	Preparações e condições de preparo de carne suína em Serviço de Alimentação utilizando-se o forno combinado....	109
4	Preparações e condições de preparo de carne de frango em Serviço de Alimentação utilizando-se o forno combinado.....	110
5	Preparações e condições de preparo de carne bovina em Serviço de Alimentação utilizando-se equipamentos convencionais.....	111
6	Preparações e condições de preparo de carne suína em Serviço de Alimentação utilizando-se equipamentos convencionais.....	112
7	Preparações e condições de preparo de carne de frango em Serviço de Alimentação utilizando-se equipamentos convencionais.....	113
8	Teores de tiamina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em carne bovina crua e após preparação em Serviço de Alimentação.....	118
9	Teores de tiamina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em carne suína crua e após preparação em Serviço de Alimentação.....	118
10	Teores de tiamina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em carne de frango crua e após preparação em Serviço de Alimentação.	119
11	Retenção de tiamina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em carne bovina preparada em Serviço de Alimentação.....	123
12	Retenção de tiamina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em carne suína preparada em Serviço de Alimentação.....	124
13	Retenção de tiamina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em carne de frango preparada em Serviço de Alimentação.....	124

CAPÍTULO 4

Tabela		Página
1	Teores de riboflavina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em carne bovina crua e após preparação em Serviço de Alimentação	141
2	Teores de riboflavina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em carne suína crua e após preparação em Serviço de Alimentação..	141
3	Teores de de riboflavina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em carne de frango crua e após preparação em Serviço de Alimentação.....	142
4	Retenção de riboflavina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em carne bovina preparada em Serviço de Alimentação.....	146

5	Retenção de riboflavina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em carne suína preparada em Serviço de Alimentação.....	146
6	Retenção de riboflavina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em carne de frango preparada em Serviço de Alimentação.....	147

CAPÍTULO 5

Tabela		Página
1	Teores de ácido nicotínico (mg/100g; média* $\pm$ DP) em carne bovina crua e após preparação em Serviço de Alimentação.....	164
2	Teores de ácido nicotínico (mg/100g; média* $\pm$ DP) em carne suína crua e após preparação em Serviço de Alimentação.....	164
3	Teores de ácido nicotínico (mg/100g; média* $\pm$ DP) em carne de frango crua e após preparação em Serviço de Alimentação.....	165
4	Retenção de ácido nicotínico e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em carne bovina preparada em Serviço de Alimentação.....	168
5	Retenção de ácido nicotínico e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em carne suína preparada em Serviço de Alimentação.....	168
6	Retenção de ácido nicotínico e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em carne de frango preparada em Serviço de Alimentação.....	169

INTRODUÇÃO

A necessidade de informações sobre os aspectos nutricionais dos alimentos tem aumentado desde que os profissionais da área e os próprios consumidores passaram a ter maior consciência sobre este assunto. Assim, é de grande importância analisar o conteúdo nutricional do grande número de alimentos existentes na natureza, somados a diversos outros desenvolvidos pelas indústrias de alimentos e instituições de pesquisa. Os alimentos processados a nível doméstico e em Serviços de Alimentação que atendem a coletividades também necessitam ter seu conteúdo de nutrientes estudado, como meio de informar aos consumidores os níveis ingeridos. Conhecendo os principais fatores que causam as perdas de nutrientes, é possível otimizar os processos de preparo dos alimentos e, assim, garantir uma maior qualidade em termos nutricionais.

Um dos fatores mais importantes na determinação da qualidade dos alimentos se refere ao seu conteúdo em vitaminas (TANNENBAUM et alii, 1993). As vitaminas são micronutrientes essenciais de grande importância no crescimento normal e na manutenção da saúde (BRODY, 1994), além de serem imprescindíveis em diversas e variadas reações metabólicas no organismo e atuarem como agentes essenciais ativos para manutenção das funções biológicas (FRANCO, 1992). Uma ingestão insuficiente ou uma má absorção de vitaminas nas dietas animais frequentemente induzem a doenças com sintomas característicos (BALL, 1994).

Segundo SELMAN (1994), os principais mecanismos responsáveis pela perda das vitaminas são a solubilidade em água, a sensibilidade ao calor e a oxidação enzimática. Estes mecanismos podem ser influenciados por fatores como estrutura física, localização da vitamina no alimento, concentração da vitamina, nível de oxigênio intracelular, atividade das enzimas oxidativas, tamanho do pedaço do alimento e área superficial, relação água/alimento, conteúdo de sólidos solúveis da água de cocção, temperatura e tempo de cocção e outros.

As maiores perdas de vitaminas em carnes se referem à tiamina, riboflavina e niacina. Estas vitaminas podem ser extraídas pela água de cocção ou parcialmente destruídas pela ação do calor, pH do meio, oxigênio ou ação da luz quando os alimentos são submetidos à preparação. Portanto, o conhecimento da extensão das perdas nutricionais devidas ao processamento é de vital importância (HILL, 1994).

Os Serviços de Alimentação Coletivos têm crescido muito rapidamente. Estes estabelecimentos se destacam como a quarta maior indústria nos Estados Unidos, por volume de vendas, e a primeira em número de pessoas atendidas (LACHANCE, 1977). A França, em particular, tem dispensado atenção crescente ao mercado de alimentação coletiva. O movimento anual de compras no setor chega a cerca de 35 bilhões de dólares, superando até mesmo a tradicional indústria automobilística (NUTRIÇÃO..., 1991). No Brasil, o crescente mercado de alimentação coletiva desperta a atenção e o interesse dos profissionais da área, justificando investimentos em setores específicos, profissionais especializados e desenvolvimento de novos produtos e equipamentos (TODA..., 1994).

Particularmente hoje, quando as empresas brasileiras estão buscando a produtividade, e o esforço geral está voltado para a modernização do parque industrial, equipamentos leves e produtivos para Serviços de Alimentação podem se mostrar como soluções eficientes para melhor aproveitamento de espaço, rapidez na produção e economia. Nesta categoria de equipamentos incluem-se os fornos combinados que têm despertado interesse crescente no mercado de refeições coletivas (COMBINAÇÃO... 1991; EQUIPAMENTOS... 1997). Bastante utilizados no exterior, os fornos combinados já são realidade em alguns Serviços de Alimentação no Brasil. Os responsáveis por estes serviços destacam sempre suas qualidades como a melhoria na produtividade das refeições e na qualidade dos produtos preparados (REVOLUÇÃO... 1996).

Diante das potencialidades do forno combinado, é comum os fabricantes destacarem também como qualidade a maior retenção de nutrientes, entre eles as vitaminas e sais minerais, em relação às preparações

feitas em equipamentos convencionais. No entanto, o exame da literatura na área não mostra nenhum estudo científico comprovando esta afirmação. Estudos sobre a estabilidade de vitaminas em alimentos preparados em grandes quantidades utilizando equipamentos mais tradicionais também são muito escassos. Alguns poucos estudos foram publicados (DAWSON et alii, 1988; AWONORIN & ROTIMI, 1991; PINHEIRO-SANT'ANA, 1995).

Apesar da evolução em muitos setores, estudos sobre a retenção de nutrientes em alimentos preparados em Serviços de Alimentação têm recebido pouca atenção. A importância destas pesquisas é uma preocupação que merece destaque por causa da responsabilidade do alimento como forma de nutrir e, portanto, a saúde resultante atinge não só um indivíduo ou família, mas um grupo muito maior de pessoas (LACHANCE, 1977).

O estudo da literatura publicada nos últimos anos sugere que os métodos cromatográficos têm se tornado uma ferramenta indispensável para determinações rápidas de vitaminas em alimentos (RIZZOLO & POLESELLO, 1992). Em especial, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido ultimamente a técnica mais aplicada (COULTATE, 1995), e está se tornando também um método padrão na avaliação de vitaminas, especialmente em trabalhos de rotina, por ser um método acurado e rápido de análise (RIZZOLO & POLESELLO, 1992). No caso da análise de vitaminas do complexo B em produtos cárneos, a detecção fluorimétrica tem sido bastante utilizada por ser mais seletiva e detectar um menor número de compostos interferentes que prevalecem nestes alimentos (DAWSON et alii, 1988).

Este estudo teve como finalidade definir métodos de análise quantitativa para tiamina, riboflavina e ácido nicotínico por CLAE em amostras de carnes, para, então, avaliar a influência da preparação em Serviço de Alimentação sobre o conteúdo destas vitaminas em diferentes cortes de carnes bovina, suína e de frango. Objetivou-se também avaliar a estabilidade das vitaminas citadas após métodos de preparação tradicionais comparados com métodos de preparação em forno combinado (um dos equipamentos de cocção mais modernos utilizados em Serviço de Alimentação). As carnes foram

escolhidas para este estudo por constituírem fontes importantes das vitaminas citadas e devido à sua presença constante no cardápio dos brasileiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AWONORIN, S. O. , ROTIMI, D. K. Effects of oven temperature and time on the losses of some B vitamins in roasted beef and pork. **J. Foodservice Syst.**, Trumbull, v. 6, p. 89-105, 1991.
- BALL, G. F. M. **Water-soluble vitamin assays in human nutrition**. London: Chapman & Hall, 1994. 416 p.
- BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. London: Academic Press, 1994. p.355-484.
- COMBINAÇÃO é novidade na cozinha. **Coz. Ind.**, São Paulo, v.14, p. 26-29, 1991.
- COULTATE, T. P., SUMAR, S., DAVIES, J. G. The analysis of micronutrients in the diet. **Nutr. Food Sci.**, London, v.1, p. 28-30, 1995.
- DAWSON, K. R., UNKLESBAY, N.F. , HEDRICK, H. B. HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate heat-processing methods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.36, p. 1176-1179, 1988.
- EQUIPAMENTOS leves e produtivos. **Coz. Ind.**, São Paulo, v. 59, p. 48-50, 1997.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 307p.
- HILL, M. A. Vitamin retention in microwave cooking and cook-chill foods. **Food Chem.**, Barking, v.49, p.131-136, 1994.

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1996.

LACHANCE, P. A. Effects of food preparation procedures on nutrient retention with emphasis upon food service practices. In: HARRIS R. S., KARMAS, E., eds. **Nutritional evaluation of food processing**. 2.ed. Westport: AVI, 1977. p.463-528.

NUTRIÇÃO se debate. **Coz. Ind.**, São Paulo, v.13, p.36-39, 1991.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. **Efeito do método de preparo sobre a estabilidade de carotenóides em cenoura (*Daucus carota* L)**. Viçosa, 1995. 115p. [Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa].

REVOLUÇÃO na boca do forno. **Coz. Ind.**, São Paulo, v.48, p.24-28, 1996.

RIZZOLO, A., POLESELLO, S. Review: chromatographic determination of vitamins in foods. **J. Chromatogr.**, Amsterdam,, 624: 103-152, 1992.

SELMAN, J. D. Vitamin retention during blanching of vegetables. **Food. Chem.**, Barking, v.49, p.137-147, 1994.

TANNENBAUM, S. R., YOUNG, V. R., ARCHER, M. C. Vitaminas y minerales. In: FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 537-613.

TODA atenção ao institucional. **Coz. Ind.**, São Paulo, v.39, p.56-64, 1994.

Capítulo 1

TIAMINA, RIBOFLAVINA E NIACINA EM CARNES. UMA REVISÃO

1. INTRODUÇÃO

As vitaminas compreendem um grupo diverso de compostos orgânicos que são necessários para assegurar o crescimento normal e a manutenção da saúde dos animais (BALL, 1994). Possuem composição química e funções biológicas diversas, sendo necessárias para a síntese de cofatores essenciais e para diversas e variadas reações metabólicas controladas por enzimas e coenzimas, algumas das quais possuem uma vitamina como grupo ativo e um componente prostético como veículo. São agentes essenciais ativos para manutenção das funções biológicas, podendo ocorrer na natureza como tal ou sob forma de precursores, as provitaminas (FRANCO, 1992).

As necessidades diárias tão pequenas são explicadas pela não participação destes nutrientes na edificação da estrutura do organismo e por não serem fonte de energia. As vitaminas cumprem funções catalíticas, facilitando a formação e a eliminação das principais substâncias alimentícias, dirigindo assim o metabolismo (LEHNINGER, 1993).

A maioria das vitaminas não podem ser produzidas pelo organismo animal, devendo ser fornecidas através da dieta. Atualmente sabe-se que a niacina pode ser sintetizada a partir do aminoácido precursor, o triptofano e que quantidades variáveis das vitaminas do grupo B podem ser produzidas pela microflora intestinal, embora em quantidades insuficientes para a exigência endógena. Assim, considera-se que as vitaminas são micronutrientes essenciais porque os animais não podem sintetizá-las em quantidades adequadas para atender às suas necessidades diárias. Por outro lado, os vegetais são capazes de sintetizar a maioria das vitaminas e desta forma servem como fontes primárias importantes desses nutrientes essenciais.

As vitaminas podem ser classificadas de acordo com sua solubilidade em 2 grupos: vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e vitaminas hidrossolúveis (vitamina C e as do complexo B) (FRANCO, 1992). Esta simples classificação reflete algumas funções das vitaminas, assim como a

solubilidade afeta sua distribuição natural nos tecidos e seu papel fisiológico (BALL, 1994). A TABELA 1 mostra os dois grupos de vitaminas com suas principais funções.

As vitaminas do complexo B compreendem diversas substâncias que apresentam a característica de se diferenciarem em sua estrutura química, em suas ações biológicas e terapêuticas e no teor de suas necessidades nutricionais. A característica em comum é que são hidrossolúveis e suas fontes habituais são representadas pelo fígado e leveduras (FRANCO, 1992).

Várias das vitaminas do complexo B servem como precursores para cofatores enzimáticos que contribuem no catabolismo dos macronutrientes dietéticos (carboidratos, lípidos e proteínas), os quais produzem energia para o organismo. Desta forma, as necessidades destas vitaminas variam de acordo com a ingestão destes macronutrientes e com a atividade física. Como o ácido nicotínico pode ser sintetizado no organismo a partir do triptofano, sua necessidade no organismo depende da quantidade deste aminoácido existente na dieta e da eficiência da conversão (BALL, 1994).

Muitas reações enzimáticas envolvidas no catabolismo dos alimentos dependem da presença de vitaminas específicas e, desta forma, a deficiência destas vitaminas leva a desordens metabólicas, algumas vezes com consequências fatais (BALL, 1994). A deficiência das vitaminas do complexo B se reflete em vários sistemas do corpo. Mais particularmente, mudanças na pele ocorrem quando há deficiência de ácido pantotênico, niacina, piridoxina e riboflavina. Mudanças na boca, olhos, glândulas reprodutivas ou anomalias na utilização de outros nutrientes ocorrem quando há deficiência destas vitaminas ou aumento da necessidade como no caso do stress (DI CYAN, 1972).

TABELA 1. Vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis com suas principais formas ativas e principais funções

Vitaminas	Forma Ativa	Função
Lipossolúveis		
Vitamina A	retinol e ácido retinóico	ciclo visual e integridade epitelial
Vitamina D	1,25 diidroxicolecalciferol	regulação metabolismo do Ca, Mg e P
Vitamina E	α , γ , δ e β -tocoferol	proteção contra oxidação dos lipídeos de membranas, fertilidade e gestação
Vitamina K	2 metil-1,4 naftoquinona	cofator em reações de carboxilação, ativa em vários fatores sanguíneos
Hidrossolúveis		
Vitamina C (ácido ascórbico)	ácido L-ascórbico	cofator em reações de hidroxilação, antioxidante, metabolismo mineral
Vitamina B ₁ (tiamina)	tiamina-pirofosfato	metabolismo de carboidratos e de aminoácidos, sistema nervoso
Vitamina B ₂ (riboflavina)	flavina-mononucleotídeo, flavina-adenina-dinucleotídeo	reações de óxido-redução
Vitamina PP (niacina)	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo, nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato	reações de óxido-redução, redução da hiperlipidemia
Vitamina B ₆ (piridoxina)	piridoxal-fosfato, piridoxamina, piridoxina, piridoxal	transferência de grupos amino, resposta imune, formação de niacina
Vitamina B ₁₂ (cobalamina)	desoxiadenosil cobalamina	metabolismo dos ácidos graxos e aminoácidos
Ácido pantotênico	coenzima A	transferência de grupos acila no metabolismo dos macronutrientes
Biotina	biocitina	transferência de CO ₂ no ciclo de Krebs
Ácido fólico	ácido tetrahidrofólico	transferência de unidades monocarbônicas, formação dos eritrócitos

Fonte: MACHLIN, 1991; LEHNINGER et alii, 1993; BALL, 1994

2. ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

2.1. TIAMINA

A molécula de tiamina apresenta uma porção pirimidina e uma porção tiazol que estão unidas através de um grupo metileno. Em tecidos vivos, a tiamina é encontrada na forma de ésteres de fosfato como tiamina monofosfato (TMP), tiamina pirofosfato ou difosfato (TPP) e tiamina trifosfato (TTP). Cerca de 80 a 90% do conteúdo total de tiamina nas células são TPP, a forma coenzimática ativa, agindo como grupo prostético de enzimas metabólicas. Pequenas quantidades de TMP e TTP ocorrem em tecidos animais (BALL, 1994). A FIGURA 1 apresenta a estrutura química da tiamina e seus compostos correlatos.

Uma vez que a molécula de tiamina contém um átomo de nitrogênio quaternário, é uma base forte, sendo completamente ionizada na faixa de pH normalmente encontrada em alimentos (BALL, 1994; BOBBIO & BOBBIO, 1995).

A vitamina é comercializada na forma de hidrocloreto de tiamina e mononitrato de tiamina (BROWN, 1991; GUBLER, 1991). O hidrocloreto de tiamina é a forma mais utilizada no enriquecimento dos alimentos; o mononitrato de tiamina é especialmente indicado para enriquecimento de farinhas (BALL, 1994). No Brasil, segundo os fabricantes, o mononitrato de tiamina tem sido a forma mais comercializada.

O espectro de absorção do hidrocloreto de tiamina é dependente do pH. Em solução tampão fosfato 0,1M; pH 2,9 apenas um pico máximo a 246 nm ocorre, enquanto que em pH 5,5 dois picos máximos ocorrem a 234 e 264 nm. A tiamina não apresenta fluorescência nativa, mas a vitamina e seus ésteres de fosfato reagem *in vitro* com agentes químicos oxidantes como ferricianeto de potássio e brometo cianogênico em pH alcalino para formar tiocromo com forte fluorescência azul (FIGURA 2). Estas características são muito utilizadas nas determinações químicas quantitativas desta vitamina (BALL, 1994).

Tiamina : R = H

FIGURA 1. Estruturas da tiamina e dos compostos correlatos. TMP: tiamina monofosfato; TPP: tiamina pirofosfato; TTP: tiamina trifosfato (Fonte: LEENHEER et alii, 1985).

Tiamina

Oxidação Alcalina

Tiocromo

FIGURA 2. Oxidação da tiamina a tiocromo (composto fluorescente) (Fonte: BALL, 1994).

Poucos alimentos são excepcionalmente ricos em tiamina. As fontes ricas incluem leveduras e extratos de levedura, trigo, aveia, grãos cereais integrais, nozes, coração, rins, peixes, feijões, carnes magras e fígado (LEHNINGER, 1993).

A tiamina, na forma de tiamina pirofosfato (TPP), participa do metabolismo dos carboidratos funcionando com um cofator em numerosas reações envolvendo o ciclo do ácido tricarboxílico e o ciclo das pentoses-fosfato (NEAL & SAUBERLICH, 1980). A TPP participa também nas reações transcetolase na via das pentoses fosfato, cuja principal função é prover fonte de ribose para síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos, e ainda reduzindo nicotinamida adenina dinucleotídeoreduzido (NADPH) para síntese de ácidos graxos (BROWN, 1991; BALL, 1994). Além disso, é requerida para descarboxilação oxidativa dos α -ceto-ácidos formados após desaminação dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina. Há também evidências de que a tiamina está envolvida diretamente na transmissão do impulso nervoso (BALL, 1994).

A tiamina é absorvida no intestino delgado por processo de transporte ativo e é rapidamente depositada nos músculos, fígado e outros órgãos onde é fosforilada para a forma biologicamente ativa, TPP. Aproximadamente 80% do total de tiamina depositada estão na forma de TPP, sendo 10% como TTP e o restante como tiamina não esterificada e TMP. Das 3 formas de ésteres de fosfato, a TPP possui atividade máxima, TMP é completamente inativa e alguma atividade é atribuída a TTP. A tiamina parece ser bem utilizada quando é proveniente de dietas contendo trigo ou proteína animal. Os taninos e outros compostos polifenólicos presentes no chá e café apresentam marcada atividade anti-tiamínica (Hilker & Somogyi, 1982, citados por BALL, 1994).

A condição patológica clássica resultante da deficiência de tiamina é o beriberi, que é prevalente em populações onde o arroz polido não fortificado da vitamina representa a dieta básica (BALL, 1994), ocorrendo ainda em partes rurais do sudeste da Ásia (BRODY, 1994). A doença é, ainda, um problema de saúde pública entre os desnutridos nos países que se alimentam

basicamente com arroz na Ásia, Indonésia e Filipinas, bem como na África, onde há um consumo crescente de cereais brancos refinados (LEHNINGER, 1993).

O beriberi produz graves alterações nos sistemas nervoso e cardiovascular (BROWN, 1991), sendo que os sintomas variam de acordo com as circunstâncias. Segundo BRODY (1994), três tipos de beriberi são reconhecidos: beriberi úmido, beriberi seco e beriberi infantil. O beriberi úmido é manifestado como edema generalizado e problemas cardíacos. O beriberi seco é caracterizado por pronunciado desgaste muscular, acompanhado por desordens neurológicas diversas resultantes da restrição calórica em deficiências crônicas. Os sinais mais comuns se caracterizam por distúrbios mentais, fadiga, perda de peso e apetite reduzido, além de problemas digestivos (BALL, 1994). O beriberi infantil ocorre em crianças alimentadas ao seio por mães com deficiência de tiamina, sendo que a doença aparece rapidamente e a morte por falha cardíaca pode acontecer dentro de poucas horas (BRODY, 1994).

O alcoolismo crônico leva a sintomas de deficiência de tiamina devido a baixa ingestão, redução do transporte ativo a nível gastro-intestinal, diminuição da ativação do pirofosfato de tiamina, redução da capacidade hepática de armazenamento e inibição da absorção (FIGUEIRA & LAKS, 1988).

No Brasil, onde o consumo de álcool é um dos mais graves problemas de saúde pública, os casos mais graves de deficiência de tiamina estão ligados ao alcoolismo crônico. PEREIRA et alii (1985), num trabalho realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, identificaram e documentaram casos de insuficiência cardiocirculatória grave determinada por carência de tiamina. Outro relato de beriberi cardíaco, associado ao alcoolismo foi feito por BLACHER & BARBISAN (1985), num trabalho realizado no Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul. Um estudo efetuado por FAINTUCH (1995), no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, mostrou diversos casos de alcoolismo crônico e suas repercussões cardiovasculares, mas o número de

casos de beriberi nestes alcoólatras foram poucos. Distúrbio neurológico (encefalopatia de Wernicke), causado pela deficiência de tiamina, é uma das complicações mais graves do alcoolismo e tem sido estudado no Brasil por alguns pesquisadores (FIGUEIRA & LAKS, 1988; SANTOS, 1989; ZUBARAN et alii, 1996). Por outro lado, a deficiência de tiamina foi associada a crises epiléticas em uma criança de apenas 3 meses no Rio Grande do Sul (COSTA et alii, 1992). Os estudos acima citados indicam a correção dos distúrbios com a reposição dos níveis de tiamina, embora isso seja insuficiente para prevenir o declínio psicológico de um grande número de pacientes.

A deficiência de tiamina, que ocorre com o consumo frequente de peixes crus, resulta da atividade da tiaminase. A tiaminase cataliza a clivagem e destruição da vitamina (BRODY, 1994). TAUNGBODHITHAM (1995) relatou a atividade do fator anti-tiamina em diversos vegetais comumente consumidos por habitantes da Tailândia, onde a deficiência de tiamina é ainda um problema nutricional.

2.2. RIBOFLAVINA

A molécula de riboflavina é formada por uma porção ou anel isoaloxazina, com uma cadeia ribitol. Possui fórmula molecular $C_{17}H_{20}O_6N_4$ e peso molecular 376,36. As principais formas da riboflavina encontradas na natureza são a flavina mononucleotídeo (FMN) e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Nos tecidos biológicos, FAD, e, em menor extensão, a FMN atuam quase exclusivamente como grupos prostéticos para uma variedade de enzimas flavinas (flavoproteínas), responsáveis pelos processos de oxido-redução (LEHNINGER, 1993; BALL, 1994). As estruturas dos componentes da riboflavina que ocorrem na natureza são dispostas na FIGURA 3.

A riboflavina cristaliza-se na forma de agulhas de coloração amarela ou amarelo-laranja, não possui odor, mas apresenta desagradável sabor amargo. Em soluções aquosas neutras apresenta forte fluorescência amarelo-esverdeada. A solubilidade da riboflavina na água é baixa, mas aumenta com

o aumento da temperatura; é prontamente solúvel mas instável em álcali diluído (BALL, 1994).

FIGURA 3. Estruturas da riboflavina, FMN (flavina mononucleotídeo), e FAD (flavina adenina dinucleotídeo) (Fonte: BALL, 1994).

A riboflavina, em solução aquosa, apresenta um espectro UV-visível contendo quatro bandas principais em torno de 223, 266, 373 e 445 nm. A riboflavina, FMN e FAD, mostram emissão de fluorescência em torno de 530 nm quando excitadas a 440-500 nm. Soluções aquosas neutras de riboflavina possuem uma intensa fluorescência amarelo-esverdeada com um máximo de emissão a 521 nm. A fluorescência é quebrada com ácido ou álcali forte. Esta vitamina mostra máxima fluorescência na faixa de pH entre 3,5 e 7,5 (BALL, 1994).

As células vivas requerem FMN e FAD como grupos prostéticos para uma variedade de enzimas e, assim, as flavinas são encontradas em alimentos naturais não processados. Extratos de levedura são excepcionalmente ricos em riboflavina, sendo o fígado e rins também excelentes fontes (BALL, 1994). Farelo de trigo, ovos, carnes, leite e queijos são boas fontes (COOPERMAN & LOPEZ, 1991). Na maioria dos alimentos a riboflavina está presente na forma de proteína ligada à flavina, predominantemente FAD, mas vários investigadores têm reportado que 54 a 95% do total de riboflavina em leite bovino estão presentes como riboflavina livre e o restante como FMN e FAD. Clara e gema de ovos contêm riboflavina ligada a proteínas, que são necessárias para estocagem da vitamina que será utilizada posteriormente durante o desenvolvimento do embrião (BALL, 1994).

A riboflavina na forma de enzimas flavinas desempenha função vital no catabolismo dos carboidratos e lipídeos em pontos importantes como catalisação da reoxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADPH), catalisação da oxidação do succinato à fumarato no ciclo dos ácidos tricarboxílicos; e ainda na catalisação da oxidação dos ácidos graxos acil-CoA saturados para insaturados na β -oxidação dos ácidos graxos. Durante todas estas reações as flavinas reduzidas, FADH_2 e FMNH_2 são reoxidadas pelos citocromos na cadeia transportadora de hidrogênio para o oxigênio molecular formando H_2O . As flavinas estão também envolvidas na biossíntese de ácidos graxos de cadeias longas, no catabolismo de aminas biogênicas, bases purínicas derivadas da degradação de ácidos nucleicos, na conversão da vitamina B₆ e ácido fólico a suas formas coenzimáticas ativas e na conversão do triptofano a NAD^+ (BALL, 1994).

A riboflavina existe nos tecidos dos mamíferos principalmente como FMN e FAD e como riboflavina livre nos olhos e urina (COOPERMAN & LOPEZ, 1991). As formas FAD e FMN, presentes nos alimentos ingeridos, são liberadas das proteínas pela acidificação gástrica e sofrem desfosforilação enzimática no intestino delgado. A riboflavina livre é absorvida no intestino delgado por transporte ativo e fosforilada nas células da mucosa intestinal à

FMN, que entra pelo sistema porta onde se liga à albumina plasmática e é transportada até o fígado. A conversão de FMN à FAD e a ligação à flavoproteínas específicas ocorre na maioria dos tecidos, principalmente no intestino delgado, fígado, coração e rim (BALL, 1994). O fígado é o maior sítio de estocagem da vitamina que contém 1/3 do total das flavinas, sendo 70-90% das quais na forma de FAD. A riboflavina livre constitui menos de 5% das flavinas estocadas (COOPERMAN & LOPEZ, 1991). Outros sítios de estocagem são os rins e o músculo cardíaco. Estes depósitos mantêm significantes quantidades da vitamina até mesmo nos estados de deficiência severa (BALL, 1994). A riboflavina, FMN e FAD são igualmente ativas como vitaminas na nutrição (Yag, 1962, citado por BALL, 1994).

Os sinais de deficiência em humanos geralmente incluem lesões nos lábios (queiloses) e ângulos da boca (estomatite angular), fissuras na língua (glossite), queratose seborréica folicular no nariz e dermatite ano-genital, além de vascularização superficial da córnea acompanhada de intensa fotofobia (HORWITT, 1980b; BALL, 1994).

Uma deficiência grave de riboflavina pode afetar a conversão da vitamina B6 em sua coenzima, assim como outras enfermidades como a insuficiência renal crônica afetam o nível corporal da vitamina. É frequente encontrar reflexos bioquímicos de ingestas inadequadas de alimentos e sinais mais suaves da deficiência em muitas partes do mundo. As publicações mais recentes fazem referência a lactantes da Nova Guiné e a crianças e mulheres grávidas na Nigéria e Gâmbia. De forma quase invariável, a deficiência ocorre em combinação com o déficit de outras vitaminas hidrossolúveis (McCORMICK, 1991). Além disso, populações pobres nos Estados Unidos podem apresentar deficiência de riboflavina, entre outros nutrientes. A deficiência é largamente espalhada em países não desenvolvidos, mas, surpreendentemente, tem despertado pouca atenção, pois seus sintomas não causam incapacidade. A deficiência severa, que pode ser induzida experimentalmente em animais, resulta em falhas no crescimento e reprodução, dermatites e degeneração dos nervos (BRODY, 1994).

2.3. NIACINA

Niacina é o nome genérico dado para ácido nicotínico ($C_6H_5O_2N$, PM = 123,11) e nicotinamida ($C_6H_6ON_2$, PM = 122,12) (FIGURA 4).

FIGURA 4 - Estruturas dos compostos de niacina (Fonte: BALL, 1994).

Em tecidos vivos a nicotinamida é a porção ativa das coenzimas NAD (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) e NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo -fosfato). As coenzimas são formadas por um nucleotídeo (AMP) e um pseudo nucleotídeo contendo a porção nicotinamida. As formas oxidadas das coenzimas apresentam uma carga positiva (NAD^+ e $NADP^+$), enquanto as formas reduzidas que carregam 2 elétrons e um próton são representadas como NADH e NADPH. Embora as coenzimas sejam sempre associadas a apoenzimas durante a catálise, a maior parte está estocada no citoplasma ligada a proteínas (LEHNINGER, 1993; BALL, 1994).

Ácido nicotínico e nicotinamida, no estado seco e em soluções nêutras, não são afetados pelo oxigênio atmosférico, luz ou aquecimento. As coenzimas oxidadas (NAD^+ e $NADP^+$) são lábeis ao álcali e as reduzidas (NADH e NADPH) são lábeis ao ácido. Ácido nicotínico e nicotinamida têm propriedades de bases e formam sais de amônia quaternária quando em solução ácida. O ácido nicotínico, sendo anfotérico, forma sais de ácido

carboxílico, quando em solução básica, mas nicotinamida não possui propriedades ácidas (BALL, 1994).

O ácido nicotínico e a nicotinamida apresentam espectro de absorção similar na região do ultravioleta. A absorvidade é fortemente afetada pelo pH, sendo maior em solução ácida que em solução alcalina, mas o máximo permanece quase não mudado a 261 nm (BALL, 1994).

A niacina está presente nos alimentos de origem animal e vegetal, pois os tecidos vivos necessitam da vitamina na forma de nucleotídeo de nicotinamida para o metabolismo normal (BALL, 1994). As melhores fontes de niacina são representadas pelas carnes, vísceras e pescados (FRANCO, 1992). Extratos de levedura são excepcionalmente ricos em niacina, enquanto farelo de trigo, fígado, coração, rins, carnes, peixes e grãos de cereais integrais constituem fontes ricas. Frutas e vegetais fornecem quantidades úteis dependendo da quantidade ingerida. Queijos e ovos são relativamente pobres em niacina, mas o elevado teor protéico destes alimentos fornece quantidades de triptofano suficientes para oferecer altos equivalentes de niacina (BALL, 1994). Entre os vegetais, o amendoim constitui a maior fonte de niacina. Outras fontes são o pimentão, leguminosas e algumas frutas como avelã, caju e jabuticaba (FRANCO, 1992). Em tecidos animais os nucleotídeos de nicotinamida são rapidamente hidrolisados *post mortem*, estando a maioria do conteúdo de niacina da carne na forma de nicotinamida livre (Bender & Bender, 1986, citados por BALL, 1994).

Os nucleotídeos de nicotinamida, NAD e NADPH, são carreadores de prótons e elétrons em grande variedade de reações de oxido-redução e ocorrem nas formas oxidadas (NAD^+ e NADP^+) e reduzidas (NADH e NADPH). Exemplos são as reações envolvidas com a liberação de energia dos carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos e com a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e pentoses para produção de ácidos nucléicos e nucleotídeos (BRODY, 1994). Tanto o ácido nicotínico como a nicotinamida são absorvidos com rapidez no estômago e intestino (BECHGAARD & JESPERSEN, 1977).

Ácido nicotínico e nicotinamida possuem igual atividade vitamínica, sendo que o ácido nicotínico livre é convertido em amida no organismo.

Os nucleotídeos de nicotinamida são hidrolisados no intestino delgado e a nicotinamida liberada é absorvida e transportada até o fígado juntamente com o ácido nicotínico e o triptofano, onde são convertidos a NAD com a participação da vitamina B₆. O excesso de NAD é hidrolisado no fígado para nicotinamida livre, sendo liberado na circulação geral acompanhado do ácido nicotínico que não foi metabolizado. Ao alcançar os tecidos, os compostos da niacina são utilizados para síntese intracelular de NAD e NADP. Existe uma contínua renovação destes nucleotídeos no organismo e muito pouco é estocado. Excessos de niacina são convertidos no fígado a derivados metílicos que são excretados na urina (BALL, 1994).

A utilização do triptofano como precursor de NAD depende do suplemento de aminoácidos essenciais. Se o suplemento de aminoácidos cai, menos triptofano é utilizado na síntese protéica e torna-se mais disponível para conversão a NAD. Altos conteúdos de leucina dietética interferem com o metabolismo do triptofano e há um aumento da necessidade de niacina. A não disponibilidade de niacina em milho não tratado com álcali, associado à baixa proporção de triptofano na zeína (maior proteína do milho), explica a alta incidência de pelagra naquelas comunidades que vivem com dietas à base de milho (BALL, 1994).

A deficiência em niacina resulta na pelagra, que é uma desordem nutricional endêmica entre as comunidades pobres que sobrevivem à base de cereais como milho e sorgo (JACOB & SWENDSEID, 1991). O prognóstico é complicado pelos sinais de má nutrição protéico-calórica e pelo desbalanceamento de aminoácidos, particularmente pelos baixos níveis de triptofano e altos níveis de leucina. A doença é diagnosticada nos estágios iniciais por dermatites semelhantes a queimaduras solares e pela sensibilidade da pele à exposição da luz. A dermatite pode progredir até a fase de rachaduras e pigmentação marrom (BALL, 1994). Outros sintomas comuns são fraqueza, anorexia e indigestão que são seguidos pelos clássicos “três Ds”:

dermatite, diarreia e demência (LEHNINGER, 1993). As lesões causadas pela dermatite têm uma característica semelhante àquelas causadas pela exposição aos raios solares, calor ou traumas leves, sendo distribuídas pela face, pescoço, superfícies das mãos e pés. Geralmente as lesões da pelagra são bilaterais e simétricas (HORWITT, 1980a). Sintomas neurológicos incluem tremores, irritabilidade, ansiedade e depressão com delírio e demência que ocorrem em casos crônicos e severos. Devido à larga distribuição de niacina, as deficiências primárias são raras, mas as deficiências secundárias podem surgir em desordens gastrointestinais crônicas e no alcoolismo (BALL, 1994).

A pelagra era uma enfermidade frequente nos Estados Unidos e parte da Europa no início do século XX, mas na atualidade desapareceu nos países industrializados, encontrando-se apenas em alguns viciados alcoólicos. Contudo, continua endêmica na Índia e algumas áreas da China e África (JACOB & SWENDSEID, 1991).

No Brasil, 34 casos de pelagra foram observados em alcoólicos crônicos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (WANKE et alii, 1993). Os pacientes apresentaram dermatite de área expostas, alterações neuropsiquiátricas e outros sinais relacionados com a pelagra. ANTUNES et alii (1990) relataram um caso de fenilcetonúria clássica com manifestação de dermatite pelagróide, detectado no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFMG. O quadro de pelagra foi associado com a deficiente absorção intestinal de triptofano e baixa nos níveis de nicotinamida.

3. CONTEÚDO DE TIAMINA, RIBOFLAVINA E NIACINA EM CARNES

3.1. TEOR EM CARNES CRUAS

A carne é uma boa fonte de vitaminas do complexo B, de aminoácidos essenciais e de certos minerais, especialmente o ferro. Todas as vitaminas do complexo B encontram-se presentes na carne, mas tiamina, riboflavina e niacina estão em maiores quantidades. O conteúdo presente varia com a espécie do animal, idade, quantidade de gordura, tipo de alimentação do animal e tipo de corte (LAWRIE, 1985). A TABELA 2 mostra os teores de tiamina, riboflavina e niacina em diferentes tipos de carnes cruas.

Cerca de 75% da carne consiste de água e este valor é normalmente constante de um músculo para outro no mesmo animal e mesmo entre as espécies. Sendo tão abundante, a água tem grande influência na qualidade da carne em atributos como suculência, textura, cor e sabor. Na carne bovina há uma perda de 29-41% durante o cozimento (LAWRIE, 1985). É importante salientar que qualquer perda de água representa uma concentração do valor nutritivo da carne. Peso por peso, a carne cozida contém muito mais matéria sólida do que a carne crua a partir da qual ela foi preparada (CANHOS & DIAS, 1984).

Dos vários atributos de qualidade da carne, a textura e a maciez são considerados, atualmente, os mais importantes pelos consumidores. A espécie é o fator mais importante que afeta a maciez. Em geral, com o aumento da idade, há um decréscimo na maciez da carne. Além disso, há distintas diferenças na maciez conforme a localização do músculo. A gordura intramuscular ajuda a diluir o tecido conjuntivo e isso pode explicar a maior maciez nestas carnes (LAWRIE, 1985).

TABELA 2. Teores de tiamina, riboflavina e niacina em carnes cruas (valores expressos na base úmida)

Carnes	Vitaminas			Referência
	Tiamina ($\mu\text{g}/100\text{g}$)*	Riboflavina ($\mu\text{g}/100\text{g}$)*	Niacina ($\text{mg}/100\text{g}$)*	
Bovina	70	130	4,67	HUTCHISON et alii (1987a)
Vitela	106	210	4,66	RISS et alii (1983); GREENFIELD et alii (1987); NASVADI et alii (1993)
Suína (lombo)	1100	140	5,30	FRANCO (1992); HÄGG & KUMPULAINEN (1994b)
Suína (pernil)	533	160	4,60	HUTCHISON et alii (1987b); BARNA & DWORSCHÁK (1994)
Frango (peito)	107	180	7,85	SHAMSUZZAMAN et alii (1992); FRANCO (1992)
Frango (coxa e sobrecoxa)	95	185	6,70	BARBEAU & SCHNEPF (1989); FRANCO (1992)
Perú (peito)	80	140	8,00	FRANCO (1992)
Pato	100	249	5,60	FRANCO (1992)
Faisão	90	100	3,20	FRANCO (1992)
Peixe (camarão)	35	32	1,68	GORDON et alii (1979)
Peixe (atum)	44	45	15,75	GORDON et alii (1979)
Peixe (salmão)	37	114	8,42	GORDON et alii (1979)
Peixe (cavala)	140	380	5,40	FRANCO (1992); BHUIYAN (1993)
Carneiro	40	190	6,02	ONO et alii (1984)
Cabrito	250	265	3,53	JOHNSON et alii (1995)
Coelho	80	60	12,80	FRANCO (1992)
Veado	100	250	7,00	LAWRIE (1985)
Pássaro (peito)	80	87	12,58	HAM & ANG (1984); FRANCO (1992)

*Média dos teores encontrados

Entre as pessoas mais saudáveis nos Estados Unidos estão aquelas que consomem carnes (BRIGGS, 1985). Segundo NICKLAS et alii (1995), entre os americanos a carne bovina é a mais consumida (43% de todas as carnes consumidas), seguida da carne de aves (24% de todas as carnes consumidas), carne suína e peixes. Outras fontes de carnes como a de carneiro, coelho e pato são consumidas por uma parcela mais reduzida da população. Por outro lado, o cabrito, que é uma importante fonte de carne na África e Ásia, está se tornando uma fonte alternativa e atrativa em outras partes do mundo (JOHNSON et alii, 1995).

Apesar das controvérsias existentes sobre o consumo de carnes vermelhas e fatores de risco cardiovasculares, NICKLAS et alii (1995) não encontraram relação entre o consumo das carnes estudadas (bovina, suína, aves e mariscos) e a presença de colesterol e triglicerídeos no sangue. Eles concluíram que o consumo de quantidades moderadas de carnes magras, além de ser uma escolha saudável, pode ser necessário para alcançar as recomendações dietéticas. Apesar das carnes vermelhas serem atacadas como sendo uma significativa fonte de colesterol, elas contêm uma quantidade relativamente baixa deste componente (BRIGGS, 1985).

3.2. ESTABILIDADE NO PROCESSAMENTO E NA ESTOCAGEM

O interesse na estabilidade dos nutrientes durante o processamento dos alimentos tem se concentrado sobre as vitaminas, pois muitas delas podem ser seriamente afetadas pela lixiviação, calor, degradação, luz e oxidação (BORENSTEIN, 1977).

Perdas de nutrientes podem ocorrer quando os alimentos são processados, principalmente porque eles são sensíveis ao pH do meio, ao oxigênio, à luz e calor, ou combinações destes. Elementos traços (especialmente cobre e ferro) e enzimas podem catalisar estes efeitos (HARRIS, 1977).

O processamento pelo calor é um dos mais importantes métodos desenvolvidos pelo homem para aumentar o período de estocagem dos gêneros alimentícios. Apesar deste método aumentar a disponibilidade dos alimentos para o consumidor, pode haver uma redução no teor de nutrientes presentes originalmente (LUND, 1977). No caso das vitaminas, este tipo de processamento pode ser controlado para maximizar a retenção, sem prejudicar os aspectos sensoriais e de segurança (RYLEY & KAJDA, 1994).

O conteúdo de vitaminas de um produto processado depende da qualidade da matéria prima original, da extensão e natureza do processamento (incluindo resfriamento e reaquecimento) e das condições de estocagem (HILL, 1994).

Algumas vitaminas do complexo B e a vitamina C são mais susceptíveis a perdas. Tiamina e ácido fólico são as vitaminas mais sensíveis do complexo B. Assim, a vitamina C e, mais recentemente, a tiamina e ácido fólico são frequentemente usados como indicadores da severidade do processamento dos alimentos; assim, assumindo-se que se estes nutrientes estão bem retidos nos alimentos, a porcentagem de retenção de todos os outros nutrientes é tão ou mais alta. O uso da água de cocção em molhos é aconselhável para recuperar vitaminas hidrossolúveis perdidas por lixiviação (SELMAN, 1994).

A perda da biopotência das vitaminas pode ser devida a mudanças químicas, resultando em compostos de menor atividade, a ligações químicas irreversíveis a outros compostos presentes nos alimentos, ou à degradação para produtos inativos. Oxigênio, luz e complexação com metais frequentemente desempenham um papel importante no aceleração ou promoção da perda. Mudanças químicas e difusão acontecem mais rapidamente quanto maior é a temperatura utilizada. Dentro deste contexto, muitas providências podem ser tomadas para garantir que o produto final tenha uma alta qualidade com relação ao conteúdo de vitaminas (RYLEY & KAJDA, 1994).

A tiamina fosforilada e ligada à proteína presente na maioria dos alimentos é completamente estável quando amostras de alimentos em meio de HCl 0,1N são aquecidas a 95-100°C ou autoclavadas a 121-123°C por 30 minutos (BALL, 1994). Quando o pH do meio é aumentado, a vitamina torna-se bastante susceptível à desativação pelo aquecimento e reações químicas. Oxidações suaves produzem tiamina dissulfeto sem perda da atividade (BOBBIO & BOBBIO, 1995). O conteúdo da tiamina nos alimentos é protegido pela matriz estrutural do próprio alimento mantendo-se estabilizado através de ligações com proteínas (BALL, 1994).

As perdas de tiamina nos alimentos dependem de condições como pH, temperatura e conteúdo de umidade (BALL, 1994). BRIOZZO et alii (1987) verificaram um aumento significativo na retenção de tiamina em purês de carne bovina e suína reduzindo o pH do meio.

Meios alcalinos durante o processamento e cozimento promovem grandes perdas de tiamina. A tiamina pode também ser desativada pelo dióxido de enxofre ou sulfitos (tratamento utilizado para retardar reações de escurecimento), resultando na perda de sua atividade biológica (BOBBIO & BOBBIO, 1995), e ser degradada por irradiação ultravioleta. SKURRAY et alii (1986) avaliaram o conteúdo de tiamina em carne bovina marinada com vinho, bicarbonato de sódio ou molho de soja, após cocção. A destruição de tiamina foi proporcional ao conteúdo de dióxido de enxofre contido no vinho. A maior perda de tiamina (75%) ocorreu quando se utilizou um vinho branco contendo 450 ppm de dióxido de enxofre. Os vinhos vermelhos não continham dióxido de enxofre e não houve perda de tiamina após cocção. O uso do bicarbonato de sódio e do molho de soja resultaram em significantes perdas de tiamina (55 e 44%, respectivamente).

Os cofatores de flavina naturalmente presentes nos tecidos biológicos são estabilizados através de ligações com proteínas, e a riboflavina adicionada aos alimentos é protegida pela matriz estrutural alimentar (BALL, 1994). A riboflavina é estável ao calor em meio ácido e na presença de agentes

levemente oxidantes. Em soluções nêutras ela é moderadamente estável ao calor (BORENSTEIN, 1977; PAULUS, 1989). Ela é muito sensível à luz e a taxa de destruição aumenta com o aumento do pH e temperatura (HARRIS, 1977; BEKBÖLET, 1990).

De acordo com BORENSTEIN (1977), a niacina é, talvez, a mais estável das vitaminas. Ela tem, geralmente, uma excelente estabilidade ao calor e à luz na faixa inteira de pH dos alimentos. Contudo, deve ser lembrado que a niacina, sendo uma vitamina hidrossolúvel, pode ser perdida no branqueamento, operações de lavagem e sucos resultantes da cocção.

A niacina, assim como seu aminoácido precursor, é estável durante o processamento comercial, estocagem e cozimento doméstico dos alimentos. Perdas de 25-30% ocorrem durante a maturação da carne (primeiros dias de *post mortem*) devido a alterações bioquímicas, mas nenhuma perda significativa foi detectada durante congelamento subsequente (BALL, 1994).

Enquanto a lixiviação parece ser a principal causa de perdas de riboflavina e niacina, a tiamina é perdida por degradação e lixiviação (RYLEY & KAJDA, 1994).

Durante a preparação das carnes, especialmente pelo aquecimento, geralmente há perda de umidade e de vitaminas. A porcentagem destas perdas depende da temperatura, do tempo e do método do processamento utilizado (AWONORIN & ROTIMI, 1991).

Diversos métodos têm sido utilizados na preparação das carnes, como cozer sem imersão ou com imersão em água, grelhar, fritar e assar. Como as condições de preparo (temperatura e tempo de cocção, tipo de equipamento, forma de fatiamento) são as mais variadas, a literatura relata uma variação bastante grande nos teores de vitaminas perdidos nestas preparações. Além disso, a forma de expressão dos valores encontrados, na maioria das vezes na base úmida, dificulta a avaliação das perdas. Assim, alguns pesquisadores têm relatado aumento nos teores de riboflavina e niacina em carne bovina e suína após cocção (HUTCHISON et alii, 1987a; HUTCHISON et alii, 1987b; GREENFIELD et alii, 1987; NASVADI et alii, 1993).

Por outro lado, estudos que utilizaram a expressão dos valores na base seca puderam avaliar melhor a estabilidade de certas vitaminas. COOKSEY et alii (1990) encontraram perda média de 44% nos teores de tiamina em carne bovina assada, empacotada à vácuo e cozida em banho de água e defumada. A retenção de tiamina em iscas de carne bovina preparadas rapidamente (3 minutos) foi de 62%, 58% e 50% quando se utilizou o método refogar, cozer no forno de microondas e grelhar, respectivamente (YANG et alii, 1994). BARBEAU & SCHNEPF (1989) encontraram 80% e 92% de retenção de tiamina em carne de frango assada no forno convencional e de forno de microondas, respectivamente. Esta tendência foi confirmada por UHEROVÁ et alii (1993), ao analisar tiamina em carne suína e de frango. Eles relataram retenção de 64% em carne suína e 48% em carne de frango assadas no forno convencional, ao passo que as taxas foram de 91% em carne suína e 87% em carne de frango assadas no forno de microondas, mostrando claramente que o forno de microondas foi menos destrutivo para esta vitamina.

O método de cocção por tempo prolongado (76,5°C por 8 horas), utilizando panela elétrica ("slow cooker") foi avaliado por PETERS et alii (1983). Os níveis de tiamina retidos em carne de galinha por este método foram de 41,6%, em comparação com a cocção em forno convencional (72,5%).

A temperatura interna utilizada para assar peças de carnes também influencia os teores de vitaminas do complexo B retidos. BATENHORST et alii (1995) observaram que houve maior retenção de tiamina em carne suína assada com temperatura interna de 71°C (54%) do que aquela assada com temperatura interna de 82°C (48%).

AWONORIN et alii (1996) relataram porcentagens de retenção para tiamina, riboflavina, niacina e umidade variando de 58 a 63%; 73 a 79%; 83 a 87% e 74 a 80%, respectivamente, em carne suína assada. As taxas de retenção foram de 72 a 78%; 72 a 83% e 83 a 93% e 78 a 84%, para tiamina, riboflavina, niacina e umidade, respectivamente, em carne bovina assada. As perdas de vitaminas foram maiores nas carnes assadas no estado congelado,

sendo também mais longo o tempo de cocção destas amostras quando comparadas com aquelas assadas no estado descongelado. Os autores concluíram, ainda, que não houve diferença significativa entre os teores de retenção de tiamina, riboflavina e niacina quando as carnes bovina e suína cruas e assadas foram estocadas a -10°C e -25°C por períodos de 30, 60 e 90 dias.

Para carne de peru assada em forno, HSIEH et alii (1991) encontraram 71%, 67% e 63% de tiamina retida quando se utilizou temperaturas de 105, 135 e 165°C , respectivamente. Um estudo efetuado por ONO et alii (1984) mostrou uma retenção média de 52% de tiamina, 82% de riboflavina e 75% de niacina em carne de carneiro submetida a diferentes métodos de cocção.

De acordo com KILCAST (1994), a tiamina é a vitamina hidrossolúvel mais sensível ao processo de irradiação. Em carne de frango, doses de irradiação entre 1 e 10 kGy podem levar a perdas de tiamina de 19 a 57%. Perdas similares foram encontradas em outras carnes e peixes. Nenhuma perda de riboflavina foi encontrada em carne suína e de frango irradiadas com doses menores que 6,6 kGy, a temperaturas entre -20 e 20°C . Perdas de niacina durante a irradiação com doses até 5 kGy, a diferentes temperaturas, não foram encontradas em carne suína, de frango e peixe. FOX et alii (1997) encontraram perdas de tiamina em carne suína irradiada, mas o conteúdo de riboflavina não foi afetado.

O processo de cocção por extrusão pode causar destruição e assim reduzir os teores de tiamina, riboflavina e niacina nos produtos (KILLEIT, 1994).

BHUIYAN et alii (1993), estudando o conteúdo de vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis em peixes crus e defumados, não encontraram perdas significativas devidas ao processo de defumação.

As condições de estocagem dos alimentos têm uma influência decisiva sobre a qualidade e o conteúdo de vitaminas. Por causa da susceptibilidade de várias vitaminas é necessário utilizar baixas temperaturas de estocagem, além de estocar os produtos por curtos períodos de tempo. Para períodos de

estocagem mais longos, os produtos deveriam ser empacotados adequadamente, utilizando, se possível, uma atmosfera modificada (PAULUS, 1989).

O processo de congelamento, por si só, não afeta o valor nutritivo do alimento. É durante os passos de preparo antes do congelamento, particularmente durante o branqueamento, que perdas das vitaminas mais lábeis podem acontecer. As vitaminas do complexo B, exceto ácido fólico, são mais estáveis que a vitamina C durante o período de estocagem (SELMAN, 1994). Nenhuma perda significativa de riboflavina, tiamina e niacina foi encontrada por GORDON et alii (1979) durante a estocagem de mariscos a 0° C por 6 meses.

3.3. EFEITO DOS PROCEDIMENTOS DE PREPARO EM SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO

O desenvolvimento de novos e saudáveis produtos para Serviços de Alimentação Institucionais têm indicado a importância da retenção de nutrientes durante a preparação e processamento dos alimentos (HSIEH et alii, 1991). No entanto, a literatura especializada evidencia a escassez de estudos de pesquisa relatando os efeitos da preparação em grande escala sobre a retenção dos nutrientes.

As perdas de nutrientes durante a estocagem dos alimentos após cocção também necessitam ser avaliadas. Balcões térmicos ou refrigerados e equipamentos de transporte aquecidos são frequentemente utilizados pelos Serviços de Alimentação como forma de melhor atender aos clientes. Neste caso, as variáveis tempo e temperatura precisam ser analisadas (LACHANCE, 1977).

No Brasil, a clientela dos Serviços de Alimentação não dispensa as preparações à base de carnes, sendo que sua inclusão diariamente nos cardápios é defendida enfaticamente pelos usuários. Assim, a utilização das carnes nestes locais envolve diversos profissionais e requer o controle do

valor nutritivo e o conhecimento de normas higiênico-sanitárias sobre as condições de transporte, armazenamento, manuseio e preparo (O BIFE...1991). Além disso, o mercado de carnes vem sendo disputado com garra pelos fornecedores. As indústrias investem no setor, desenvolvendo serviços e produtos que atendam as necessidades dos Serviços de Alimentação (DISPUTA...1991). Todavia, informações sobre a estabilidade das vitaminas durante os métodos de preparação das carnes neste setor são muito reduzidas, necessitando ser ampliadas.

Os métodos de cocção assar, grelhar, refogar, fritar, cozer com ou sem imersão em água, utilizados em uma grande variedade de alimentos, incluindo as carnes, são frequentemente utilizados a nível doméstico e em restaurantes como forma de variar as preparações e evitar a monotonia nos cardápios.

Em relação às carnes bovina, suína e ovina, alguns métodos de cocção foram estudados. Tucker et alii (1946), citados por LACHANCE (1977), relataram retenção de 77% de tiamina e de 92% de riboflavina em carne bovina cozida a 58°C sob imersão em água, enquanto Causey et alii (1950), citados por LACHANCE (1977), relataram retenções acima de 80% para tiamina e riboflavina em carne bovina moída congelada e cozida a 74°C. Comparações baseadas em três tipos de carnes mostraram que as retenções de tiamina (média de 70%) em carne bovina e suína cozidas não foram diferentes estatisticamente, mas em carne ovina cozida foram de 62%. As retenções de riboflavina na carne bovina cozida (92%) foram maiores que nas carnes suína e ovina cozidas (82%).

Carnes bovina e suína assadas a 150°C com uma temperatura interna de 80°C retiveram, respectivamente, 61% e 64% de tiamina, enquanto que aquelas assadas a 205°C e com uma temperatura interna de 98°C retiveram somente 47% e 54%, respectivamente (LACHANCE, 1977).

Mais recentemente, BOWERS et alii (1987) avaliaram o conteúdo de vitaminas do complexo B em carne de frango frita em restaurantes "fast-food". Os valores de tiamina para peito e coxa variaram, respectivamente, de 62 a 136 µg/100g e de 78 a 122 µg/100g. Para riboflavina os teores em peito e coxa

foram de 176 a 205 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e 249 a 328 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectivamente; enquanto que para niacina estes valores estiveram entre 6,32 a 8,46 e 3,86 a 5,57 $\text{mg}/100\text{g}$. No entanto, a análise destes nutrientes não foi efetuada nas correspondentes amostras cruas, impossibilitando a avaliação da estabilidade durante o processamento.

DAWSON et alii (1988) determinaram os teores de riboflavina, niacina e tiamina em carne bovina, suína e de carneiro após diferentes métodos de processamento em grandes quantidades pelo calor. Especialmente para riboflavina e niacina, a maioria dos valores encontrados nos três tipos de carne foram maiores nas amostras submetidas à cocção do que naquelas cruas. A não determinação dos teores de umidade antes e após cocção e a expressão dos resultados na base úmida dificultou uma análise correta da estabilidade destas vitaminas nas carnes estudadas.

Um estudo bastante interessante foi efetuado por AWONORIN & ROTIMI (1991) avaliando o efeito do tempo e temperatura do forno sobre as perdas de vitaminas do complexo B em carne bovina e suína assadas em grandes quantidades. As perdas de tiamina se situaram entre 20 e 40% em carne suína e entre 15 e 25% em carne bovina. As perdas de riboflavina variaram de 10 a 25% em carne bovina, quando comparada com 15 a 40% em carne suína. Niacina foi mais estável que as outras vitaminas em todas as combinações de tempo e temperatura utilizadas, sendo que as perdas estiveram entre 5 a 10% em carne bovina e 10 a 16% em carne suína. Além disso, as perdas de umidade em carne suína (22-45%) foram maiores que em carne bovina (15-30%) durante o mesmo período de cocção. De uma maneira geral, as perdas de tiamina e riboflavina foram bastante dependentes do calor, perda de umidade e do tamanho das amostras.

4. METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE TIAMINA, RIBOFLAVINA E NIACINA

4.1. MÉTODOS GERAIS

As técnicas analíticas que têm sido mais aplicadas na determinação quantitativa de tiamina, riboflavina e niacina em alimentos são as físico-químicas e as microbiológicas (BALL, 1994).

Os métodos biológicos, também empregados, utilizam animais, principalmente ratos, onde se mede a vitamina aproveitada pelo organismo. Doses de vitaminas são dadas para determinados grupos com a finalidade de causar carência ou recuperação. Estes métodos podem ser úteis para estabelecer a atividade biológica ou biodisponibilidade de uma nova preparação. Contudo, podem ser susceptíveis a grandes variabilidades e requerem grandes quantidades de material e longos períodos de tempo para se obter resultados (GUBLER, 1991).

Os métodos microbiológicos estão baseados na necessidade absoluta de certos microrganismos por vitaminas específicas. Desta forma, estes microrganismos só podem se multiplicar quando as vitaminas estiverem presentes no meio de cultivo. Os microrganismos crescem proporcionalmente à quantidade de vitaminas presentes. O crescimento ou multiplicação celular é determinado através de medida turbidimétrica. Estes métodos são, ainda, bastante utilizados na determinação de ácido nicotínico em alimentos. As bactérias lácticas são as mais comumente utilizadas em ensaios microbiológicos, podendo ser empregados também leveduras e protozoários. Ensaio com bactérias lácticas são preferidos porque suas necessidades nutricionais são específicas, crescem rapidamente em meio de cultivo sintético e semi-sintético e não são patogênicas. *Lactobacillus plantarum* é utilizado para determinação de niacina total e *Leuconostoc mesenteroides*, para ácido nicotínico adicionado (BALL, 1994).

Os procedimentos analíticos gerais para determinação de vitaminas do complexo B nos alimentos podem ser divididos em seis estágios: amostragem, extração, purificação, mensuração, cálculo dos resultados e interpretação dos dados. Outros fatores a serem considerados são a manutenção da integridade

da amostra, estocagem da amostra e preparação da amostra para análise (BALL, 1994).

4.2. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

Os métodos físico-químicos são mais aplicáveis às determinações de rotina das vitaminas, pois são geralmente mais precisos, mais rápidos e econômicos (AGOSTINI & GODOY, 1996). Nesta categoria estão incluídos os métodos espectrofotométricos, os colorimétricos, os fluorimétricos e os cromatográficos.

Os métodos espectrofotométricos são mais utilizados para análises de preparações farmacêuticas, não sendo satisfatoriamente utilizados para análise de alimentos em função de sua baixa sensibilidade e da presença de substâncias interferentes (BALL, 1994).

Os métodos fluorimétricos são altamente sensíveis, sendo bastante utilizados para análises de tiamina e riboflavina em alimentos. O método fluorimétrico para determinação de tiamina (AOAC, 1995a) é baseado na conversão de tiamina para seu produto de oxidação fluorescente, tiocromo, pela reação com ferricianeto de potássio alcalino ($K_3Fe(CN)_6$). Cloreto de mercúrio e brometo cianogênico também podem ser empregados, mas são tóxicos e, portanto, perigosos para a saúde (LASCHI-LOQUERIE et alii, 1992). Sob condições padronizadas, o método é sensível e específico. A especificidade é alcançada pelo uso da cromatografia e extração em isobutanol, ambos agindo como passos de purificação. O último passo contribui para a sensibilidade, pois tiocromo é mais fluorescente em isobutanol que em soluções aquosas (BALL, 1994). A fluorescência nativa apresentada pela riboflavina permite que esta vitamina seja avaliada fluorimetricamente sem a necessidade de derivatização química. O método da fluorescência direta tem sido adotado pela AOAC (1995b) para determinação de riboflavina total em alimentos.

Os métodos colorimétricos podem ser utilizados para determinação de niacina em alimentos. Contudo, possuem baixa especificidade, os complexos

coloridos formados para medida possuem baixa estabilidade e certos reagentes usados, como o brometo cianogênico, são tóxicos e difíceis de manusear (BALL, 1994). Apesar disso, ainda é um método oficial, recomendado pela AOAC (1995c).

O estudo da literatura publicada nos últimos anos sugere que os métodos cromatográficos têm sido uma indispensável ferramenta para determinações rápidas e específicas de vitaminas em alimentos. O grande desenvolvimento na determinação simultânea de diferentes vitaminas é devido à aplicação de métodos cromatográficos, embora o principal problema nesta determinação seja a padronização das condições de extração, características físico-químicas e estabilidade de cada vitamina (RIZZOLO & POLESELLO, 1992).

4.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A literatura recente confirma que há uma tendência para o uso da CLAE como técnica padrão para determinação qualitativa e quantitativa das vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis (RIZZOLO & POLESELLO, 1992). Ultimamente, este método tem sido o método mais aplicado para a análise de vitaminas em alimentos (COULTATE et alii, 1995).

A determinação de vitaminas do complexo B em preparações farmacêuticas multivitamínicas ou premix têm sido facilmente efetuadas por CLAE devido à simplicidade da matriz e ao alto conteúdo das fórmulas, não necessitando de procedimentos de extração e de purificação (KOTHARI & TAYLOR, 1982; DONG et alii, 1988; CHASE & SOLIMAN, 1990). A análise de vitaminas por CLAE em alimentos, especialmente o conteúdo natural, ainda está sendo pesquisada, devido a dificuldades nas etapas de extração das vitaminas e análise cromatográfica.

4.2.1.1. Procedimentos para Extração

O estágio de extração serve para isolar a vitamina da molécula coenzimática e liberá-la de sua associação com proteínas ou carboidratos. O

procedimento de extração deve ser capaz de liberar as formas ligadas da vitamina para subsequente quantificação. As pesquisas têm mostrado que não há processo de extração universal para as vitaminas. O problema é também composto pela natureza complexa e variável da matriz alimentar. Os resultados analíticos devem, portanto, ser interpretados com base no conhecimento da amostra e do processo de extração empregado (BALL, 1994).

Quando o objetivo é determinar vitaminas adicionadas em alimentos fortificados, a extração é relativamente fácil. Nestas circunstâncias é possível usar um procedimento que pode extrair duas ou mais vitaminas simultaneamente (BALL, 1994; AGOSTINI & GODOY, 1996).

Para análise do conteúdo natural, o procedimento de extração geralmente envolve extensiva hidrólise ácida das amostras com a finalidade de romper os complexos protéicos, resultando num extrato que contém também quantidades apreciáveis de compostos interferentes (DAWSON et alii, 1988; HÄGG & KUMPULAINEN, 1994a e 1994b).

A conversão das formas fosforiladas das vitaminas em suas formas livres é de grande importância para medir o conteúdo total das vitaminas em análise. Para tanto, a hidrólise enzimática com fosfatases é essencial para liberação das vitaminas, sendo a clara-díastase e takadíastase bastante utilizadas para essa finalidade (BALL, 1994). A não utilização da hidrólise enzimática resulta em resultados muito baixos na análise de tiamina e riboflavina em alimentos variados e de niacina em legumes (VIDAL VALVERDE & RECHE, 1991). HÄGG (1994) avaliou o efeito de cinco enzimas disponíveis no comércio na extração de tiamina e riboflavina em alimentos, obtendo resultados significativamente superiores para a clara-díastase da marca Fluka. O método utilizado pela autora foi considerado acurado e preciso quando testado para outros alimentos e materiais de referência (HÄGG & KUMPULAINEN, 1994a e 1994b).

Para determinação de tiamina total, o procedimento de extração geralmente envolve uma hidrólise ácida e uma hidrólise enzimática. A hidrólise ácida a quente tem como objetivo liberar a tiamina e ésteres de tiamina fosfato de sua associação com proteínas (BALL, 1994). Nesta etapa a amostra é autoclavada a 121 °C por 30 minutos com HCl 0,1N (AOAC, 1995a). Formas ligadas de tiamina presentes em alimentos de origem animal são estáveis sob estas condições. A hidrólise enzimática objetiva transformar ésteres de tiamina fosfato para tiamina livre (BALL, 1994).

A técnica utilizada para determinação de riboflavina total é ditada pela intensa fluorescência das três flavinas (FMN, FAD e riboflavina livre). FMN e riboflavina livre apresentam intensidade de fluorescência iguais sob uma mesma base molar, enquanto a fluorescência do FAD é muito menos intensa. Portanto, é necessário liberar as flavinas de sua íntima associação com as proteínas e converter completamente FAD para FMN e esta para riboflavina livre. Este passo é conseguido pela autoclavagem da amostra a 121 °C por 30 minutos com ácido mineral diluído (normalmente HCl 0,1N) a pH menor que 3 (AOAC, 1995b). As flavinas ligadas são liberadas pela desnaturação das proteínas e quaisquer enzimas que poderiam estar presentes são inativadas. Com o uso da CLAE, FMN e riboflavina liberadas durante o tratamento ácido podem ser cromatograficamente separadas. Assim, há duas maneiras de extração na determinação de riboflavina total por CLAE. A primeira maneira é converter toda FMN em riboflavina livre e então calcular riboflavina total baseado no pico da riboflavina. A segunda maneira é calcular FMN e riboflavina separadamente e relatar os resultados somados como riboflavina total. Na primeira maneira a conversão de FMN para riboflavina somente pode ser alcançada pela hidrólise enzimática. É essencial checar se houve a conversão completa verificando se há presença de um pico correspondente a FMN. Na segunda maneira a hidrólise enzimática é omitida (BALL, 1994). A desvantagem é que há dificuldade de se conseguir padrões da FMN, além de sua pureza estar entre 53 e 71% (RUSSEL & VANDERSLICE, 1992).

Os termos "niacina total" e "niacina livre" são definidos pelos métodos de extração empregados na análise. Niacina total geralmente se refere à niacina que é extraível pela autoclavagem da amostra com álcali ou ácido 1N; niacina livre é definida como niacina extraível pela autoclavagem com ácido 0,1N (BALL, 1994). A autoclavagem com H_2SO_4 por 30 minutos a 121°C (AOAC, 1995c) libera a nicotinamida de sua forma coenzimática. O tratamento é também suficiente para liberar ácido nicotínico ligado que pode estar presente. O uso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1N também tem sido empregado (TYLER & GENZALE, 1990). Durante a autoclavagem com ácido ou base 1N, a nicotinamida liberada é hidrolisada para ácido nicotínico. ROY e MERTEN (1983) encontraram que a autoclavagem de amostras de carnes com HCl 1N em presença de uréia resultou em um aumento significativo do conteúdo de niacina quando comparado à extração com ácido 1N sozinho. Para a determinação de ácido nicotínico adicionado ou nicotinamida como uma forma de fixar a cor em carnes frescas, amostras de carnes foram extraídas pela ebulição com etanol 96% e misturadas com água (HAMANO et alii, 1988).

Mais comumente, a extração de vitaminas do complexo B é feita com o uso de HCl diluído. Alguns pesquisadores utilizaram o H_2SO_4 diluído em substituição ao HCl (TOMA & TABEKHIA, 1979; SKURRAY, 1981). A niacina pode ser extraída por hidrólise ácida, geralmente HCl ou H_2SO_4 1N (ROY & MERTEN, 1983; NIEKERK et alii, 1984; DAWSON et alii, 1988; VIDAL-VALVERDE & RECHE, 1991); contudo, a hidrólise alcalina também tem sido utilizada (TYLER & GENZALE, 1990; HIRAYAMA & MARUYAMA, 1991; MARSHALL et alii, 1997).

4.2.1.2. Purificação do Extrato

A purificação ou limpeza do extrato é importante para retirar, tanto quanto possível, os compostos interferentes e assim facilitar a separação e quantificação adequada da vitamina em análise por CLAE. Na determinação de tiamina derivatizada para tiocromo por fluorescência ou CLAE, o uso do isobutanol funciona como um eficiente passo de purificação (BALL, 1994).

O uso da precipitação no ponto isoelétrico, do acetato de chumbo (MUNOZ et alii, 1994), do ácido tricloroacético combinado com tratamento térmico adequado (ANG & MOSELEY, 1980; FELLMAN, 1982; DAWSON et alii, 1988) e, mais recentemente, do metanol combinado com refrigeração (AGOSTINI & GODOY, 1996), permitem precipitar as proteínas dos extratos alimentares, promovendo uma purificação dos mesmos.

Os cartuchos SEP-PAK C18 têm sido bastante utilizados para purificação e concentração dos extratos de alimentos variados para determinação de vitaminas. Antes do uso os cartuchos são condicionados com solução tampão ou outro reagente, sendo as vitaminas eluídas com metanol ou etanol (FELLMAN et alii, 1982; WIMALASIRI & WILLS, 1985; LAVIGNE et alii, 1987; TILER & GENZALE, 1990; OLLILAINEN et alii, 1990; BARNA & DWORSCHÁK, 1994).

As colunas de troca iônica são indicadas para purificação dos extratos para determinação de tiamina e do ácido nicotínico (VIDAL VALVERDE & RECHE, 1991; HIRAYAMA & MARUYAMA, 1991). Além dos métodos de purificação citados, o uso de dispositivos de troca de colunas tem sido uma alternativa rápida e simples no preparo das amostras, prevenindo oxidação de algumas vitaminas. Este procedimento tem se tornado importante no trabalho de rotina dos laboratórios de controle de alimentos onde é necessário simplicidade no preparo das amostras, velocidade nas determinações com segurança e rapidez (RIZZOLO & POLESELLO, 1992).

4.2.1.3. Derivatização

A derivatização de algumas vitaminas pode ser necessária para facilitar o uso de uma detecção mais adequada (fluorimétrica) e/ou um tipo de cromatografia mais adequado. A derivatização pré-coluna e a pós-coluna podem ser empregadas (BALL, 1994). Para determinação de tiamina, a derivatização com ferricianeto de potássio alcalino tem sido a mais empregada (OHTA et alii, 1993). FERNANDO & MURPHY (1990) propuseram a neutralização da tiamina oxidada pré-coluna com H_3PO_4 concentrado para

assegurar um pH a um nível aceitável para a coluna C₁₈ e eliminar degradação alcalina do tiocromo para dissulfeto.

No caso da determinação de tiamina por CLAE, a derivatização pós-coluna foi usada por MAURO & WETZEL (1984), WIMALASIRI & WILLS (1985), OHTA et alii (1993). Outros pesquisadores preferiram a derivatização pré-coluna (SKURRAY, 1981; FELLMANN et alii, 1982; HÄGG & KUMPULAINEN, 1993; OLLILAINEN, 1993; FINGLAS & FAULKS, 1984). A derivatização pré-coluna emprega dois passos adicionais na preparação da amostra: a oxidação do extrato e a purificação em isobutanol ou cartuchos Sep Pak C₁₈. Por esta razão, riboflavina e tiamina são normalmente determinadas sucessivamente e não simultaneamente. Esta desvantagem não existe quando a derivatização pós-coluna é utilizada. Entretanto, este último método requer o uso de cromatografia de íons pareados e mudanças dos comprimentos de onda de excitação e emissão durante a corrida cromatográfica. Além disso, a presença de excesso do agente oxidante na fase móvel introduz impurezas fluorescentes que diminuem a sensibilidade do método de detecção. Outras desvantagens da derivatização pós-coluna são o aumento dos tempos de retenção, alargamento dos picos e a necessidade de um segundo sistema de bombeamento. Sendo assim, a derivatização pré-coluna é mais vantajosa para análise de tiamina (HASSELMANN et alii, 1989).

4.2.1.4. Análise Cromatográfica

Os principais tipos de cromatografia que têm sido utilizados na análise de vitaminas do complexo B são a cromatografia de fase reversa e a cromatografia de interação iônica (BALL, 1994).

A maioria das separações que envolvem a cromatografia de fase reversa têm utilizado empacotamento baseado em micropartículas de sílica, na qual a fase estacionária não polar, geralmente octadecilsilano (ODS), é quimicamente ligada à superfície da sílica através de pontes de siloxano (SNYDER & KIRKLAND, 1979, BALL, 1994).

A cromatografia de interação iônica ou cromatografia de íons pareados se baseia na adição de íons anfifílicos na fase móvel, com a finalidade de influenciar a retenção de compostos iônicos presentes na amostra. A retenção dos analitos com carga oposta à do reagente íon pareante é aumentada, enquanto aquela dos analitos com a mesma carga é diminuída, sendo negligenciável a influência na retenção dos compostos destituídos de carga (HUNG & TAYLOR, 1981; DONG et alii, 1988; BARTHA & STAHLBERG, 1994). Esta técnica emprega os mesmos tipos de empacotamento de coluna e fases móveis (água/solventes orgânicos) utilizados na cromatografia de fase reversa. O pH da fase móvel é ajustado para melhorar a ionização dos solutos ionogênicos e o tempo de retenção é controlado pela adição na fase móvel de um agente de interação iônica anfifílico com carga oposta à do analito (BALL, 1994). Para a determinação de solutos aniônicos, uma grande quantidade de aminas orgânicas tem sido empregada como agentes de interação iônica. Um dos mais populares é o fosfato de tetrabutilamônio, que é comercialmente disponível como PIC A, devendo ser utilizado em pH em torno de 7,0 (LAVIGNE et alii, 1987). Para separação de solutos catiônicos, tais como aminas protonadas, uma faixa dos alquil sulfonatos (PIC B) tendo a fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SO}_4$ ($n=4-7$) predomina. A seleção do reagente apropriado é baseada no tempo de retenção do soluto, que aumenta com o aumento do comprimento da cadeia do alquil. Soluções de 5 mM em tampão pH 3,5 são as mais apropriadas (SNYDER & KIRKLAND, 1979). Os alquil sulfonatos têm aplicação na determinação de tiamina, riboflavina, nicotinamida e vitamina B₆ (LAVIGNE et alii, 1987; ÖTLES & HISIL, 1993; BARNA & DWORSCHÁK, 1994). Como a niacina contém grupos ácidos e básicos, o reagente íon-pareante pode ser um alquil sulfonato (TYLER & GENZALE, 1990) ou um sal de amônia quaternária (TRUGO et alii, 1985; VIDAL-VALVERDE & RECHE, 1991).

Diversas variáveis envolvendo a fase móvel como o tipo e a concentração do reagente íon pareante e do modificador orgânico, a força iônica e o pH podem ser utilizados para controlar a retenção do soluto e a

seletividade da separação. Alguns componentes da fase reversa, como o tamanho do poro da partícula de sílica, a capacidade de adsorção (comprimento da cadeia alquílica) e a capacidade de dissociação dos grupos silanóis, também afetam a retenção dos compostos (BARTHA & VIGH, 1983; BARTHA et alii, 1984; BARTHA & STAHLBERG, 1994). A adição de trietilamina na fase móvel (0,10 a 0,13%) controla a resolução e melhora muito as formas dos picos (DONG et alii, 1988), contribuindo também como uma base de competição para tornar acessível a superfície dos grupos silanóis e reduzir caudas nos picos (ROOS & LAU-CAM, 1986).

As colunas analíticas mais utilizadas para análise de vitaminas em CLAE são as convencionais (150 ou 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro), recheadas com fase estacionária apolar. Recentemente surgiram as colunas de calibre estreito - "microbore" ou "narrow-bore" - (150 mm de comprimento x 2,1 mm de diâmetro), com potencial excelente para análise de vitaminas. Estas colunas possuem vantagens importantes como a utilização de reduzidos volumes de amostra e de fase móvel, maior compatibilidade para uso de detectores mais sensíveis, como os detectores de massa que identificam o componente analisado. Além disso, estas colunas proporcionam uma separação eficiente, economia, maior velocidade e sensibilidade (RIZZOLO & POLESELLO, 1992; BLANCO et alii, 1994).

Tiamina, riboflavina e niacina são, geralmente, analisadas por eluição isocrática, sendo que alguns estudos fizeram uso da eluição por gradiente (KOTHARI & TAYLOR, 1982; BLANCO et alii, 1994; AGOSTINI & GODOY, 1996). As fases móveis mais comuns são compostas por água ou soluções tampão e solventes orgânicos como metanol e acetonitrila (RIZZOLO & POLESELLO, 1992). Para determinações em matrizes alimentares mais complexas ou determinações simultâneas, o uso de agentes de interação iônica tem facilitado as análises (WIMALASIRI & WILLS, 1985; VIDAL-VALVERDE & RECHE, 1991).

4.2.1.5. Detecção

Dois tipos de detectores são mais empregados para monitorar o efluente da coluna em sistemas de CLAE para a determinação de tiamina, riboflavina e niacina em amostras alimentares. São eles o detector de absorvância (simples ou de arranjos de fotodiodo) e o detector de fluorescência. O monitoramento da absorção é indicado para detecção de niacina. A detecção fluorimétrica proporciona uma maior sensibilidade e seletividade para detecção de tiamina (tiocromo) e riboflavina (BALL, 1994). A detecção por fluorescência oferece a vantagem da presença de poucos compostos interferentes (FELLMAN et alii, 1982), enquanto técnicas por detecção no ultravioleta possuem baixa sensibilidade e são comumente sujeitas a muitos compostos interferentes em alimentos com matrizes complexas (MAURO & WETZEL, 1984).

Por causa da complexidade da matriz alimentar a detecção simultânea em alimentos fortificados é geralmente limitada a duas ou três vitaminas. Entretanto, recentemente, AGOSTINI & GODOY (1996) desenvolveram uma metodologia para determinação de cinco vitaminas do complexo B em alimentos enriquecidos, por detecção na região UV, que se mostrou eficiente, simples e rápida. A situação em alimentos não fortificados é, naturalmente, mais complicada devido à dificuldade de extração das vitaminas, de suas formas ligadas e pelos baixos níveis presentes em tais alimentos (BALL, 1994). Embora a CLAE permita a separação da tiamina e riboflavina sem dificuldades, a detecção simultânea é um problema. Ambas as vitaminas absorvem na região UV, mas não o suficiente para serem detectadas em baixos níveis nos alimentos (HASSELMANN et alii, 1989). Há, portanto, pouca possibilidade para determinação de mais de uma vitamina ao mesmo tempo, exceto tiamina e riboflavina que podem ser coextraídas em uma mesma operação e cromatografadas por fluorescência simultaneamente (BALL, 1994), desde que seja feita derivatização pós-coluna da tiamina (MAURO & WETZEL, 1984). Contudo, muitos aparelhos para CLAE não possuem acessórios para

derivatização pós-coluna, não possibilitando assim a determinação simultânea da tiamina e riboflavina em alimentos contendo baixos teores destas vitaminas.

4.2.1.6. Análise Qualitativa

A análise qualitativa ou identificação das vitaminas do complexo B é mais freqüentemente realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos fornecidos pelas amostras e pelos padrões e por co-cromatografia (FERNANDO & MURPHY, 1990). No entanto, a identificação apenas por esta técnica não é segura já que o tempo de retenção pode variar de um alimento para outro e assim ser diferente dos compostos vitamínicos puros (FINGLAS & FAULKS, 1987).

LAVIGNE et alii (1987) utilizaram a comparação do espectro de absorção dos picos fornecidos pelas amostras analisadas e pelos padrões, além da comparação entre as razões das absorvâncias fornecidas pelas amostras e pelos padrões em diferentes comprimentos de onda e do tempo de retenção para aumentar a segurança da identificação.

Uma identificação bastante segura, porém, pode ser efetuada com o uso da espectrometria de massa e espectroscopia no infravermelho, especialmente para o desenvolvimento de métodos de referência para validar determinações vitamínicas por CLAE (RIZZOLO E POLESELLO, 1992).

4.2.1.7. Análise Quantitativa

A grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura emprega as curvas de padronização externa para quantificação das vitaminas do complexo B. A técnica envolve medida absoluta da área do pico, a qual é mais seguramente efetuada por integração eletrônica e é dependente de um controle preciso do volume de injeção. Assim, é aconselhável injetar a solução padrão em intervalos frequentes (injeção sequencial) durante as análises para minimizar erros relacionados com a mudança das condições cromatográficas como temperatura, fluxo e composição da fase móvel (BALL, 1994).

A padronização interna é indicada para controlar variações que possam ocorrer durante a análise cromatográfica como variações no fluxo da fase móvel e no volume de injeção das amostras. A análise cromatográfica envolve a adição de uma quantidade conhecida do padrão interno às amostras antes do procedimento analítico (BALL, 1994).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AGOSTINI, T. S., GODOY, H. T. **Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos**. Campinas, 1996, 183 p. (Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas).
- ANG, C. Y. W. , MOSELEY, F. A. Determination of thiamin and riboflavin in meat and meat products by high-performance liquid chromatography, **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 28, n. 3, p. 486-489, 1980.
- ANTUNES, E. R. G., ASSUNÇÃO, J. G., COSTA, M. A. Fenilcetonúria clássica com manifestação de dermatite pelagróide. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.65, n.1, p.31-35, 1990.
- AOAC Niacin and niacinamide in drugs, foods and feeds. Colorimetric method. First Action 1961, Final Action 1962. In: CUNNIFF, P., ed. **AOAC official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 1995c. 961.14.
- AOAC Riboflavin (Vitamin B₂) in foods and vitamin preparations. Fluorimetric method. First Action 1970, Final Action 1971. In: CUNNIFF, P., ed. **AOAC Official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 1995b. 970.65.

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1996.

- AOAC Thiamine (vitamin B₁) in grain products. Fluorimetric (rapid) method. Final Action. In: CUNNIFF, P., ed. **AOAC official methods of analysis**. 16. ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 1995a. 953.17.
- AWONORIN, S. O. , ROTIMI, D. K. Effects of oven temperature and time on the losses of some B vitamins in roasted beef and pork. **J. Foodservice Syst.**, Trumbull, v. 6, p. 89-105, 1991.
- AWONORIN, S. O., BAMIRO, F. O., AYOADE, J. A. The effect of freezing rate, storage and cooking on some B-vitamins in beef and pork roasts. **J. Foodservice Syst.**, Trumbull, v. 9, p. 7-23, 1996.
- BALL, G. F. M. **Water-soluble vitamin assays in human nutrition**. London: Chapman & Hall, 1994. 416 p.
- BARBEAU, W. E. , SCHNEPF, M. Sensory attributes and thiamine content of roasting chickens cooked in a microwave, convection microwave and conventional electric oven. **J. Food Qual.**, Westport, v. 12, p. 203-213, 1989.
- BARNA, E., DWORSCHÁK, E. Determination of thiamine (vitamin B₁) and riboflavin (vitamin B₂) in meat and liver by HPLC. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 668, p. 359-363, 1994.
- BARTHA, A., STAHLBERG, J. Electrostatic retention model of reversed-phase ion-pair chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.668, 255-284, 1994.
- BARTHA, A., VIGH, G. Studies in ion-pair chromatography. II: Retention of positive and negative ions and neutral solutes in tetrabutylammonium bromide-containing methanol- water eluents on lichrosorb RP-18. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.265, p. 171-182, 1983.
- BARTHA, A., VIGH, G., BILLIET, H. A., GALAN, L. Studies in reversed-phase ion-pair chromatography. IV. The role of the chain length of the pairing ion. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.303, p. 29-38, 1984.
- BATENHORST, J. H., SUN, J., GIRAUD, D. W., YOUNG, L. J., HAMOUZ, F. L., DRISKELL, J. A . Retention of selected nutrients in pork roasts prepared by variations in cookery methods. **J. Muscle Foods**, Trumbull, v. 6, p. 359-368, 1995.
- BECHGAARD H., JESPERSEN, S. GI absorption of niacin in humans. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.66, p. 871-872, 1977.
- BEKBÖLET, M. Light effects on food. **J. Food Prot.**, Ames, v. 53, n. 5, p. 430-440, 1990.

- BHUIYAN, A. K. M. A., RATNAYAKE, W. M. N., ACKMAN, R. G. Nutritional composition of raw and smoked atlantic mackerel (*Scomber scombrus*): oil- and water-soluble vitamins. **J. Food Compos. Anal.**, San Diego, v.6, p. 172-184, 1993.
- BLACHER, C., BARBISAN, J. Beriberi cardíaco, relato de um caso da forma fulminante. **R. AMRIGS**, Porto Alegre, v.29, n.2, p. 136-141, 1985.
- BLANCO, D.; SANCHEZ, L. A.; GUTIERREZ, M. D. Determination of water soluble vitamins by liquid chromatography with ordinary and narrow-bore columns. **J. Liq. Chromatogr.**, New York, v.17, n. 7, p. 1525-1539, 1994.
- BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1995. p. 163-190.
- BORENSTEIN, B. Stability of nutrients in foods. In: HARRIS, R. S. , KARMAS, E., eds. **Nutritional evaluation of food processing**. 2.ed. Westport: AVI, 1977. p. 16-18.
- BOWERS, J. A., CRAIG, J. A., TUCKER, T. J., HOLDEN, M. S., POSATI, L. P. Vitamin and proximate composition of fast-food fried chicken. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.87, n.6, p.736-739, 1987.
- BRIGGS, G. M. Muscle foods and human health. **Food Technol.**, Chicago, v.39, n.2, p. 54, 56-57, 1985.
- BRIOZZO, J., BASUALDO, R. N., CARRERA, P. A., ALZAMORA, S. M., CHIRIFE, J. Improvement of thiamin retention in canned low-acid foods through pH adjustment. **J. Food Sci.**, Chicago, v.52, n.3, p. 827-829, 1987.
- BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. London: Academic Press, 1994. p.355-484.
- BROWN, M. L. Tiamina. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD; INSTITUTO INTERNACIONAL DE CIENCIAS DE LA VIDA. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 6.ed Washington: OPS, 1991. p. 163-166.
- CANHOS, D. A. L., DIAS, E. L. **Tecnologia de carne bovina e produtos derivados**. São Paulo: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia, 1984. 440 p.
- CHASE, G. W., SOLIMAN, A. G. Analysis of thiamin, riboflavin, pyridoxin and niacin in multivitamin premixes and supplements by HPLC. **J. Micronutr. Anal.**, Barking, v.7, p. 15-25, 1990.

- COOKSEY K., KLEIN, B. P., McKEITH, F. K. Thiamin retention and other characteristics of cooked beef loin roasts. **J. Food Sci.**, Chicago, v.55, n.3, p. 863-864, 1990.
- COOPERMAN, J. M. , LOPEZ, R. Riboflavin. In: MACHLIN, L. J., ed. **Handbook of vitamins**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 283-310.
- COSTA, J. C., SILVA, L. F. G., NUNES, M. L. Thiamine test in leigh syndrome: a new diagnosis approach. **J. Liga Bras. Epilepsia**, Curitiba, v.5, n.2, p.55-58, 1992.
- COULTATE, T. P., SUMAR, S., DAVIES, J. G. The analysis of micronutrients in the diet. **Nutr. Food Sci.**, London, v.1, p. 28-30, 1995.
- DAWSON, K. R., UNKLESBAY, N.F. , HEDRICK, H. B. HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate heat-processing methods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.36, p. 1176-1179, 1988.
- DI CYAN, E. **Vitamins in your life and the micronutrients**. New York: Fireside, 1974. 223p.
- DISPUTA a unhas e dentes. **R. Cozinha Industrial**, 16:22-24, 1991.
- DONG, M. W.; SEPORE, J.; TAURUMOTO, T. Factors affecting the ion-pair chromatography of water soluble vitamins. **J. Chrom.**, 442: 81-95, 1988.
- FAINTUCH, J. J. Repercussões cardiovasculares do alcoolismo. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, 50 (1): 76-79, 1995.
- FELLMAN, J. K.; ARTZ, W. E.; TASSINARI, P. D.; AUGUSTIN, J. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by HPLC. **J. Food Sci.**, 47: 2048-2050, 1982.
- FERNANDO, S. M. & MURPHY, P. A. HPLC determination of thiamin and riboflavin in soybeans and tofu. **J. Agric. Food Chem.**, 38: 163-167, 1990.
- FIGUEIRA, I. L. V.; LAKS, J. Encefalopatia de Wernicke (EW). **J. Bras. Psiq.**, 37 (1): 33-38, 1988.
- FINGLAS, P. M. & FAULKES, R. M. Critical review of HPLC methods for the determination of thiamin, riboflavin and niacin in foods. **J. Micronut. Anal.**, 3: 251-282, 1987.
- FOX, J. B. Jr; LAKRITZ, L.; THAYER, K. W. Thiamin, riboflavin and α -tocoferol retention in processed and stored irradiated pork. **J. of Food Sci.**, 62 (5): 1022-1025, 1987.

- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. Atheneu, 9ª ed., São Paulo, 307 p., 1992.
- GORDON, T. D., ROBERTS, G. L., HEINTZ, D. M. Thiamin, riboflavin and niacin content and stability in pacific coast seafoods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.27, n.3, p.483-489, 1979.
- GREENFIELD, H. , KUO, Y. L., HUTCHISON, G. I., WILLS, R. B. H. Composition of australian foods. 34. Beef and veal. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.208-215, 227-228, 1987.
- GUBLER, C. J. Thiamin. In: MACHLIN, L. J., ed. **Handbook of vitamins**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 233-281.
- HÄGG, M. Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamin and riboflavin in foods. **J. AOAC Int.**, Washington, v.77, n.3, p.681-686, 1994.
- HÄGG, M., KUMPULAINEN, J. Thiamine and riboflavin contents in domestic and imported cereal products in Finland. **J. Food Compos. Anal.**, Barking, v.6, p.299-306, 1993.
- HÄGG, M., KUMPULAINEN, J. Thiamine and riboflavin contents in finnish pig, heifer and cow livers and in pork loin. . **J. Food Compos. Anal.**, Barking, v.7, p.301-306, 1994b.
- HÄGG, M., KUMPULAINEN, J. Thiamine and riboflavin contents of finnish breads and their corresponding flours. **J. Food Compos. Anal.**, Barking, v.7, p.94-101, 1994a.
- HAMANO, T., MITSUHASHI, Y., AOKI, N., YAMAMOTO, S. Simultaneous determination of niacin and niacinamide in meats by HPLC. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.457, p.403-408, 1988.
- HAMM, D., ANG, C., Y. W. Effect of sex and age on proximate analysis, cholesterol and selected vitamins in broiler breast meat. **J. Food Sci.**, Chicago, v.49, p. 286-287, 1984.
- HARRIS, R. S. General discussion on the stability of nutrients. In: HARRIS, R. S. , KARMAS, E., eds. **Nutritional evaluation of food processing**. 2.ed. Westport: AVI, 1977. p.1-4.
- HASSELMANN, C., FRANCK, D., GRIMM, P., DIOP, P. A., SOULES, C. HPLC analysis of thiamin and riboflavin in dietetic foods. **J. Micronutr. Anal.**, Barking, v.5, p.269-279, 1989.
- HILL, M. A. Vitamin retention in microwave cooking and cook-chill foods. **Food Chem.**, Barking, v.49, p.131-136, 1994.

- HIRAYAMA, S., MARUYAMA, M. Determination of a small amount of niacin in foodstuffs by HPLC. **J. Chromatogr.**, Amsterdam,, v.588, p. 171-175, 1991.
- HORWITT, M. K. Niacin. In: GOODHART, R. S., SHILS, M. E., eds. **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1980a. p. 204-208.
- HORWITT, M. K. Riboflavin. In: GOODHART, R. S., SHILS, M. E. eds. **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1980b. p. 197-203.
- HSIEH, J. H., MATTHEWS, M. E., HARTEL, R. W. Effects of meat color, oven temperature, and sampling position on thiamin retention and moisture content of cooked turkey rolls. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.91, p.845-846, 1991.
- HUNG, C. T., TAYLOR, R. B. Ion-exchange-desolvation mechanism on octadecyl silica using anionic hydrophobic pairing ions. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.209, p. 175-190, 1981.
- HUTCHISON, G. I., GREENFIELD, H., WILLS, R. B. H. Composition of australian foods. 35. Pork. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.216-222, 1987b.
- HUTCHISON, G. I., THOMAS, D. E., TRUSWELL, A. S. Nutrient composition of australian beef. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.199-201, 1987a.
- JACOB, R. A., SWENDSEID, M. E. Niacina. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD; INSTITUTO INTERNACIONAL DE CIENCIAS DE LA VIDA. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 6.ed. Washington: OPS, 1991. p. 186-193.
- JOHNSON, D. D., EASTRIDGE, J. S., NEUBAUER, D. R., MCGOWAN, C. H. Effect of sex class on nutrient content of meat from young goat. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.73, p. 296-301, 1995.
- KILCAST, D. Effect of irradiation on vitamins. **Food Chem.**, Barking, v.49, p.157-164, 1994.
- KILLEIT, U. Vitamin retention in extrusion cooking. **Food Chem.**, Barking, v.49, p.149-155, 1994.
- KOTHARI, R. M., TAYLOR, M. W. Simultaneous separation of water-soluble vitamins and coenzymes by reversed-phase HPLC. **J. Chromatogr.**, Amsterdam,, v.247, p.187-192, 1982.
- LACHANCE, P. A. Effects of food preparation procedures on nutrient retention with emphasis upon food service practices. In: HARRIS R. S., KARMAS, E.,

- eds. **Nutritional evaluation of food processing**. 2.ed. Westport: AVI, 1977. p.463-528.
- LASCHI-LOQUERIE, A., VALLAS, S., VIOLLET, J., LECLERCQ, M. , FAYOL, V. HPLC determination of total thiamine in biological and food products. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, Bern, v.62, n.3, p.248-251, 1992.
- LAVIGNE, C., ZEE, J. A., SIMARD, R. E., GOSSELIN, C. High-performance liquid chromatographic-diode array determination of ascorbic acid, thiamine and riboflavin in gotas' milk. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 410, p. 201-205, 1987.
- LAWRIE, R. A. **Meat science**. 4.ed. Oxford: Pergamon Press, 1985. 267p.
- LEENHEER, A. P., LAMBERT, W. E., RUYTER, M. G. M. **Modern chromatography analysis of vitamins**. New York: Marcel Dekker, 1985.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1993. p. 185-204; 538-563.
- LUND, D. B. Effects of blanching, pasteurization, and sterilization on nutrients. In: HARRIS R. S., KARMAS E., eds. **Nutritional evaluation of food processing**. 2.ed. Westport: AVI, 1977. p. 205-239.
- MACHLIN, L. J. **Handbook of vitamins**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1991. 595p.
- MARSHALL, P. A., VANDEPEER, J. M., PANT, I., TRENNERY, V. C., SCHEELINGS, P., BUICK, D. R. The development and evaluation of secondary food reference materials for the determination of cholesterol, fatty acids and selected water-soluble vitamins in foods. **Food Chem.**, Barking, v.58, n.3, p.269-276, 1997.
- MAURO, D. J., WETZEL, D. L. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in enriched cereal based products by HPLC using seletive detection. **J. Chromatogr.**, Amsterdam,, v.299, p.281-287, 1984.
- McCORMICK, D. B. Riboflavina. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, INSTITUTO INTERNACIONAL DE CIENCIAS DE LA VIDA. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 6.ed. Washington: OPS, 1991. p. 167-176.
- NASVADI, G. E., LAW, C., MACKEY, J. D., LOGUE, K. P. Nutrient composition and sensory characteristics of canadian grain-fed veal cutlets. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v.73, p.183-189, 1993.

- NEAL, R. A., SAUBERLICH, H. E. Thiamin. In: GOODHART, R. S., SHILS, M. E., eds. **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1980, p. 191-197.
- NICKLAS, T. A., FARRIS,, R. P., MYERS, L., BERENSON, G. S. Impact of meat consumption on nutritional quality and cardiovascular risk factors in young adults: the bogalusa heart study. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.95, p.887-892, 1995.
- NIEKERK, P. J. V., SMIT, S. C. C., STRYDOM, E. S. P., ARMBRUSTER, G. Comparison of a HPLC and microbiological method for the determination of niacin in Foods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.32, p.304-307, 1984.
- O BIFE em carne e osso. **Coz. Ind.**, São Paulo, v.16, p.20-21, 1991.
- OHTA, H., MAEDA, Y., NOGATA, Y., YOZA, K., TAKEDA Y., OSAJIMA, Y. A simple determination of thiamine in rice (*Oriza sativa* L.) by HPLC with post-column derivatization. **J. Liq. Chromatogr.**, New York, v.16, n.12, p.2617-2629, 1993.
- OLLILAINEN, V., MATTILA, P., VARO, P., KOIVISTOINEN, P. HUTTUNEN, J. The HPLC determination of total riboflavin in foods. **J. Micronutr. Anal.**, Barking, v.8, p.199-207, 1990.
- OLLILAINEN,V., VAHTERISTO, L., UUSI-RAUVA, A., VARO, P., KOIVISTOINEN, P., HUTTUNEN, J. The HPLC determination of total thiamin (vitamin B₁) in foods. **J. Food Compos. Anal.**, Barking, v.6, p.152-165, 1993.
- ONO, K., BERRY, B. W., DOUGLASS, L. W. Nutrient composition of some fresh and cooked retail cuts of veal. **J. Food Sci.**, Chicago, v.51, n.5, p.1352-1357, 1986.
- ONO, K.; BERRY, B. W.; JOHNSON, H. K.; RUSSEK, E.; PARKER, C. F.; CAHILL, V. R.; ALTHOUSE, P. G. Nutrient composition of lamb of two age groups. **J. Food Sci.**, **49**: 1233-1240, 1984.
- ÖTLES, S. , HISIL, Y. High-pressure liquid chromatographic analysis of water soluble vitamins in eggs. **Ital. J. Food Sci.**, Roma, v.1, p.68-73, 1993.
- PAULUS, K. Vitamin degradation during food processing and how to prevent it. In: SOMOGYI , J. C., MÜLLER, H. R., eds. **Nutritional impact of food processing**. Basel. Karger, 1989. p. 173-187.
- PEREIRA, V. G., MASUDA, Z., KATZ, A., TRONCHINI, V., Jr. Emergência de shoshin beriberi no Brasil: aspectos clínicos, hemodinâmicos e terapêuticos. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.31, n.1-2, p.17-19, 1985.

- PETERS, C. R., SINWELL, D. D., DUYNE, F. O. V. Slow cooker vs. Oven preparation of meat loaves and chicken. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.83, p. 430-435, 1983.
- RAHMANI, N., MULLER, H. G. The fate of thiamin and riboflavin during the preparation of couscous. **Food Chem.**, Barking, v.55, n.1, p.23-27, 1996.
- RISS, T. L., BECHTEL, P. J., FORBES, R. M., KLEIN, B. P., McKEITH, F. K. Nutrient content of special fed veal ribeyes. **J. Food Sci.**, Chicago, v.48, p. 1868-1870, 1983.
- RIZZOLO, A., POLESELLO, S. Review: chromatographic determination of vitamins in foods. **J. Chromatogr.**, Amsterdam,, 624: 103-152, 1992.
- ROOS, R. W., LAU-CAM, C. A. General reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the separation of drugs using triethylamine as a competing base. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 370, p. 403-418, 1986.
- ROY, R. B. , MERTEN, J. J. Evaluation of urea-acid system as medium of extraction for the B-group vitamins . Part II. Simplified semi-automated chemical analysis for niacin and niacinamide in cereal products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.66, n.2, p.291-296, 1983.
- RUSSEL, L. F., VANDERSLICE, J. T. Non-degradative extraction an simultaneous quantitation of riboflavin, flavin çmononucleotide and flavin adenine dinucleotide in foods by HPLC. **Food Chem.**, Barking, v.43, p.151-162, 1992.
- RYLEY, J. R. , KAJDA, P. Vitamins in thermal processing. **Food. Chem.**, Barking, v.49, p.119-129, 1994.
- SANTOS, G. K. A. A síndrome de Wernicke e Korsakoff, uma compreensão fisiodinâmica. **Inf. Psiquiatr.**, Rio de Janeiro, v.8, n.1, p,3-9, 1989.
- SELMAN, J. D. Vitamin retention during blanching of vegetables. **Food. Chem.**, Barking, v.49, p.137-147, 1994.
- SHAMSUZZAAMAN, K., CHUAQUI-OFFERMANN, N., LUCHT, L., MCDOUGALL, T., BORSA, J. Microbiological and others characteristics of chicken breast meat following electron-beam and sous-vide treatments. **J. Food Prot.**, Ames, v.55, n.7, p. 528-533, 1992.
- SKURRAY, G. R. A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamin en foods. **Food Chem.**, Barking, v.7, p.77-80, 1981.

- SKURRAY, G. R., PERKES, J. M., DUFF, J. Effect of marinading with wine, sodium bicarbonate or soysauce on the thiamin content of beef. **J. Food Sci.**, Chicago, v.51, n.4, p. 1059-1060, 1986.
- SNYDER L. R., KIRKLAND, L. L. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2.ed. New York: Wiley, 1979. 863p.
- TAUNGBODHITHAM, A. K. Thiamin content and activity of antithiamin factor in vegetables of southern Thailand. **Food Chem.**, Barking, v.52, p.285-288, 1995.
- TOMA, R. B., TABEKHIA, M. M. HPLC analysis of B vitamins in rice and rice products. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 44, n.1, p.263-265, 1979.
- TRUGO, L. C., MACRAE, R., TRUGO, N. M. F. Determination of nicotinic acid in instant coffee using high-performance liquid chromatography. **J. Micronutr.**, Barking, v.1, p.55-63, 1985.
- TYLER, T. A., GENZALE, J. A. Liquid chromatographic determination of total niacin in beef, semolina and cottage cheese. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.73, n.3, p.467-469, 1990.
- UHEROVÁ, R., HOZOVÁ, B. , SMIRNOV, V. The effect of microwave heating on retention of some B vitamins. **Food Chem.**, Barking, v.46, p.293-295, 1993.
- VIDAL-VALVERDE, C. V., RECHE, A. Determination of available niacin in legumes and meat by HPLC. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.39, p.116-121, 1991.
- WANKE, N. C. F., SANTOS, O. L. R., SANTOS, V. L. C. Pelagra: relato de 34 casos. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.65, n.1, p.41-43, 1993.
- WIMALASIRI, P., WILLS, R. B. H. Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by HPLC. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 318, p. 417-426, 1985.
- YANG J., SULAEMAN, A., SETIAWAN, B., ATUGHONU, A., GIRAUD, D. W., DRISKELL, J. A .Sensory qualites and nutrient retention of beef strips prepared by different household cooking techniques. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.94, n.2, p.199-201, 1994.
- ZUBARAN, C., FERNANDES, J., MARTINS, F., SOUZA, J., MACHADO, R., CADORE, M. Aspectos clínicos e neuropatológicos da síndrome de Wernicke-Korsakoff. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.30, n.6, p. 602-608, 1996.

Capítulo 2

DEFINIÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE TIAMINA, RIBOFLAVINA E ÁCIDO NICOTÍNICO EM CARNES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

1. INTRODUÇÃO

Numerosos métodos para determinação de vitaminas hidrossolúveis em alimentos têm sido publicados, mas muitas dificuldades ainda permanecem, especialmente com relação ao preparo das diferentes amostras de alimentos (OLLILAINEN et alii, 1990).

Os problemas associados à quantificação de vitaminas hidrossolúveis em alimentos têm sido relacionados principalmente com a interferência de outros compostos e com a dificuldade de se detectar pequenas quantidades de vitaminas (SKURRAY, 1981).

Na determinação de vitaminas adicionadas em alimentos enriquecidos, a extração é relativamente fácil. Nestas circunstâncias é possível usar um procedimento que pode extrair duas ou mais vitaminas simultaneamente. No entanto, as determinações de vitaminas naturalmente existentes em alimentos são difíceis de serem realizadas por causa da natureza complexa da matriz alimentar, dos níveis muito baixos existentes e da existência das vitaminas sob várias formas ligadas (BALL, 1994).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é considerada uma poderosa ferramenta para a análise de compostos lábeis como as vitaminas hidrossolúveis. A instrumentação e o eficiente empacotamento das colunas comercialmente disponíveis permitem análises de diferentes compostos (OLLILAINEN et alii, 1993). A preparação da amostra alimentar a ser analisada deve ser avaliada devido à possibilidade de ocorrência de vários componentes não vitamínicos que podem influenciar os resultados (BARNA & DWORSCHÁK, 1994). Assim, o desenvolvimento de procedimentos para amostras com matrizes alimentares complexas tem se concentrado em técnicas de extração e purificação mais efetivas (OLLILAINEN et alii, 1993).

Alguns estudos encontrados na literatura foram realizados com o intuito de desenvolver métodos sensíveis e precisos por CLAE para análises de tiamina, riboflavina e niacina presentes naturalmente em carnes. A maioria dos pesquisadores encontrou problemas relacionados com a purificação do extrato

devido à presença de numerosos compostos interferentes, principalmente em casos de detecção UV.

A tiamina (tiocromo) e a riboflavina podem ser detectadas por fluorescência com melhor seletividade e sensibilidade do que por detecção espectrofotométrica (FELLMAN et alii, 1982; MAURO & WETZEL, 1984). Devido à alta sensibilidade e à detecção de quantidades bastante pequenas nos alimentos, a maioria dos pesquisadores têm utilizado a detecção fluorimétrica para estas vitaminas (KADER & RYLEY, 1988).

Em 1980, ANG & MOSELY determinaram tiamina e riboflavina em carnes e produtos cárneos através da detecção fluorimétrica. As vitaminas foram extraídas das amostras utilizando hidrólise ácida e enzimática. A tiamina foi oxidada para tiocromo, e a riboflavina foi convertida para lumiflavina por radiação ultravioleta antes da separação cromatográfica em coluna de fase normal.

SKURRAY (1981) foi um dos primeiros pesquisadores a utilizar a cromatografia de interação iônica para melhorar a separação de tiamina, riboflavina e niacina, presentes em concentrações normais, em carne bovina e outros alimentos. Ele utilizou a adição do contra-íon ácido heptano sulfônico em uma fase móvel constituída por tampão acetato 0,2M e obteve resultados muito bons na quantificação da tiamina e riboflavina por detecção fluorimétrica e da niacina pela detecção da absorvância no ultravioleta.

Posteriormente, DAWSON et alii (1988) determinaram o teor natural de tiamina, riboflavina e niacina em carnes bovina, suína e de carneiro após a aplicação de técnicas de processamento pelo calor. Eles utilizaram a cromatografia de fase reversa e tampão fosfato 0,02 M: metanol (70: 30) como fase móvel, sendo a detecção de tiamina e riboflavina efetuadas fluorimetricamente; a detecção de niacina foi feita pela detecção da absorvância no ultravioleta. No entanto, as condições utilizadas não permitiram uma separação cromatográfica satisfatória.

TYLER & GENZALE (1990) determinaram niacina em carne bovina e outros alimentos utilizando hidrólise alcalina para preparação das amostras e

detecção no ultravioleta. Eles tiveram a necessidade de usar ácido oxálico para precipitar o excesso de cálcio e reduzir o pH da solução para aproximadamente 7. Empregaram um procedimento de limpeza utilizando cartuchos Sep-Pak C18 para efetuar corte cromatográfico e redução dos picos interferentes e, ainda, adicionaram ácido fosfórico ao extrato das amostras para melhorar a resolução dos picos. Durante a análise cromatográfica foi utilizado o contra-íon dodecil sulfato de sódio como componente da fase móvel para melhorar a separação dos componentes presentes.

Para determinação de niacina em carne suína e legumes, VIDAL-VALVERDE & RECHE (1991) utilizaram hidrólise ácida e enzimática para o preparo das amostras, além de ser necessário purificar os extratos utilizando coluna de troca iônica. Foi necessário utilizar a cromatografia de íons pareados (brometo de tetrabutilamônio dissolvido na fase móvel), além de controlar a temperatura da coluna e o pH da fase móvel, para melhorar a separação dos componentes.

Alguns métodos citados anteriormente e outros encontrados na literatura foram testados durante o presente estudo na determinação, por CLAE, de tiamina, riboflavina e niacina em carnes bovina, suína e de frango. Além de algumas condições utilizadas por estes pesquisadores não estarem disponíveis em nossos laboratórios, os resultados obtidos nestes testes não permitiram uma análise qualitativa e quantitativa conclusiva. Assim, com base na literatura e de acordo com as condições disponíveis, foi necessário redefinir as metodologias a serem utilizadas.

Diante do exposto, e sendo que as carnes bovina, suína e de frango, constituem ricas fontes das vitaminas citadas e são, geralmente, as mais consumidas pelos brasileiros, o objetivo deste estudo foi testar, avaliar e definir métodos de análise quantitativa para tiamina, riboflavina e ácido nicotínico por CLAE em amostras de carnes, para, então, avaliar a influência de diversas técnicas de preparo de carnes em restaurantes sobre os teores destas vitaminas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

2.1.1. Matéria Prima

Utilizou-se cortes de coxão mole e alcatra de origem bovina, pernil e lombo de origem suína, e peito de frango, adquiridos sob forma resfriada nas cidades de São Paulo - SP, e Viçosa - MG. As carnes permaneceram sob congelamento a -18°C por aproximadamente 2 meses até análise.

2.1.2. Reagentes e Outros Materiais

Para o preparo das amostras utilizou-se os seguintes reagentes com grau de pureza para análise (p.a.): acetato de sódio, cloreto de potássio, ácido clorídrico, ácido tricloroacético, ácido fosfórico, hidróxido de cálcio e ferricianeto de potássio da Merck, Brasil; hidróxido de sódio da Quimex, Brasil; isobutanol da Merck, Alemanha; ácido sulfúrico da Synth; e clara-díastase (mistura de enzimas: α -amilase, celulase, invertase, peptidase, fosfatase e sulfatase) da Fluka, Suíça.

Os padrões vitamínicos utilizados foram hidrocloreto de tiamina, riboflavina e ácido nicotínico da Sigma, USA.

Para preparação das fases móveis utilizou-se metanol e acetonitrila OmniSolv, grau HPLC da EM Science, USA; ácido acético glacial, trietanolamina e trietilamina da Merck, Brasil; sal sódico de ácido heptano sulfônico e sal sódico de ácido hexano sulfônico da Sigma, USA.

Para filtração das amostras utilizou-se papel de filtro livre de cinzas, nº 40, Whatman, Inglaterra; seringas descartáveis esterilizadas de 3 ml, da Arrow Medical Supply Co. Ltda, Korea; unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45 μ m de porosidade, da Millipore, Brasil.

As fases móveis foram filtradas em membranas filtrantes esterilizadas de nitrato de celulose, com 0,45 μ m de porosidade, Sartorius, Brasil.

2.1.3. Equipamentos

Para a extração das vitaminas nas amostras utilizou-se os seguintes equipamentos: microtritador, modelo TE 102, Marconi; autoclave a gás, Dixie Canner; pHmetro DM 20, Digimed; agitador magnético, modelo 703, Fisatom; banho-maria, FANEM; e centrífuga Elcelsa Baby II, com cruzeta angular 4 x 100 ml, modelo 206 R, FANEM.

Para varredura dos espectros de absorção dos padrões vitamínicos foi usado um espectrofotômetro Hitachi U2000. As fases móveis foram degaseificadas em vibrador ultrassônico Branson, B-220.

As análises por CLAE foram efetuadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, munido de bomba de pistão, modelo CG-480; injetor Rheodyne 7125 equipado com loop de 100 µl; coluna Hibar RT 250-4, LiChrospher 100 RP 18 (empacotada com partículas de sílica com 5µm, revestidas com octadecilsilano), com 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno ou coluna Capcell Pak-Shiseido, RP 18 (empacotada com partículas de sílica com 5µm, revestidas com octadecilsilano), com 6 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento. Foi utilizado o detector de fluorescência Fluorichrom da Varian (determinação de tiamina e riboflavina); o detector espectrofotométrico da Varian, UV 50 (determinação de ácido nicotínico) e, ainda o detector de arranjos de diodos (Shimadzu, SPD-M6A) para confirmar a identificação do ácido nicotínico. Para integração eletrônica das áreas dos picos foi usado o integrador-processador, modelo CG-200.

2.2. Métodos

2.2.1. Determinação das Condições de Extração das Vitaminas nas Amostras de Carnes

Os cortes de carnes mantidos em freezer a -18°C, por aproximadamente 2 meses, foram fatiados congelados para evitar perdas de suco e, conseqüentemente, de vitaminas hidrossolúveis durante o descongelamento. A

gordura e tecido conjuntivo aparentes foram retirados, sendo as amostras fatiadas em pedaços com aproximadamente 0,5 cm de comprimento x 0,5 cm de largura x 0,5 cm de espessura, utilizando-se uma faca de modelo doméstico e tábua de altileno como apoio.

Todas as operações de extração das vitaminas foram efetuadas ao abrigo da luz, utilizando-se vidraria de cor âmbar ou papel alumínio.

A eficiência da extração das vitaminas foi avaliada variando as condições de tratamento das amostras, como descrito a seguir:

2.2.1.1. Tiamina

- a) Quantidade de amostra (1 e 5 g de carne suína; 5 e 10 g de carne bovina e de frango)
- b) Tipo de hidrólise (hidrólise ácida; hidrólise ácida + hidrólise enzimática)
- c) Condições para hidrólise ácida (banho-maria: ebulição a 98°C por 60 minutos; autoclavagem: 121° C por 15 minutos e 121° C por 30 minutos)

2.2.1.2. Riboflavina

Para riboflavina, as condições de tratamento das amostras foram iguais às relatadas para tiamina, exceto a quantidade da amostra que foi de 5 e 10 g de cada um dos cortes de carne.

2.2.1.3. Ácido Nicotínico

- a) Quantidade da amostra (5, 8 e 12 g de cada um dos cortes de carne)
- b) Tipo de hidrólise (ácida: H_2SO_4 1N; alcalina: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1N)
- c) Condições para hidrólise (autoclavagem: 121° C por 30 minutos e 121° C por 60 minutos)

2.2.2. Determinação das Condições Cromatográficas

A influência de diferentes fases móveis e de aditivos a elas adicionados na eficiência da separação cromatográfica das vitaminas de interesse foi avaliada, segundo condições já reportadas na literatura. O fluxo da fase móvel,

assim como a atenuação e o comprimento de onda de maior sensibilidade do detector também foram avaliados. Dois tipos de coluna de fase reversa (sílica revestida com octadecilsilano) foram testadas: Capcell Pak-Shiseido, 5 μ m, 6x150 mm e Hibar RT 250-4, LiChrospher 100, 5 μ m, 4x250 mm.

A identificação das vitaminas foi feita por comparação dos tempos de retenção obtidos das amostras e dos padrões analisados nas mesmas condições e pela adição de quantidades conhecidas das soluções padrão às amostras trabalhadas ("spiking"). A identificação do ácido nicotínico foi confirmada, adicionalmente, pelos espectros de absorção obtidos do padrão e das amostras através do detector de arranjos de diodos. A quantificação das três vitaminas foi realizada por padronização externa.

2.2.2.1. Tiamina

Foram avaliadas diferentes concentrações de metanol e cloreto de potássio 0,25% na fase móvel, com um fluxo variando entre 0,5 e 1 ml/minuto (método baseado em CARVALHO, 1993). Utilizou-se também soluções compostas por metanol, água e ácido acético, contendo ácido heptano sulfônico ou ácido hexano sulfônico, de acordo com o proposto por MAURO & WETZEL (1984) que determinaram tiamina e riboflavina em cereais enriquecidos, por detecção fluorimétrica, usando metanol: água: ácido acético (36: 64: 1), contendo 0,005M de ácido hexano sulfônico. As porcentagens dos solventes na fase móvel e diferentes vazões foram avaliadas na tentativa de otimizar a resolução.

2.2.2.2. Riboflavina

Foram avaliadas, inicialmente, diferentes combinações de metanol e cloreto de potássio 0,25% como fase móvel, utilizando-se vazões entre 0,5 e 1 ml/minuto (CARVALHO (1993).

O método proposto por VIDAL-VALVERDE & RECHE (1990) (fase móvel composta por metanol: água: ácido acético - 32: 67: 1, contendo 0,005M de ácido hexano sulfônico) para determinação de riboflavina em alimentos

utilizando detecção ultravioleta serviu de base, neste estudo, para avaliar as condições de análise de riboflavina em carnes por detecção fluorimétrica. Assim, concentrações variadas de metanol, água, ácido acético, contendo 0,005 M de ácido hexano sulfônico ou ácido heptano sulfônico foram testadas, utilizando-se fluxos variando de 0,8 a 1,3 ml/minuto.

As condições propostas por SKURRAY (1981) na determinação de tiamina, riboflavina e niacina em carnes e outros alimentos (tampão acetato 0,2 M contendo 0,005 M de ácido heptano sulfônico como fase móvel e detecção por fluorescência) também foram avaliadas, modificando-se o fluxo da fase móvel e a atenuação do detector.

Avaliou-se, ainda, as condições utilizadas por DAWSON et alii (1988) na determinação de tiamina, riboflavina e niacina em carnes. A fase móvel (70% de tampão fosfato 0,02 M e 30% de metanol) teve suas proporções e fluxo modificados, objetivando a obtenção de uma determinação qualitativa e quantitativa adaptadas aos equipamentos utilizados.

2.2.2.3. Ácido Nicotínico

Combinações de metanol e tampão acetato de sódio 0,01M (pH 4,7) contendo 0,005M de brometo de tetrabutilamônio foram avaliadas, segundo método desenvolvido por VIDAL-VALVERDE & RECHE (1991) para determinar ácido nicotínico em carne suína e legumes. Estes pesquisadores utilizaram uma fase móvel (pH final 4,72) preparada por 0,005 M de brometo de tetrabutilamônio dissolvido em uma mistura de metanol: tampão acetato de sódio 0,01 M, pH 4,66 (10: 90).

A partir do método utilizado por TAKATSUKI et alii (1987) que determinaram ácido nicotínico adicionado em carnes utilizando detecção ultravioleta e fase móvel composta por metanol: água (10: 90) contendo 0,005M de fosfato de tetrabutilamônio, testou-se como fases móveis diferentes proporções de metanol, acetonitrila e água contendo fosfato de tetrabutilamônio.

Baseando-se em MOREIRA (1995) que determinou ácido nicotínico em carnes de frangos usando fase móvel constituída por uma mistura de ácido heptano sulfônico, água, metanol, acetonitrila, trietanolamina e ácido acético glacial, algumas condições foram avaliadas com modificações. Assim, utilizou-se diferentes proporções de acetonitrila, metanol e água, contendo trietilamina ou trietanolamina, ácido heptano sulfônico ou ácido hexano sulfônico e ácido fosfórico ou ácido sulfúrico para ajuste do pH, com fluxo da fase móvel variando entre 0,5 e 1 ml/minuto.

AGOSTINI & GODOY (1996) desenvolveram uma metodologia utilizando detecção ultravioleta para análise simultânea de ácido nicotínico, nicotinamida e outras vitaminas em alimentos enriquecidos. Estes autores utilizaram um sistema de eluição por gradiente com 2% de acetonitrila e 98% de fase aquosa (5mM de ácido hexano sulfônico; 0,15% de trietilamina; pH 2,8 ajustado com ácido sulfúrico diluído) no início da corrida até chegar a 2% de acetonitrila, 41% de fase aquosa e 57% de metanol no final da corrida. Esta metodologia serviu também de base para este estudo, onde foram avaliadas diferentes combinações de acetonitrila e água contendo 0,005M de ácido hexano sulfônico ou ácido heptano sulfônico e 0,15% de trietilamina, com pH ajustado para 2,8 com H_2SO_4 1N, e vazões que variaram de 0,5 a 1 ml/min. O sistema de eluição foi o isocrático.

2.2.3. Procedimentos para Otimização da Metodologia - Preparação das Amostras e Condições de Análise por CLAE

Os procedimentos de preparação das amostras e as condições cromatográficas (avaliados na etapa anterior), que mostraram melhor resultado para as três vitaminas estudadas, foram otimizados com vistas à aplicação dos mesmos para análise quantitativas em etapas posteriores.

2.2.3.1. Análise da Tiamina

2.2.3.1.1. Extração da Vitamina

O procedimento de extração (baseado na AOAC, 1995b e em HÄGG, 1994) envolveu uma hidrólise ácida e uma hidrólise enzimática. Para tanto, as seguintes etapas foram realizadas:

- Pesou-se a amostra (5 g de carne bovina, 1 g de carne suína e 5g de carne de frango).
- Em seguida, adicionou-se cerca de 50 ml de ácido clorídrico 0,1 N. As amostras foram trituradas usando microtritador e hidrolisadas em autoclave a 121°C por 30 minutos.
- A mistura foi resfriada em banho de gelo à temperatura ambiente e o pH foi ajustado em pHmetro com o auxílio de agitador magnético para 4,0-4,5 com cerca de 3 ml de acetato de sódio 2M.
- Acrescentou-se, em seguida, 5 ml de clara-diaestase 6% e a mistura foi incubada em banho-maria por 3 horas a 50°C (HÄGG, 1994).
- A seguir, as proteínas foram precipitadas pela adição de 2 ml de ácido tricloroacético 50% e aquecimento a 97°C por 10 minutos.
- A mistura foi resfriada e o volume foi completado para 100 ml com água destilada, sendo as amostras centrifugadas a 4.000 rpm (2800 g) por 25 minutos e, em seguida, filtradas em papel de filtro Whatman nº. 40.

Após esta etapa, foi feita a oxidação da tiamina para tiocromo (composto fluorescente), com base na técnica da AOAC (1995a), da seguinte forma:

- A um tubo contendo 1,5g de NaCl, adicionou-se 10 ml da amostra, protegendo-o da luz.
- Em seguida, acrescentou-se, cuidadosamente e sem deixar escoar pelas paredes do tubo, 5 ml de ferricianeto de potássio alcalino, agitando-se vigorosamente em agitador de tubos com velocidade constante por 1 minuto. A solução de ferricianeto de potássio alcalino foi preparada como a seguir: pipetou-se 4 ml de uma solução de ferricianeto de potássio 1% para um balão volumétrico de 100 ml. Adicionou-se 48 ml de uma solução de NaOH

15% e completou-se o volume com água destilada. Esta solução foi utilizada dentro de 4 horas.

- Acrescentou-se, logo em seguida, 10 ml de isobutanol, agitando-se vigorosamente em agitador de tubos com velocidade constante por 2 minutos.
- Após separação das fases, pipetou-se, cuidadosamente, o extrato em isobutanol (tiocromo formado - camada superior).
- Finalmente as amostras foram filtradas através de membranas Millipore (unidades descartáveis) com porosidade de 0,45µm, estocadas em vidros âmbar entre 0 a 3°C, por um período mais breve possível (1 a 4 horas) e injetadas na coluna cromatográfica para análise.

As condições descritas foram rigorosamente seguidas com o intuito de obter uma boa purificação do extrato.

O mesmo procedimento usado para oxidação da tiamina nas amostras foi adotado para oxidação do padrão de tiamina. Todas as operações foram realizadas com pouca luz, suficiente apenas para o manuseio seguro das amostras e instrumentação.

2.2.3.1.2. Preparo do Padrão de Tiamina

Utilizou-se hidrocloreto de tiamina como padrão, como sugerido por HÄGG (1994). As soluções foram preparadas com base na técnica aprovada pela AOAC (1995b). Assim, 50 mg do padrão foram pesados em balança analítica, dissolvidos em HCl 0,1N e o volume foi completado para 500 ml. Transferiu-se uma alíquota de 10 ml para um balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1N. A solução foi diluída até concentrações comparáveis com as das amostras com água destilada e filtrada através de membranas com porosidade de 0,45 µm. Os resultados observados foram utilizados para construção da curva-padrão, a partir da qual foram calculados os teores da vitamina nas amostras.

A quantificação do padrão foi realizada por espectrofotometria a 234 nm, em tampão fosfato 0,1M, pH 5,5, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) = 345 (BALL, 1994).

2.2.3.1.3. Determinação da Tiamina

A análise de tiamina foi efetuada utilizando as condições cromatográficas descritas a seguir:

- . Cromatógrafo líquido de alta eficiência, com bomba de pistão, modelo CG-480, operando em sistema isocrático
- . Detector de fluorescência (filtro) Varian, Fluorichrom, com atenuação 20
- . Integrador-processador, modelo CG-200, com integração eletrônica de área
- . Injetor Rheodyne 7125 equipado com loop de 100 μl
- . Coluna Hibar RT 250-4, LiChrospher 100 RP18 (empacotada com partículas de sílica de 5 μm , revestidas com octadecilsilano), com 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno
- . Fase móvel: 40% de metanol + 60% de cloreto de potássio 0,25%
- . Vazão: 0,8 ml / minuto

Cada corrida cromatográfica teve duração de 8 minutos. A análise foi conduzida injetando-se 20 a 60 μl dos padrões e 40 μl das amostras utilizando-se uma micro-seringa Hamilton, com capacidade de 100 μl .

2.2.3.2. Análise da Riboflavina

2.2.3.2.1. Extração da Vitamina

O método de extração (baseado na AOAC, 1995c e em HÄGG, 1994) foi iniciado pela pesagem de 5 gramas de cada uma das amostras. Em seguida, procedeu-se da mesma forma como para extração da tiamina, exceto a etapa de oxidação que não foi realizada.

2.2.3.2.2. Preparo do Padrão de Riboflavina

A solução padrão de riboflavina foi preparada de acordo com a técnica da AOAC (1995c). Pesou-se cerca de 50 mg do padrão em balança analítica e

dissolveu-se em 500 ml de solução de ácido acético 0,02N quente (65°C). Uma alíquota de 10 ml foi transferida para um balão de 100 ml e o volume foi completado com ácido acético 0,02N. A solução foi diluída até concentrações comparáveis com as das amostras com ácido acético 0,02N e filtrada através de membrana com porosidade de 0,45 µm. Os resultados obtidos foram utilizados para construção da curva-padrão, a partir da qual foram calculados os teores da vitamina nas amostras.

A quantificação do padrão foi realizada por espectrofotometria a 267 nm, em ácido acético 0,02N, sendo a concentração calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade ($A^{1\%}_{1\text{cm}} = 850$) (CARVALHO, 1993).

2.2.3.2.3. Determinação da Riboflavina

O mesmo equipamento utilizado para tiamina (CLAE) foi usado na análise de riboflavina.

Uma fase móvel composta por 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico), operando com vazão de 1,0 ml / minuto foi finalmente selecionada e utilizada para as análises.

Cada corrida cromatográfica teve duração de 10 minutos. A análise foi conduzida injetando-se 20 a 60 µl dos padrões e 50 µl das amostras, utilizando-se uma micro-seringa Hamilton, com capacidade de 100 µl.

2.2.3.3. Análise do Ácido Nicotínico

2.2.3.3.1. Extração da Vitamina

A extração de ácido nicotínico (efetuada com base na AOAC, 1995d) foi feita através de hidrólise ácida, de acordo com as seguintes etapas:

- Pesou-se 8 gramas de cada uma das amostras.
- Em seguida, adicionou-se em torno de 75 ml de H₂SO₄ 1 N. As amostras foram trituradas utilizando microtritador e hidrolisadas em autoclave a 121°C por 60 minutos.

- A mistura foi resfriada em banho de gelo e o volume foi completado para 100 ml com água destilada.
- As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm (2800 g) por 25 minutos e, em seguida, filtradas em papel de filtro Whatman nº. 40.
- Finalmente as amostras foram filtradas através de membranas filtrantes com porosidade de 0,45µm e injetadas na coluna cromatográfica para análise.

2.2.3.3.2. Preparo do Padrão de Ácido Nicotínico

Pesou-se cerca de 50 mg do padrão de ácido nicotínico previamente seco em dessecador por 24 horas e dissolveu-se em 500 ml de H₂SO₄ 1N. Uma alíquota de 10 ml foi transferida para um balão de 100 ml e o volume foi completado com H₂SO₄ 1N. A solução foi diluída até concentrações comparáveis com as das amostras com H₂SO₄ 1N e filtradas através de membranas com porosidade de 0,45 µm. Os resultados dos cromatogramas foram utilizados para construção da curva-padrão, a partir da qual foram calculados os teores da vitamina nas amostras.

A quantificação do padrão foi feita por espectrofotometria a 261 nm, em solução de H₂SO₄ 0,1N. A concentração real foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade igual a 478 (BALL, 1994).

2.2.3.3.3. Determinação do Ácido Nicotínico

As análises foram conduzidas utilizando as seguintes condições cromatográficas:

- . Cromatógrafo líquido de alta eficiência, munido de bomba de pistão, modelo CG-480, operando em sistema isocrático
- . Detector espectrofotométrico, modelo Varian, UV 50 com comprimento de onda fixo de 261 nm, volume morto de 7,5 µl e atenuação de 0,2
- . Injetor Rheodyne 7125 equipado com loop de 100 µl
- . Integrador-processador, modelo CG-200, com integração eletrônica de área

- . Coluna Hibar RT 250-4, LiChrospher 100 RP18 (empacotada com partículas de sílica de 5µm, revestidas com octadecilsilano), com 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno
- . Fase móvel: 5% de acetonitrila + 95% de água (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico + 0,15% de trietilamina), com pH final ajustado para 2,8 com H₂SO₄ 1N
- . Vazão: 0,8 ml / minuto

As corridas cromatográficas tiveram duração de 20 minutos. A análise foi conduzida injetando-se 5 a 60 µl do padrão e 50 µl das amostras utilizando-se uma micro-seringa Hamilton, com capacidade de 100 µl.

2.2.3.4. Determinação da Faixa de Linearidade

Utilizando as condições cromatográficas otimizadas neste estudo para cada vitamina, a faixa de linearidade do sistema foi testada. Para tanto, preparou-se soluções com concentrações crescentes (faixa ampla) de cada um dos padrões (hidrocloreto de tiamina, riboflavina e ácido nicotínico) e injetou-se, em duplicata, na coluna cromatográfica. Utilizando-se os dados obtidos para as áreas dos picos e as concentrações correspondentes para cada uma das vitaminas, foi efetuada uma análise de regressão linear. A avaliação da linearidade foi feita pelo coeficiente de correlação (R^2) obtido em cada caso (ALBALÁ-HURTADO et alii, 1997).

2.2.3.5. Determinação do Limite de Detecção Quantitativo

Determinou-se o limite de detecção quantitativo, utilizando-se as condições cromatográficas otimizadas para cada vitamina. Assim, aumentou-se a atenuação do detector a um limite máximo tolerável e injetou-se, em triplicata, soluções em diluições sequenciais dos padrões vitamínicos. O limite de detecção quantitativo foi considerado como sendo o peso do padrão necessário para apresentar altura do seu pico igual a cinco vezes a altura média do ruído, e calculado de acordo com a concentração das soluções injetadas na coluna para análise (SNYDER & KIRKLAND, 1979).

2.2.3.6. Análise da Recuperação dos Padrões

De posse dos procedimentos de preparação das amostras e das condições cromatográficas otimizadas neste estudo para cada vitamina, foram efetuados testes de recuperação dos padrões adicionados às amostras cruas de carne bovina, suína e de frango. Para a determinação da recuperação de cada uma das vitaminas, procedeu-se da seguinte forma: fatiou-se de maneira bem homogênea e pesou-se, acuradamente, a mesma quantidade de cada um dos cortes de carnes em três tubos. Adicionou-se a dois dos tubos duas diferentes concentrações do padrão vitamínico e procedeu-se à extração e análise da vitamina como otimizado anteriormente. Os testes foram feitos utilizando-se três repetições, sendo as amostras analisadas em duplicata.

2.2.3.7. Análise dos Resultados

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram conduzidas com o auxílio do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas), versão 7.0, 1997 da Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização da Metodologia de Preparação das Amostras

3.1.1. Tiamina

Os resultados das análises por CLAE mostraram que a carne suína contém um alto teor de tiamina e, assim, 1g desta carne foi suficiente para o preparo da amostra. Para extração de tiamina em carne bovina e de frango, 5g de cada amostra foram necessários para apresentar cromatogramas adequados para quantificação.

Uma síntese dos teores de tiamina extraídos nas amostras de carnes, utilizando-se as condições avaliadas, é mostrada na TABELA 1.

TABELA 1. Teores de tiamina determinados por CLAE ($\mu\text{g}/100\text{g}$) em amostras de carnes cruas utilizando diversos métodos de hidrólise (resultados expressos na base úmida)

Método de Hidrólise	Amostra		
	Bovina (alcatra) Média* $\pm$ DP	Suína (lombo) Média* $\pm$ DP	Frango (peito) Média* $\pm$ DP
Ácida (banho-maria/60min)	7,5 d $\pm$ 0,4	67,8 d $\pm$ 2,5	8,4 d $\pm$ 0,4
Ácida (autoclavagem/15 min)	7,7 d $\pm$ 0,3	68,9 d $\pm$ 3,1	9,0 d $\pm$ 0,6
Ácida (autoclavagem/30 min)	8,3 d $\pm$ 0,6	69,3 d $\pm$ 1,3	9,9 d $\pm$ 0,3
Ácida (banho-maria/60min)+enzimática	60,2 c $\pm$ 1,9	588,5 c $\pm$ 7,0	70,0 c $\pm$ 1,5
Ácida (autoclavagem/15 min) + enzimática	71,0 b $\pm$ 3,7	640,9 b $\pm$ 8,7	76,32 b $\pm$ 2,74
Ácida (autoclavagem/30 min) + enzimática	74,7 a $\pm$ 1,4	668,3 a $\pm$ 7,4	82,4 a $\pm$ 2,4

*Médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão (DP)

As repetições se referem ao método de hidrólise e ao método de análise

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

Pode ser verificado que a hidrólise ácida apenas (banho-maria/60 min; autoclavagem/15 min; autoclavagem/30 min) não foi eficiente na extração da tiamina livre, sendo os teores extraídos bastante reduzidos e considerados iguais estatisticamente. Quando a hidrólise enzimática com clara-díastase foi introduzida, em adição à hidrólise ácida em banho-maria por 60 minutos, houve um aumento médio no teor extraído de tiamina livre de cerca de 841%. A porcentagem média de extração aumentou ainda mais (894%) quando se utilizou a hidrólise ácida em autoclave por 15 minutos, seguida da hidrólise enzimática; ou a hidrólise ácida em autoclave por 30 minutos, também seguida

da hidrólise enzimática (945% de aumento do teor de tiamina livre extraído). Observou-se, assim que, dos métodos de hidrólise avaliados para tiamina, a hidrólise ácida em autoclave a 121°C por 30 minutos, seguida de hidrólise enzimática com clara-díastase foi considerado o melhor, resultando numa maior quantidade de tiamina livre extraída nos três tipos de carnes. Os resultados obtidos por este último método de hidrólise estão de acordo com aqueles relatados por DAWSON (1988) e AWONORIN & ROTIMI (1991) que utilizaram um método de hidrólise similar.

Sabe-se que a digestão ácida a quente promove a liberação da tiamina e ésteres de tiamina fosfato de sua associação com as proteínas ou carboidratos (BALL, 1994). Nossos resultados mostraram que a autoclavagem a 121°C por 30 minutos foi mais eficiente para esta finalidade. Por outro lado, verificou-se que para as carnes (que contêm tiamina principalmente na forma de tiamina pirofosfato - TPP), a hidrólise enzimática foi de fundamental importância na liberação das formas fosforiladas para tiamina livre.

3.1.2. Riboflavina

Os resultados das análises por CLAE mostraram que 5 g de cada amostra foram necessários para apresentar cromatogramas adequados para a quantificação da riboflavina.

A TABELA 2 mostra os teores de riboflavina extraídos nos três tipos de carnes, utilizando-se diferentes condições de preparo das amostras.

Analisando os métodos de hidrólise testados, observa-se uma tendência semelhante àquela obtida para tiamina. Mais uma vez, a hidrólise ácida apenas (banho-maria/60 min; autoclavagem/15 min; autoclavagem/30 min) extraiu teores bastante reduzidos de riboflavina livre, sendo que os três métodos avaliados foram considerados iguais estatisticamente. A introdução da hidrólise enzimática com clara-díastase, em adição à hidrólise ácida, aumentou, significativamente, a média dos teores de riboflavina livre extraídos (902%: hidrólise ácida em banho-maria por 60 minutos; 945%: hidrólise ácida

em autoclave a 121°C por 15 minutos; 998%: hidrólise ácida em autoclave a 121°C por 30 minutos).

Assim, a hidrólise ácida em autoclave a 121°C por 30 minutos, seguida de hidrólise enzimática com clara-diaxase, apresentou uma maior eficiência na quantidade de riboflavina livre extraída nos três tipos de carnes, sendo considerado o melhor método de preparo das amostras. DAWSON (1988) e AWONORIN & ROTIMI (1991) obtiveram resultados para riboflavina semelhantes aos nossos utilizando métodos de hidrólise similares.

TABELA 2. Teores de riboflavina determinados por CLAE ($\mu\text{g}/100\text{g}$) em amostras de carnes cruas utilizando diversos métodos de hidrólise (resultados expressos na base úmida)

Método de Hidrólise	Amostra		
	Bovina (alcatra) Média* $\pm$ DP	Suína (lombo) Média* $\pm$ DP	Frango (peito) Média* $\pm$ DP
Ácida (banho-maria/60min)	11,5 d $\pm$ 0,6	21,4 d $\pm$ 0,7	7,6 d $\pm$ 0,5
Ácida (autoclavagem/15 min)	12,3 d $\pm$ 0,5	22,9 d $\pm$ 1,2	7,7 d $\pm$ 0,6
Ácida (autoclavagem/30 min)	12,7 d $\pm$ 0,5	23,0 d $\pm$ 1,0	8,2 d $\pm$ 0,4
Ácida (banho-maria/60min)+enzimática	113,9 c $\pm$ 2,6	201,6 c $\pm$ 2,8	68,3 c $\pm$ 1,5
Ácida (autoclavagem/15 min) + enzimática	118,9 b $\pm$ 2,8	213,8 b $\pm$ 1,3	72,4 b $\pm$ 1,7
Ácida (autoclavagem/30 min) + enzimática	125,2 a $\pm$ 1,5	224,0 a $\pm$ 2,7	75,9 a $\pm$ 1,1

*Médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão (DP)

As repetições se referem ao método de hidrólise e ao método de análise

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

Verificou-se, ainda, que a hidrólise enzimática efetuada com clara-díastase (Fluka) foi bem mais efetiva na extração da vitamina em relação ao uso da clarase e α -amilase (Sigma), também avaliadas. Observou-se que a quantidade de riboflavina extraída utilizando a hidrólise com α -amilase foi reduzida (15% daquela obtida com a hidrólise enzimática com clarase e 11,06% daquela obtida com o uso da clara-díastase), não diferindo estatisticamente da quantidade obtida pela hidrólise ácida apenas (autoclavagem/30 minutos). Em relação à clara-díastase, o uso da clarase para extração da riboflavina nas amostras de carne foi menos efetivo (26,29% menor). Estes resultados confirmam a superioridade da clara-díastase da Fluka (HÄGG, 1994). Verificou-se, assim, que a hidrólise enzimática (assim como o tipo e marca da enzima) é um processo essencial na transformação da FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) e da FMN (Flavina Mono Nucleotídeo), presentes nas amostras, para riboflavina livre. A transformação dos compostos de riboflavina na forma livre facilita as análises por CLAE, onde apenas o padrão de riboflavina livre precisa ser utilizado.

3.1.3. Ácido Nicotínico

Para a análise do ácido nicotínico por CLAE foram necessários 8g de cada amostra para se obter cromatogramas adequados para a quantificação. Uma quantidade menor de amostra dificulta a visualização e a separação do pico de interesse. Uma quantidade superior prejudica a separação da vitamina, devido à presença de grande quantidade de compostos interferentes coextraídos durante o preparo da amostra.

Os resultados obtidos para ácido nícotínico, utilizando a hidrólise ácida e alcalina, estão dispostos na TABELA 3.

Observa-se que os métodos de hidrólise alcalina (autoclavagem por 30 e 60 minutos) utilizados para os três tipos de carne extraíram quantidades do ácido nicotínico consideradas iguais estatisticamente. Os teores de ácido nicotínico extraídos nos três tipos de carne, aumentaram 18%, em média, quando se utilizou a hidrólise ácida em autoclave por 30 minutos. A extração

desta vitamina, utilizando o método de hidrólise ácida em autoclave por 60 minutos, foi a mais eficiente (extraiu, em média, 15% mais), quando comparado com a autoclavagem a 121 °C por 30 minutos, como sugere a AOAC (1995d). Acredita-se que a presença de uma maior quantidade de compostos extraídos durante a hidrólise alcalina, dificultando a resolução do pico do ácido nicotínico, também tenha interferido nos resultados apresentados. Assim, a limpeza dos extratos resultantes da hidrólise alcalina poderia melhorar estes resultados, apesar de elevar o tempo necessário para o preparo das amostras e aumentar o custo das análises.

TABELA 3. Teores de ácido nicotínico determinados por CLAE (mg/100g) em amostras de carnes cruas utilizando diferentes métodos de hidrólise (resultados expressos na base úmida)

Método de Hidrólise	Amostra		
	Bovina (alcatra) Média* ± DP	Suína (lombo) Média* ± DP	Frango (peito) Média* ± DP
Alcalina (autoclavagem/30minutos)	4,0 c ± 0,6	2,9 c ± 0,4	6,5 c ± 0,6
Alcalina (autoclavagem/60minutos)	4,0 c ± 0,7	3,0 c ± 0,5	6,5 c ± 0,7
Ácida (autoclavagem/30minutos)	4,9 b ± 0,3	4,2 b ± 0,2	7,0 b ± 0,3
Ácida (autoclavagem/60minutos)	5,8 a ± 0,4	4,9 a ± 0,2	8,3 a ± 0,3

*Médias de 3 repetições ± desvio padrão (DP)

As repetições se referem ao método de hidrólise e ao método de análise

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

3.2. Otimização das Condições Cromatográficas

3.2.1. Determinação da Tiamina

As soluções de metanol: água: ácido acético (29: 70: 1), contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico e as porcentagens variadas de metanol e cloreto de potássio (KCl) 0,25% mostraram cromatogramas satisfatórios. Assim, o uso do metanol: cloreto de potássio 0,25% (40: 60), com um fluxo 0,8 ml/minuto apresentou-se como a melhor alternativa por razões de economia e menor tempo nas análises cromatográficas.

O perfil cromatográfico típico da tiamina em amostras cruas de carne bovina, suína e de frango é mostrado na FIGURA 1. Pode ser verificado que o uso da derivatização da tiamina para tiocromo possibilitou a purificação dos extratos das amostras a serem analisadas. A análise cromatográfica de extratos preparados como o padrão, mas sem a presença deste, mostrou não haver nenhum composto eluindo no mesmo tempo de retenção do padrão (tiocromo). Isso indica que apenas a tiamina transformada para tiocromo nos padrões e nas amostras corresponde ao pico estudado.

Através da FIGURA 2 observa-se o perfil cromatográfico das amostras de carne após adição do padrão do hidrocloreto de tiamina.

As duas colunas de fase reversa testadas (Capcell Pak-Shiseido, 5 μ m, 6 x 150 mm e Hibar RT 250-4, LiChrospher 100, 5 μ m, 4 x 250 mm) foram eficientes. Ambas as colunas apresentaram características cromatográficas semelhantes, embora o tempo de retenção da tiamina tenha sido ligeiramente superior quando a coluna com maior comprimento foi usada.

FIGURA 1. Análise por CLAE da tiamina em carnes cruas. (a) padrão de tiamina, (b) alcatra bovina, (c) lombo suíno; (d) peito de frango. Fase móvel: 40% de metanol + 60% de cloreto de potássio 0,25%; coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 0,8ml/min.

FIGURA 2. Análise por CLAE da tiamina em carnes cruas. (a) alcatra bovina; (b) lombo suíno; (c) peito de frango após adição de 50 ng/ml do padrão de tiamina. Fase móvel: 40% de metanol + 60% de cloreto de potássio 0,25%; coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 0,8ml/min.

O espectro de absorção em tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5 da tiamina é mostrado na FIGURA 3. Este espectro é característico da tiamina, de acordo com BALL (1994).

FIGURA 3. Espectro de absorção do hidrocloreto de tiamina em tampão fosfato 0,1M, pH 5,5.

3.2.2. Determinação da Riboflavina

As combinações de metanol e cloreto de potássio 0,25%, utilizando-se fluxos entre 0,5 e 1 ml/minuto foram incapazes de promover uma separação adequada da riboflavina nas amostras de carnes estudadas, mesmo com fluxos reduzidos que poderiam melhorar a resolução, e com o uso da detecção por fluorescência que é mais seletiva (FIGURA 4).

As demais condições cromatográficas testadas apresentaram resoluções cromatográficas menores para a separação da riboflavina nas amostras avaliadas.

Por outro lado, o uso de metanol, água e ácido acético, contendo ácido heptano sulfônico como fase móvel, mostrou boa resolução na separação dos componentes extraídos das amostras de carne. A combinação composta por metanol: água: ácido acético (39: 60: 1) contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico com fluxo 0,8 ml/minuto (FIGURA 5) promoveu uma resolução mínima, mas aumentou o tempo da análise cromatográfica sem necessidade.

FIGURA 4. Análise por CLAE da riboflavina em carne crua. (a) solução padrão, (b) contra-filé bovino. Fase móvel: 50% de metanol + 50% de cloreto de potássio 0,25%; coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 0,5 ml/min.

FIGURA 5. Análise por CLAE da riboflavina em carne crua. (a) solução padrão, (b) contra-filé bovino. Fase móvel: 39% de metanol + 60% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico); coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 0,8 ml/min.

A melhor combinação foi aquela composta por 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico) com vazão de 1,0 ml/minuto. Esta condição, além de permitir boa resolução, reduziu o tempo da análise cromatográfica. A FIGURA 6 mostra a separação cromatográfica típica da riboflavina em amostras cruas de carne bovina, suína e de frango, utilizando as condições anteriores. Verifica-se uma separação eficiente com os picos de interesse completamente resolvidos no menor tempo possível. Este resultado só foi possível através de avaliação cuidadosa do melhor procedimento para a extração da riboflavina nas amostras de carne. Uma separação cromatográfica eficiente só foi obtida depois da seleção da fase móvel mais apropriada para esta análise.

FIGURA 6. Análise por CLAE da riboflavina carnes cruas. (a) padrão de riboflavina, (b) alcatra bovina, (c) lombo suíno; (d) peito de frango. Fase móvel: 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico); coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 1 ml/min.

Para a separação da riboflavina, somente se obteve êxito com a utilização da cromatografia de íons pareados, na qual o uso do contra-íon ácido heptano sulfônico foi de essencial importância.

A FIGURA 7 ilustra a separação cromatográfica da riboflavina nas amostras cruas de carne bovina, suína e de frango após adição do padrão de riboflavina.

Tanto a coluna RP 18 Capcell Pak-Shiseido, 5 μ m, 6 x 150 mm, quanto a RP 18 Hibar RT 250-4, LiChrospher 100, 5 μ m, 4 x 250 mm separaram com boa resolução a riboflavina dos outros picos, utilizando a condição cromatográfica otimizada acima. Assim fica evidente que é importante a otimização da preparação das amostras e das condições cromatográficas.

FIGURA 7. Análise por CLAE da riboflavina em amostras de carnes cruas. (a) alcatra bovina, (b) lombo suíno; (c) peito de frango após adição 250 ng/ml do padrão de riboflavina. Fase móvel: 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico); coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 1 ml/min.

O espectro de absorção característico (BALL, 1994) obtido do padrão de riboflavina utilizado neste estudo é visualizado na FIGURA 8.

FIGURA 8. Espectro de absorção da riboflavina em ácido acético 0,02N.

3.2.3. Determinação do Ácido Nicotínico

O uso de diversas combinações de metanol e tampão acetato de sódio 0,01M (pH 4,7) contendo brometo de tetrabutilamônio não permitiu identificar qualquer pico como sendo o de ácido nicotínico.

A solução composta por 16% de acetonitrila + 84% de água contendo 0,005M de fosfato de tetrabutilamônio promoveu uma melhor resolução cromatográfica, quando a hidrólise alcalina foi utilizada para o preparo das amostras. Para amostras de carne provenientes da hidrólise ácida, o tempo de retenção mais próximo do padrão de ácido nicotínico foi em torno de 6,20 minutos, enquanto que nas amostras oriundas da extração alcalina o tempo de retenção mais próximo do padrão foi em torno de 7,6 (FIGURA 9). Esta fase móvel não foi satisfatória por apresentar os picos de interesse com "ombros" e resultados quantitativos não coerentes.

Quando combinações de acetonitrila e água (9: 91), contendo 0,5% de trietilamina ou trietanolamina, ácido heptano sulfônico ou ácido hexano sulfônico e ácido fosfórico ou ácido sulfúrico para ajuste do pH foram testadas, o perfil cromatográfico das carnes estudadas mostrou um pico perfeitamente separado e com o mesmo tempo de retenção do padrão analisado nas mesmas condições (FIGURA 10). O uso de trietilamina na fase móvel resultou num perfil cromatográfico com menor número de compostos interferentes, em comparação com o uso da trietanolamina. No entanto, a análise quantitativa das amostras de carnes estudadas apresentou resultados 15 a 20 vezes

maiores do que o reportado na literatura (DAWSON et alii, 1988; AWONORIN & ROTIMI, 1991). O levantamento do espectro de absorção do pico de interesse no ultravioleta, usando um detector espectrofotométrico de arranjos de diodos, confirmou não se tratar do ácido nicotínico.

FIGURA 9. Análise por CLAE do ácido nicotínico em carnes cruas. (a) solução padrão de ácido nicotínico; (b) carne bovina, hidrólise ácida (c) carne suína, hidrólise ácida; (d) carne de frango, hidrólise ácida; (e) carne bovina, hidrólise alcalina (f) carne de frango, hidrólise alcalina. Fase móvel: 16% de acetonitrila + 84% de água contendo 0,005M de fosfato de tetrabutilamônio; coluna RP 18; detecção UV a 254 nm; vazão: 1 ml/min.

FIGURA 10. Análise por CLAE do ácido nicotínico em carnes cruas. (a) solução padrão; (b) carne bovina; (c) carne suína; (d) carne de frango. Fase móvel: 9% de acetonitrila + 91% de água contendo 0,5% de trietilamina + 0,005M de ácido heptano sulfônico; pH ajustado para 2,74 com ácido fosfórico; coluna RP18; detecção UV a 254 nm; vazão: 1 ml/min.

O uso de 5% de acetonitrila + 95% de água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico e 0,15% de trietilamina, pH final ajustado para 2,8 com H_2SO_4 1N, utilizando uma vazão de 0,8 ml/minuto, forneceu o melhor resultado na separação cromatográfica. A identidade do pico de ácido nicotínico foi confirmada através do detector espectrofotométrico de arranjos de diodos e os resultados obtidos foram coerentes com a literatura (HUTCHISON et alii, 1987a; HUTCHISON et alii, 1987b; FRANCO, 1992).

A separação cromatográfica típica do ácido nicotínico em amostras cruas de carne bovina, suína e de frango, utilizando as condições descritas acima, está ilustrada na FIGURA 11. A análise cromatográfica revelou que o extrato obtido das amostras apresentou muitos compostos que eluíram com fator de capacidade próximo ao ácido nicotínico. Apesar disso, a fase móvel utilizada, com o uso imprescindível do contra-íon ácido heptano sulfônico e da trietilamina, possibilitou uma eficiente separação cromatográfica do ácido nicotínico dos outros componentes presentes no extrato. A FIGURA 12 mostra o perfil cromatográfico das amostras de carnes após adição do padrão de ácido nicotínico.

O espectro de absorção do ácido nicotínico em H_2SO_4 0,1N é mostrado na FIGURA 13. Este espectro característico está de acordo com o descrito na literatura (BALL, 1994). Esta informação foi útil, também, para selecionar o comprimento de onda de máxima absorção (261 nm) nas análises cromatográficas.

FIGURA 11. Análise por CLAE do ácido nicotínico (AN) em carnes cruas. (a) solução de H_2SO_4 1N onde foi preparado o padrão; (b) solução padrão de AN; (c) carne bovina; (d) carne suína; (e) carne de frango. Fase móvel: 5% de acetonitrila + 95% de água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico + 0,15% de trietilamina, pH ajustado para 2,8 com H_2SO_4 1N; coluna RP 18; detecção UV a 261 nm; vazão: 0,8 ml/min.

FIGURA 12. Análise de ácido nicotínico (AN) em carnes cruas por CLAE. (a) carne bovina; (b) carne suína; (c) carne de frango após adição do padrão de AN. Fase móvel: 5% de acetonitrila + 95% de água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico + 0,15% de trietilamina; pH ajustado para 2,8 com H_2SO_4 1N; coluna RP 18; detecção UV a 261 nm; vazão: 0,8 ml/min.

FIGURA 13. Espectro de absorção do ácido nicotínico em H_2SO_4 0,1N.

Em amostra de peito de frango, o pico que eluiu no tempo de retenção do padrão foi analisado pelo detector de arranjos de diodos, o qual mostrou uma pureza de 0,9995 e um espectro de absorção característico do ácido nicotínico (FIGURA 14).

FIGURA 14. Perfil espectral do pico de (a) ácido nicotínico, (b) do pico correspondente na amostra de peito de frango e (c) sobreposição dos dois anteriores analisados pelo detector de arranjos de diodos.

Das duas colunas avaliadas, a RP 18 Hibar RT 250-4, LiChrospher 100, 5 μ m, 4 x 250 mm apresentou maior resolução na separação do ácido nicotínico presente nas amostras de carnes.

3.3. Análises Cromatográficas Quantitativas

3.3.1. Faixa de Linearidade e Limite de Detecção Quantitativo

Os resultados da calibração, faixa de linearidade e limite de detecção quantitativo para tiamina, riboflavina e ácido nicotínico, utilizando as condições otimizadas neste estudo, estão dipostos na TABELA 4. Pode-se observar que a faixa de linearidade foi ampla para cada vitamina, o que assegura a obtenção de dados confiáveis nas faixas estudadas. Um coeficiente de correlação (R^2) acima de 0,998 foi obtido para todas as vitaminas.

TABELA 4. Dados de calibração, faixa de linearidade e limite de detecção quantitativo (LDQ) obtidos para tiamina, riboflavina e ácido nicotínico.

Vitamina	Equação	(R^2)	Faixa Linear	LDQ
Tiamina	$Y = 1073,07 X + 2434,294$	0,999146	0,96-576ng	0,01ng/injeção
Riboflavina	$Y = 516,5303 X + 583,827$	0,998575	0,9657-57,942ng	0,15ng/injeção
Ácido Nicotínico	$Y = 10933,57 X + 306,9496$	0,999985	0,044-14,08 μ g	0,02 μ g/injeção

R^2 : Coeficiente de Correlação

Y : área do pico

X : peso da vitamina injetado (tiamina e riboflavina: ng; ácido nicotínico: μ g)

3.3.2. Recuperação dos Padrões Adicionados às Amostras

A recuperação de tiamina, riboflavina e ácido nicotínico adicionados às amostras cruas de carnes é mostrada nas TABELAS 5; 6 e 7, respectivamente.

TABELA 5. Recuperação da tiamina (B₁) adicionada às amostras cruas de carnes bovina, suína e de frango (resultados expressos em base úmida)

Amostra	Teor inicial de B ₁ (µg/100g) Média* ± DP	Quantidade de B ₁ adicionada (µg/100g)	Teor final de B ₁ (µg /100g) Média* ± DP	Recuperação (%)** Média* ± DP
Bovina (coxão mole)	67,0 ± 3,8	15,6	76,4 ± 4,4	90,7 ± 4,7
	67,0 ± 3,7	31,3	91,4 ± 6,2	89,8 ± 5,6
Suína (pernil)	558,6 ± 3,8	117,3	709,2 ± 5,4	105,9 ± 1,1
	558,6 ± 3,8	234,6	791,9 ± 8,1	99,7 ± 1,4
Frango (peito)	87,2 ± 3,4	15,6	98,8 ± 4,2	95,4 ± 1,0
	87,2 ± 3,4	31,3	111,9 ± 5,3	92,4 ± 3,0

*Médias de 3 repetições ± desvio padrão (DP)

** % de Recuperação = (teor final de tiamina) - (quantidade de tiamina adicionada) / (teor inicial de tiamina) x 100

TABELA 6. Recuperação da riboflavina (B₂) adicionada às amostras cruas de carnes bovina, suína e de frango (resultados expressos em base úmida)

Amostra	Teor inicial de B ₂ (µg/100g) Média* ± DP	Quantidade de B ₂ adicionada (µg/100g)	Teor final de B ₂ (µg /100g) Média* ± DP	Recuperação (%)** Média* ± DP
Bovina (coxão mole)	145,2 ± 4,0	67,9	206,2 ± 11,9	95,2 ± 5,8
	145,2 ± 4,0	135,8	292,3 ± 4,7	107,7 ± 2,1
Suína (pernil)	263,1 ± 4,0	67,9	348,4 ± 2,7	106,6 ± 2,3
	263,1 ± 4,0	135,8	415,9 ± 7,8	106,4 ± 12,4
Frango (peito)	92,3 ± 4,0	50,9	140,3 ± 6,0	96,8 ± 2,5
	92,3 ± 4,0	101,9	195,0 ± 5,6	100,9 ± 2,9

*Médias de 3 repetições ± desvio padrão (DP)

** % de Recuperação = (teor final de riboflavina) - (quantidade de riboflavina adicionada) / (teor inicial de riboflavina) x 100

TABELA 7. Recuperação do ácido nicotínico (AN) adicionado às amostras cruas de carnes bovina, suína e de frango (resultados expressos em base úmida)

Amostra	Teor inicial de AN (mg/100g) Média* ± DP	Quantidade de AN adicionada (mg/100g)	Teor final de AN (mg/100g) Média* ± DP	Recuperação (%)** Média* ± DP
Bovina (coxão mole)	3,85 ± 0,18	2,5	6,27 ± 0,26	97,9 ± 0,82
	3,66 ± 0,17	5,0	8,41 ± 0,26	93,2 ± 0,7
Suína (pemil)	4,55 ± 0,22	2,5	7,22 ± 0,29	103,7 ± 1,6
	4,15 ± 0,17	5,0	9,06 ± 0,24	97,8 ± 0,3
Frango (peito)	8,45 ± 0,28	5,0	13,97 ± 0,32	106,1 ± 1,1
	8,11 ± 1,14	7,5	16,33 ± 0,18	108,9 ± 1,1

*Médias de 3 repetições ± desvio padrão (DP)

** % de Recuperação = (teor após adição de AN) - (quantidade de AN adicionada) / (teor inicial de AN) x 100

De acordo com a TABELA 5, a porcentagem de recuperação para tiamina nos três tipos de carne variou entre 89,8 e 105,9%. A taxa de recuperação foi inferior em amostras de carne bovina (90,3%, em média), intermediária em carne de frango (93,9%, em média) e maior em carne suína (102,8%, em média). Estes resultados indicam maior segurança para a aplicação da metodologia otimizada para a análise de carne suína. Acredita-se que a variação nas porcentagens de recuperação obtidas para as três espécies de carne se deva a diferenças na composição dos tecidos, especialmente, tecido conjuntivo e gordura.

A recuperação obtida para riboflavina (TABELA 6) ficou entre 95,2 e 106,6% nos três tipos de carnes estudados, sendo superior à faixa obtida para tiamina. A necessidade de derivatização da tiamina para tiocromo, antes da análise cromatográfica, resulta numa maior manipulação das amostras, o que pode ter apresentado influência na porcentagem de recuperação obtida. Verifica-se que a porcentagem média de recuperação em carne bovina foi de 101,4%; 106,5% em carne suína e 98,8% em carne de frango. Desta forma, a

riboflavina pode ser analisada com maior segurança em carne bovina e de frango, utilizando a metodologia aqui otimizada.

Observa-se, pela TABELA 7, que a recuperação do ácido nicotínico adicionado nas amostras de carnes variou entre 93,2 e 108,9%. A melhor taxa de recuperação foi conseguida em carne suína (100,7% em média), o que indica uma maior segurança para a aplicação da metodologia otimizada neste tipo de carne.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- O método de hidrólise ácida em autoclave a 121°C por 30 minutos, seguido de hidrólise enzimática com clara-díastase, apresentou maior eficiência e resultou em dados mais coerentes para extração da tiamina e riboflavina em amostras de carne bovina, suína e de frango.
- Para a extração do ácido nicotínico, a hidrólise ácida em autoclave a 121°C por 60 minutos foi o método promoveu os melhores resultados.
- As condições cromatográficas otimizadas para análise de tiamina, riboflavina e ácido nicotínico em carne bovina, suína e de frango apresentaram boa eficiência e permitiram a obtenção de dados quantitativos confiáveis. Para as três vitaminas, foram necessárias avaliações de diversas condições até se chegar àquelas finalmente selecionadas.
- As faixas de linearidade, os limites de detecção e as porcentagens de recuperação obtidos confirmaram a adequação das condições de preparo das amostras e as condições cromatográficas otimizadas para análise de tiamina, riboflavina e ácido nicotínico em carne bovina, suína e de frango.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AGOSTINI, T. S., GODOY, H. T. **Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos**. Campinas, 1996, 183 p. [Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
- ALBALÁ-HURTADO, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., IZQUIERDO-PULIDO, M., MARINÉ-FONT, A. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 778, p. 247-253, 1997.
- ANG, C. Y. W. , MOSELEY, F. A. Determination of thiamin and riboflavin in meat and meat products by high-performance liquid chromatography, **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 28, n. 3, p. 486-489, 1980.
- AOAC Niacin and niacinamide in drugs, foods and feeds. Colorimetric method. First Action 1961, Final Action 1962. In: CUNNIFF, P., ed. **AOAC official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 1995d. 961.14.
- AOAC Riboflavin (Vitamin B₂) in foods and vitamin preparations. Fluorimetric method. First Action 1970, Final Action 1971. In: CUNNIFF, P., ed. **AOAC Official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 1995c. 970.65.
- AOAC Thiamine (Vitamin B₁) in bread. Fluorimetric method. Final Action 1960. In: CUNNIFF, P., ed. **AOAC official methods of analysis**, 16.ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 1995b. 957.17.
- AOAC Thiamine (vitamin B₁) in foods. Fluorimetric method. Final Action. In: CUNNIFF, P., ed. **AOAC official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 1995a. 942.23.

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1996.

- AWONORIN, S. O. , ROTIMI, D. K. Effects of oven temperature and time on the losses of some B vitamins in roasted beef and pork. **J. Foodservice Syst.**, Trumbull, v. 6, p. 89-105, 1991.
- BALL, G. F. M. **Water-soluble vitamin assays in human nutrition**. London: Chapman & Hall, 1994. 416 p.
- BARNA, E., DWORSCHÁK, E. Determination of thiamine (vitamin B₁) and riboflavin (vitamin B₂) in meat and liver by HPLC. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 668, p. 359-363, 1994.
- CARVALHO, P. R. N. **Análise de vitaminas em alimentos**. Campinas: ITAL, 1993. 108p. [Manual Técnico].
- DAWSON, K. R., UNKLESBAY, N.F. , HEDRICK, H. B. HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate heat-processing methods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.36, p. 1176-1179, 1988.
- FELLMAN, J. K., ARTZ, W. E., TASSINARI, P. D., AUGUSTIN, J. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by HPLC. **J. Food Sci.**, Chicago, v.47, p.2048-2050, 1982.
- HÄGG, M. Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamin and riboflavin in foods. **J. AOAC Int.**, Washington, v.77, n.3, p.681-686, 1994.
- HUTCHISON, G. I., GREENFIELD, H., WILLS, R. B. H. Composition of australian foods. 35. Pork. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.216-222, 1987b.
- HUTCHISON, G. I., THOMAS, D. E., TRUSWELL, A .S. Nutrient composition of australian beef. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.199-201, 1987a.
- KADER, Z. M. A., RYLEY, J. The riboflavin content of blanched soya beans, a comparison of three methods of analylis. **J. Micronutr. Anal.**, Barking, v.4, p.169-174, 1988.
- MAURO, D. J., WETZEL, D. L. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in enriched cereal based products by HPLC using seletive detection. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.299, p.281-287, 1984.
- MOREIRA, R. S. R. **Efeito da restrição de vitaminas e minerais na alimentação de frangos de corte sobre o valor nutricional da carne**. Fortaleza, 1995. [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará].

- OLLILAINEN, V., MATTILA, P., VARO, P., KOIVISTOINEN, P. HUTTUNEN, J. The HPLC determination of total riboflavin in foods. **J. Micronutr. Anal.**, Barking, v.8, p.199-207, 1990.
- OLLILAINEN, V., VAHTERISTO, L., UUSI-RAUVA, A., VARO, P., KOIVISTOINEN, P., HUTTUNEN, J. The HPLC determination of total thiamin (vitamin B₁) in foods. **J. Food Compos. Anal.**, Barking, v.6, p.152-165, 1993.
- SKURRAY, G. R. A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamin in foods. **Food Chem.**, Barking, v.7, p.77-80, 1981.
- SNYDER, L. R., KIRKLAND, L. L. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2.ed. New York: Wiley, 1979. 863p.
- TAKATSUKI, K., SUZUKI, S., SATO, M., SAKAI, K., USHIZAWA, I. Liquid chromatographic determination of free and added niacin and niacinamide in beef and pork. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.70, p.698-702, 1987.
- TYLER, T. A., GENZALE, J. A. Liquid chromatographic determination of total niacin in beef, semolina and cottage cheese. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.73, n.3, p.467-469, 1990.
- VIDAL-VALVERDE, C. V., RECHE, A. Determination of available niacin in legumes and meat by HPLC. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.39, p.116-121, 1991.
- VIDAL-VALVERDE, C. V., RECHE, A. Reliable system for the analysis of riboflavin in foods by high performance liquid chromatography and UV detection. **J. Liq. Chromatogr.**, New York, v.13, p.2089-2101, 1990.

Capítulo 3

RETENÇÃO DA TIAMINA EM CARNES PREPARADAS EM SERVIÇO DE ALIMENTAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A evolução do setor de refeições coletivas tem mostrado a necessidade de pesquisas sobre o desenvolvimento de produtos alimentícios novos e saudáveis para os Serviços de Alimentação institucionais. Neste contexto a retenção de nutrientes durante a preparação e processamento dos alimentos tem grande importância na qualidade das refeições servidas aos usuários.

Desde o início da civilização, alimentos provenientes dos músculos de animais têm servido bem à espécie humana. Apesar da carne bovina e suína serem as mais populares, o consumo de carne de aves tem crescido bastante (BRIGGS, 1985). O aumento da produção de frangos e seu potencial uso em restaurantes implica na necessidade de informações detalhadas sobre a sua qualidade e a retenção de nutrientes (AL-KHALIFA & DAWOOD, 1993).

Geralmente as carnes e produtos cárneos estão sujeitos a perdas de vitaminas e umidade sob severas condições de aquecimento, levando a perdas na qualidade do produto. Entretanto, a taxa destas perdas depende da temperatura, do tempo e do método do processamento utilizado (AWONORIN & ROTIMI, 1991).

A estabilidade das vitaminas hidrossolúveis pode ser reduzida não somente porque elas estão sujeitas a lixiviação, mas também devido à ação do calor. O processamento requer especial atenção, pois, frequentemente, o contato com a água leva a um decréscimo não só das vitaminas hidrossolúveis, mas de outros componentes que são importantes na nutrição como os responsáveis pelas qualidades sensoriais dos produtos. Portanto, um controle eficiente do tempo e temperatura de cocção, além do uso de uma quantidade mínima de água são essenciais para minimizar estas perdas (PAULUS, 1989).

A tiamina é um dos nutrientes mais termo-lábeis, sendo frequentemente usada como um indicador da retenção ou perda de vitaminas durante diferentes práticas de processamento de alimentos (COOKSEY et alii, 1990). A

sensibilidade desta vitamina aumenta com o aumento da umidade (PAULUS, 1989).

Tendo em vista que na área de Serviços de Alimentação a literatura internacional dispõe de poucos relatos sobre a retenção de nutrientes nos alimentos preparados, a incrementação destes estudos precisa ser enfatizada. Tais dados são muito importantes para enriquecer as tabelas de composição dos alimentos que são inestimáveis para o nutricionista na avaliação e planejamento de dietas, na preparação de guias nutricionais para programas alimentares e na determinação do impacto das recomendações para mudanças dietéticas (GODDARD & MATTHEWS, 1979). Assim, estudos adicionais são necessários para avaliar os efeitos do processamento sobre a retenção de vitaminas com vistas a maximizar sua retenção, quando preparações em grande escala são efetuadas.

A eficiência do forno combinado, um dos equipamentos industriais mais modernos, tem despertado interesse crescente no mercado de refeições coletivas. Este equipamento, que combina vapor e ar quente, desempenha diversas funções no dia a dia dos Serviços de Alimentação. Além de economizar tempo e espaço, preserva melhor o sabor e aspecto dos alimentos, reduzindo a perda de matéria prima durante o preparo. Ágil e versátil, o forno combinado representa uma nova etapa no processo de produção de refeições para coletividades, pois ele assa, cozinha, frita, gratina, grelha, descongela e regenera. Estes resultados podem ser conseguidos através da utilização de dois meios de cocção: o vapor (úmido) e o ar quente (seco). Combinadas, estas duas fontes de calor se multiplicam em três, cinco ou sete funções. E, quando corretamente utilizadas, preservam a umidade dos alimentos com perda mínima de seu peso original. Diante destas qualidades, um equipamento combinado pode alterar todo o processo de produção de um Serviço de Alimentação, resultando em maior qualidade do produto, redução da mão de obra e da estrutura física (COMBINAÇÃO... 1991). Por outro lado, o forno combinado exige melhor qualificação profissional de seus operadores para que se possa tirar proveito de todas as suas possibilidades (REVOLUÇÃO... 1996).

O forno combinado surgiu na Europa há cerca de 15 anos. Foi desenvolvido a partir da junção do "steamer" (cozedor a vapor) e do forno de convecção. O "steamer" é um equipamento industrial pouco difundido no Brasil, mas bastante utilizado na Europa, principalmente na cocção de verduras e legumes. A similaridade entre os dois equipamentos é que ambos operam com sistema de movimentação dirigida de ar (convecção: calor seco = ar quente) e de vapor ("steamer": calor úmido). Assim, o forno combinado, oriundo da fusão destes dois equipamentos, evoluiu e resultou em maiores possibilidades, que são justamente as funções combinadas. Quase todos os processos de preparo em Serviços de Alimentação podem ser realizados neste equipamento (COMBINAÇÃO... 1991).

A busca de modernidade nos Serviços de Alimentação incentivou muitas novas marcas de fornos combinados, fabricados por países do primeiro mundo como Alemanha, Itália, França e EUA. Algumas destas marcas são representadas e comercializadas no Brasil por algumas empresas (REVOLUÇÃO... 1996).

Bastante utilizados no exterior, os fornos combinados já são realidade em alguns Serviços de Alimentação de Coletividades no Brasil. Os responsáveis por estes serviços destacam sempre suas qualidades como a melhoria na produtividade das refeições e na qualidade dos produtos preparados (COMBINAÇÃO... 1991; REVOLUÇÃO... 1996). Os fabricantes têm relatado a maior retenção de nutrientes, entre eles as vitaminas e sais minerais, em relação às preparações feitas em equipamentos convencionais. No entanto, a literatura não mostra nenhum estudo científico comprovando esta afirmação. Alguns poucos estudos sobre a estabilidade de vitaminas em alimentos preparados em grandes quantidades utilizando equipamentos mais tradicionais foram publicados (DAWSON et alii, 1988; AWONORIN & ROTIMI, 1991; PINHEIRO-SANT'ANA, 1995).

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da preparação em Serviço de Alimentação sobre o conteúdo de tiamina (vitamina B₁) em diferentes cortes de carnes bovina, suína e de frango, além de avaliar a

estabilidade da vitamina após métodos de preparo em forno combinado em comparação com métodos de preparo convencionais. As carnes citadas foram escolhidas para este estudo por constituírem fontes ricas de tiamina e serem as mais frequentemente consumidas pelos brasileiros.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. Matéria Prima

Utilizou-se cortes de coxão mole, peixinho e acém de origem bovina; pernil de origem suína; peito, coxa, e sobrecoxa de frango. Os cortes de carnes suína e de frango se originaram da produção da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os cortes carnes bovina foram adquiridos dos frigoríficos Fricom e São João, ambos da cidade de Belo Horizonte, MG. As carnes foram transportadas para o Restaurante Universitário, sob forma congelada em veículo fechado, e com temperatura controlada. Em seguida, permaneceram em câmaras de congelamento a -18°C.

2.1.2. Reagentes e Outros Materiais

Os mesmos reagentes e materiais descritos no capítulo 2 foram utilizados nesta etapa.

2.1.3. Equipamentos

Utilizou-se os mesmos equipamentos descritos no Capítulo 2.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado com 16 tratamentos em 3 repetições. Os 16 tratamentos foram

constituídos por um fatorial 8x2, sendo 8 combinações de modo de preparo com equipamentos de preparação e 2 tempos de coleta (logo após cocção e 3 horas após cocção). As 8 combinações de preparação com equipamentos, para carne bovina, foram descritas como: grelhar x chapa bifeteira (C1); grelhar x forno combinado (C2); assar x panelão americano (C3); assar x forno combinado (C4); fritar x fritadeira industrial (C5); fritar x forno combinado (C6); refogar ou cozer sem imersão em água x panelão americano (C7) e refogar ou cozer sem imersão em água x forno combinado (C8). Para as carnes suína e de frango, as combinações de preparação foram iguais às para carne bovina, exceto a combinação C3 (assar) que foi em forno convencional.

Quando a interação tempo de coleta x combinações de preparo não foi significativa, foi utilizado o teste de amplitudes múltiplas de Duncan ($\alpha = 5\%$) para testar diferenças entre médias de retenção da tiamina e médias de perda de umidade das oito formas de preparação. Em caso contrário, foi decomposta a interação C/T e utilizado o teste de Duncan para testar diferenças entre médias de retenção da vitamina e médias de perda de umidade das oito formas de preparação em cada tempo de coleta.

As análises estatísticas foram conduzidas com o auxílio do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas), versão 7.0, 1997 da Universidade Federal de Viçosa.

2.2.2 Preparo das Amostras

As preparações foram efetuadas nas dependências do Serviço de Alimentação da Universidade Federal de Viçosa, MG, que produz, em média, 7.000 refeições diariamente.

No dia anterior à manipulação, as carnes foram retiradas da câmara frigorífica para descongelamento em temperatura de 18-22°C. Antes do fatiamento, o excesso de tecido conjuntivo e de gordura de cada corte de carne foi retirado. Em seguida, as carnes foram fatiadas de acordo com cada método de preparo, a saber: bifes com aproximadamente 8 cm de largura x 10 cm de comprimento x 1 cm de espessura (preparos grelhado e frito); pedaços

com 1,0 - 1,5 kg (carne bovina e suína assadas); moída (carne bovina refogada); iscas com aproximadamente 10 cm de comprimento x 2 cm de largura x 1,5 cm de espessura (carne suína refogada); coxa e sobrecoxa inteira (frango frito e assado); peito inteiro (frango cozido). Temperos de uso convencional (alho, sal, vinagre, pimenta, de acordo com cada preparação) foram, a seguir, aplicados nas carnes. Os bifes bovino e suíno fritos foram feitos à milaneza (empanados com ovo, farinha de trigo e farinha de rosca antes do processo de fritura).

Para efetuar as preparações, foi utilizado o forno combinado modelo CM6 da RATIONAL (Alemanha), comercializado no Brasil pela ENGEFOOD e gentilmente cedido como empréstimo para este experimento. Este forno foi escolhido por ser um equipamento que vem ganhando espaço e credibilidade nos restaurantes brasileiros pela sua versatilidade em relação à possibilidade de preparações, retenção de sabor, umidade e suculência dos produtos.

O modelo do forno combinado utilizado para este estudo possui os seguintes modos de operação: cozimento a vapor (calor úmido, substitui o cozimento por imersão em água, circulação do vapor com grande velocidade; indicado para cozimento de vegetais e algumas preparações de carnes); ar quente (calor seco, potente forno de convecção com turbina produzindo uma distribuição uniforme de temperatura; controle automático de tempo e temperatura; indicado para massas e carnes); combinado (ar quente - calor seco + vapor - calor úmido; a combinação permite um ambiente quente e úmido para o cozimento de maneira intensiva, impedindo o ressecamento do produto; indicado para carnes); regeneração (calor úmido + calor seco; permite aquecer sem ressecar pratos prontos); banho maria (calor úmido em baixa temperatura; indicado para alimentos delicados como lasanhas, peixes e pudins). Os recipientes "gastronorm" utilizados no interior do forno são recipientes padrão que podem ser usados durante a cocção e a distribuição dos pratos aos usuários. O sensor térmico consta de um estilete que é introduzido nas peças de carnes espessas para controle da temperatura no interior das mesmas.

Além do uso do forno combinado, todas as preparações foram efetuadas em equipamentos convencionais de modelo industrial, comumente utilizados no Brasil pela maioria dos Serviços de Alimentação (forno elétrico, modelo Wallig, com 2 câmaras; fritadeira elétrica, modelo Multifritas I-1; fogão a gás com queimadores duplos e chapas bifeteiras, modelo Wallig; panelão americano a vapor, modelo Sitec, capacidade 300 litros).

O modelo do forno combinado utilizado para este estudo, assim como aquele indicado para produção de grande número de refeições, são mostrados nas FIGURAS 1 e 2, respectivamente. Na FIGURA 3 pode ser visualizada a preparação de carne bovina para ser assada utilizando o sensor térmico.

FIGURA 1. Forno combinado (CM6, RATIONAL), mostrando em destaque o painel de controle utilizado para programar as preparações.

FIGURA 2. Forno combinado (CC 201, RATIONAL). Em destaque, o interior da câmara contendo frangos assados.

FIGURA 3. Forno combinado (CC 101, RATIONAL). Em destaque, o uso do sensor térmico para controle da temperatura do centro em carne bovina.

As condições de preparo das carnes utilizando-se o forno combinado basearam-se nas instruções do fabricante com algumas modificações, de acordo com o hábito alimentar dos brasileiros. Para as carnes preparadas nos equipamentos convencionais, utilizou-se as condições de preparo de rotina do Serviço de Alimentação da UFV.

A escolha das preparações procurou refletir o que é comumente usado nos Serviços de Alimentação brasileiros, levando-se também em consideração os hábitos alimentares com relação ao consumo das carnes. Assim, as carnes foram preparadas grelhadas, fritas, assadas, cozidas sem imersão em água ou refogadas.

Testes de cocção foram previamente conduzidos para estabelecer os tempos e temperaturas de cocção adequados para cada preparação. O início da cocção de cada preparação (tempo zero) foi estabelecido quando as amostras foram introduzidas no forno ou nos demais equipamentos. A cocção adequada foi testada durante os ensaios de cocção e avaliada sensorialmente de acordo com o hábito alimentar dos brasileiros.

Três repetições de cada preparação foram efetuadas. Assim, cada uma das preparações foi efetuada em diferentes dias, utilizando diferentes lotes de carne. As preparações foram programadas para atender aproximadamente 300 refeições.

Os métodos de preparação e equipamentos utilizados estão sintetizados na TABELA 1. As condições de preparo das carnes no forno combinado e nos equipamentos convencionais estão detalhadas nas TABELAS 2; 3; 4; 5; 6 e 7.

TABELA 1. Métodos de preparo em Serviço de Alimentação e condições de preparação de carne bovina, carne suína e carne de frango

Preparação	Matéria Prima	Equipamento Tradicional	Equipamento Alternativo
Grelhada	Carne bovina (coxão mole), carne suína (pernil), frango (peito)	Chapa bifeteira	Forno combinado
Assada	Carne bovina (peixinho), carne suína (pernil), frango (coxa e sobrecoxa)	Panelão americano, Forno convencional	Forno combinado
Frita	Carne bovina (coxão mole), carne suína (pernil), frango (coxa e sobrecoxa)	Fritadeira industrial	Forno combinado
Refogada ou Cozida sem Imersão em Água	Carne bovina (acém), carne suína (pernil), frango (peito)	Panelão americano	Forno combinado

TABELA 2. Preparações e condições de preparo de carne bovina em Serviço de Alimentação utilizando-se o forno combinado

Tipo de Cocção	Tipo de carne	Recipiente utilizado	Quantidade preparada por operação	Quantidade total preparada	Tipo de operação	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
Bife	coxão mole	gastronorm	12-15 bifes c/ 110	42 kg	ar quente (pré- aquecimento a 300°C)	13	220
Grelhado	resfriado (bifes)	esmaltado	g cada / recipiente; 8,5 kg / operação				
Bife Frito (à milaneza)	coxão mole resfriado (bifes)	gastronorm esmaltado	15-18 bifes c/ 140 g cada / recipiente; 15 kg / operação	45 kg	ar quente (pré- aquecimento a 300°C)	12	220
Carne Assada	peixinho (peça resfriada)	gastronorm esmaltado	4 peças de 1 kg cada / recipiente; 24 kg / operação	48 kg	combinado (pré- aquecimento a 300 °C); uso do sensor térmico a 75°C)	90	140
Carne Refogada	acém moída resfriada	gastronorm esmaltado	3,5 kg / recipiente; 21 kg / operação	42 kg	ar quente (pré- aquecimento a 250°C)	30	150

TABELA 3. Preparações e condições de preparo de carne suína em Serviço de Alimentação utilizando-se o forno combinado

Tipo de Cocção	Tipo de carne	Recipiente utilizado	Quantidade preparada por operação	Quantidade total preparada	Tipo de operação	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
Bife	pernil	gastronorm	10-15 bifes c/ 90 g	42 kg	ar quente (pré-	15	220
Grelhado	resfriado (bifes)	esmaltado	cada / recipiente; 7 kg/operação		aquecimento a 300°C)		
Bife Frito (à milaneza)	pernil	gastronorm	8-10 bifes c/ 135 g	40 kg	ar quente (pré-	20	220
	resfriado (bifes)	esmaltado	cada / recipiente; 8 kg / operação		aquecimento a 300°C)		
Carne	pernil	gastronorm	4 peças de 1,5 kg	48 kg	combinado (pré-	80	170
Assada	resfriado (peça)	esmaltado	cada / recipiente; 36 kg / operação		aquec. a 300 °C); uso do sensor térmico a 75°C)		
Carne	pernil	gastronorm	2,5 kg / recipiente; 15	45 kg	ar quente (pré-	15	180
Refogada	resfriado (iscas)	esmaltado	kg /operação		aquecimento a 250°C)		

TABELA 4. Preparações e condições de preparo de **carne de frango** em Serviço de Alimentação utilizando-se o forno combinado

Tipo de Cocção	Tipo de carne	Recipiente utilizado	Quantidade preparada por operação	Quantidade total preparada	Tipo de operação	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
Bife	peito	gastronorm	15-20 bifes c/ 70 g	42 kg	ar quente (pré-aquecimento a 300 °C)	18	220
Grelhado	resfriado (bifes)	esmalhado	cada / recipiente; 8 kg/operação				
Frango	coxa e	grelhas	15-18 pedaços de	54 kg	ar quente (pré-aquecimento a 300 °C)	20	170
Frito	sobrecoxa		180 g cada /				
	resfriada		recipiente; 17 kg /		ar quente	20	220
			operação				
Frango	coxa e	grelhas	15-18 pedaços de	54 kg	combinado (pré-aquecimento a 300 °C);	20	220
Assado	sobrecoxa		180 g cada				
	resfriada		/recipiente; 17 kg /		ar quente	20	220
			operação				
Frango	peito	grelhas	10-15 pedaços de 50	48 kg	vapor (pré-aquecimento a 180 °C)	16	97-98
Cozido	resfriado		g cada /recipiente; 12				
			/ operação				

TABELA 5. Preparações e condições de preparo de carne bovina em Serviço de Alimentação utilizando-se equipamentos convencionais

Tipo de Cocção	Tipo de carne	Equipamento Utilizado	Quantidade preparada por operação	Quantidade total preparada	Tipo de operação	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
Bife	coxão mole	chapa	25-30 bifes c/ 110g	42 kg	grelhar (pré-aquecimento a 185°C	4	180
Grelhado	resfriado (bifes)	bifeteira a gás	cada / chapa; 6 kg/operação				
Bife Frito (à milaneza)	coxão mole resfriado (bifes)	fritadeira elétrica	12-15 bifes c/ 140 g cada / cesto; 4 kg/operação	45 kg	fritar (pré-aquecimento a 165°C	3	150-160
Carne Assada	peixinho (peça resfriada)	panelão americano	55 peças de 1kg cada / panelão; 55 kg/operação	55 kg	assar	105	97-98
Carne Refogada	acém moída resfriada	panelão americano	50kg / panelão; 50 kg/operação	50 kg	refogar	75	97-98

TABELA 6. Preparações e condições de preparo de **carne suína** em Serviço de Alimentação utilizando-se equipamentos convencionais

Tipo de Cocção	Tipo de carne	Equipamento utilizado	Quantidade preparada por operação	Quantidade total preparada	Tipo de operação	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
Bife	pernil	chapa	20-25 bifes c/ 90 g	42 kg	grelhar (pré-aquecimento a 185°C)	4,5	180
Grelhado	resfriado (bifes)	bifeteira a gás	cada / chapa; 4 kg / operação				
Bife Frito (à milaneza)	pernil resfriado (bifes)	fritadeira elétrica	12-15 bifes c/ 135 g cada / cesto; 4 kg / operação	40 kg	fritar (pré-aquecimento a 160°C)	20	220
Carne Assada	pernil resfriado (peça)	forno convencional	8 peças de 1,5 kg cada / tabuleiro; 24 kg/operação	48 kg	assar (pré-aquec. a 190 °C)	120	90
Carne Refogada	pernil resfriado (iscas)	panelão americano	45 kg / panelão; 45 kg/operação	45 kg	refogar	60	97-98

TABELA 7. Preparações e condições de preparo de **carne de frango** em Serviço de Alimentação utilizando-se equipamentos convencionais

Tipo de Cocção	Tipo de carne	Equipamento utilizado	Quantidade preparada por operação	Quantidade total preparada	Tipo de operação	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
Bife	peito	chapa	30-40 bifes c/ 70 g	42 kg	grelhar (pré-aquecimento a 185 °C)	7	180
Grelhado	resfriado (bifes)	bifeteira a gás	cada / chapa; 5 kg/operação				
Frango	coxa e	fritadeira	15 pedaços de 180 g	54 kg	fritar (pré-aquecimento a 160°C)	20	150-160
Frito	sobrecoxa resfriada	elétrica	cada / cesto; 5,5 kg / operação				
Frango	coxa e	forno	25 pedaços de 180 g	54 kg	assar (pré-aquecimento a 190°C)	100	95
Assado	sobrecoxa resfriada	convencional	cada / tabuleiro; 9 kg / operação				
Frango	peito	panelão	24 kg / panelão; 35 /	48 kg	refogar	30	97-98
Cozido	resfriado (inteiro)	americano	operação				

As amostras foram coletadas (sem o suco das preparações, quando presente) aleatoriamente para análises, em dois momentos: imediatamente após a preparação e após 3 horas de exposição para distribuição.

Após a coleta, as amostras foram embaladas em sacos plásticos e papel alumínio, devidamente identificadas e armazenadas sob refrigeração até término do preparo das amostras programadas para o dia. Em seguida, foram congeladas pelo método de congelamento rápido utilizando-se imersão em nitrogênio líquido a -196°C e re-embaladas em papel alumínio. As amostras foram armazenadas em freezer a -18°C por aproximadamente três meses até análise.

Amostras cruas de cada um dos cortes utilizados para as preparações também foram coletadas, embaladas, congeladas e armazenadas como as demais para serem, posteriormente, submetidas às análises sendo, portanto, utilizadas como amostras-controle.

2.2.3. Determinação da Umidade e dos Sólidos Totais

O teor de umidade e a concentração de sólidos totais foram determinados utilizando a metodologia aprovada pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Utilizou-se em torno de 5 gramas para cada amostra. O processo de secagem foi realizado em esfufa com circulação de ar por 24 horas a $74-75^{\circ}\text{C}$.

2.2.4. Análise da Tiamina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As etapas de extração, preparo do padrão, análise e quantificação da tiamina nas diferentes amostras foram efetuadas de acordo com a metodologia definida no Capítulo 2.

Os resultados finais foram expressos em microgramas da tiamina por 100g da amostra ($\mu\text{g}/100\text{g}$) e, ainda, em porcentagens de retenção da vitamina em cada método de preparação das carnes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise Qualitativa da Tiamina

A FIGURA 4 mostra um perfil cromatográfico típico obtido da solução padrão de tiamina e de algumas amostras de carnes preparadas em Serviço de Alimentação. Verifica-se que o método de preparação das amostras, especialmente devido ao uso do isobutanol, promoveu uma purificação muito boa dos extratos, facilitando a análise cromatográfica.

FIGURA 4. Análise por CLAE da tiamina em carnes preparadas em Serviço de Alimentação. (a) padrão de tiamina, (b) coxão mole grelhado no forno combinado, (c) pernil suíno assado no forno combinado; (d) pernil suíno assado no forno convencional; (e) coxa e sobrecoxa de frango frita no forno combinado; (f) coxa e sobrecoxa de frango frita na fritadeira. Condições cromatográficas: fase móvel: 40% de metanol + 60% de cloreto de potássio 0,25%; coluna RP 18; detecção por fluorescência; vazão: 0,8ml/min.

3.2. Análise Quantitativa de Tiamina

A FIGURA 5 apresenta a curva padrão e a equação de correlação entre os teores de tiamina e a área dos picos correspondentes. Os teores da vitamina nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos foram calculados por meio da equação de regressão linear assim obtida.

$$Y = 2728,662 X - 2077,8$$

Y = área do pico

$$R^2 = 0,997453$$

X = peso de tiamina (ng)

FIGURA 5. Curva padrão de tiamina (traçada com valores médios das análises em triplicata).

Os teores de tiamina, expressos na base úmida e seca, obtidos das amostras de carnes bovina, suína e de frango cruas e após preparação estão apresentados nas TABELAS 8; 9 e 10, respectivamente.

Ao analisar o mesmo tipo de corte de carne, os teores de tiamina (expressos na base úmida) das amostras preparadas, são, algumas vezes, maiores que aqueles obtidos para as amostras cruas. Com exceção de amostras cozidas sob imersão em água, que podem ter o seu teor de umidade aumentado, a maioria dos métodos de preparo podem ocasionar um aumento do conteúdo de sólidos totais devido à perda de umidade em relação às amostras frescas, aumentando assim o conteúdo de vitamina por unidade de peso.

TABELA 8. Teores de tiamina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em **carne bovina** crua e após preparação em Serviço de Alimentação

Amostra	Crua		Preparada em Forno Combinado		Preparada em Equipamento Convencional	
	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
Coxão mole cru / grelhado	92,6 $\pm$ 4,9	352,5 $\pm$ 21,9	102,1 $\pm$ 18,5	249,7 $\pm$ 47,0	78,6 $\pm$ 5,1	209,8 $\pm$ 19,5
Coxão mole cru / frito	92,6 $\pm$ 4,9	352,5 $\pm$ 21,9	104,8 $\pm$ 10,7	233,0 $\pm$ 28,6	80,8 $\pm$ 3,5	186,0 $\pm$ 13,7
Peixinho cru / assado	98,9 $\pm$ 3,1	406,7 $\pm$ 11,2	93,6 $\pm$ 12,3	233,4 $\pm$ 28,0	76,4 $\pm$ 6,6	189,9 $\pm$ 15,1
Acém crua / refogada	91,6 $\pm$ 8,5	305,5 $\pm$ 22,7	101,1 $\pm$ 6,6	258,5 $\pm$ 15,0	72,3 $\pm$ 1,3	192,0 $\pm$ 1,0

*Médias de seis repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) $\pm$ DP (desvio padrão)

TABELA 9. Teores de tiamina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em **carne suína** crua e após preparação em Serviço de Alimentação

Amostra	Crua		Preparada em Forno Combinado		Preparada em Equipamento Convencional	
	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
Pernil, bife cru / grelhado	466,7 $\pm$ 6,6	1597,2 $\pm$ 34,2	442,0 $\pm$ 10,2	1060,3 $\pm$ 45,7	378,0 $\pm$ 30,1	938,5 $\pm$ 61,7
Pernil, bife cru / frito	466,7 $\pm$ 6,6	1597,2 $\pm$ 34,2	464,6 $\pm$ 34,5	977,2 $\pm$ 49,5	400,2 $\pm$ 15,9	881,0 $\pm$ 32,0
Pernil, pedaço cru / assado	549,8 $\pm$ 13,6	2022,2 $\pm$ 96,4	485,9 $\pm$ 33,9	1221,6 $\pm$ 72,1	416,8 $\pm$ 39,2	1004,4 $\pm$ 88,1
Pernil, isca crua / refogada	462,1 $\pm$ 19,1	1498,8 $\pm$ 25,8	454,6 $\pm$ 28,5	1195,3 $\pm$ 96,7	427,8 $\pm$ 6,2	909,7 $\pm$ 26,4

*Médias de seis repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) $\pm$ DP (desvio padrão)

TABELA 10. Teores de tiamina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em **carne de frango** crua e após preparação em Serviço de Alimentação

Amostra	Crua		Preparada em Forno Combinado		Preparada em Equipamento Convencional	
	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
Peito, bife cru / grelhado	70,7 $\pm$ 4,6	282,8 $\pm$ 18,9	75,6 $\pm$ 7,8	190,2 $\pm$ 19,9	73,6 $\pm$ 3,2	201,9 $\pm$ 3,6
Coxa e sobrecoxa crua/frita	71,2 $\pm$ 4,2	318,8 $\pm$ 14,2	73,2 $\pm$ 5,8	170,7 $\pm$ 9,6	73,8 $\pm$ 3,6	178,3 $\pm$ 2,2
Coxa e sobrecoxa crua/assada	71,2 $\pm$ 4,2	318,8 $\pm$ 14,2	71,4 $\pm$ 5,0	178,6 $\pm$ 14,1	78,1 $\pm$ 1,8	188,4 $\pm$ 2,2
Peito inteiro cru / cozido	71,9 $\pm$ 3,5	277,0 $\pm$ 8,1	66,7 $\pm$ 5,3	215,5 $\pm$ 11,8	73,0 $\pm$ 2,0	224,6 $\pm$ 4,7

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) $\pm$ DP (desvio padrão)

Algumas tabelas de composição química dos alimentos como FRANCO (1992) relatam o conteúdo de vitaminas e outros nutrientes utilizando apenas a base úmida ou fresca. Os dados apresentados mostram que muitos alimentos submetidos à cocção apresentam valores de vitaminas superiores àqueles encontrados nos alimentos crus correspondentes. Diversos estudos (ONO et alii, 1986; HUTCHISON et alii, 1987a; SHAMSUZZAMAN et alii, 1992; NASVADI et alii, 1993; RHEE, et alii, 1993) que se propuseram a avaliar o efeito do processamento sobre vitaminas apresentam os resultados expressos na base úmida, dificultando a avaliação da estabilidade. Uma investigação bastante interessante foi realizada por DAWSON et alii (1988), avaliando os teores de riboflavina, niacina e tiamina em carnes bovina, suína e de carneiro após métodos de processamento em grandes quantidades pelo calor. Apesar de fornecer dados de grande importância, a pesquisa não permite avaliar a estabilidade verdadeira de nenhuma das vitaminas por apresentar os resultados na base úmida e não dar nenhuma informação sobre o teor de umidade das amostras cruas e processadas. Quando os dados são assim relatados, num primeiro momento, têm-se a impressão de que determinados processamentos promoveram um aumento do teor de vitaminas.

Nossos resultados (TABELAS 8; 9 e 10) mostram que quando os teores da tiamina são expressos na base seca (100% de sólidos totais para todas as amostras) a diferença de umidade não reflete o seu efeito, permitindo que a análise da estabilidade seja avaliada corretamente.

Os diferentes cortes crus de carne bovina estudados apresentaram valores de tiamina (base seca) diferenciados (TABELA 9). Peixinho, um corte com quantidade bastante reduzida de tecido conjuntivo e gordura, apresentou o maior conteúdo de tiamina (406,7 $\mu\text{g}/100\text{g}$). O teor de tiamina em coxão mole, um corte de primeira, com pequena quantidade de tecido conjuntivo, mas com uma porcentagem de gordura superior à do peixinho, foi de 352,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$. O menor teor de tiamina (305,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$) foi encontrado em acém, um corte de segunda, com teores mais elevados de tecido conjuntivo e gordura em relação aos dois primeiros cortes. Verifica-se, assim, que quanto menor é a

quantidade de tecido conjuntivo e de gordura no músculo cru, maior é o seu teor em tiamina. Os valores de tiamina obtidos neste estudo para os cortes de carne bovina crua (base úmida) são próximos àqueles encontrados por ONO et alii (1986) e GREENFIELD et alii (1987). AWONORIN et alii (1996) relatou valores 25% inferiores aos nossos em acém crua.

A TABELA 9 mostra que pernil suíno (cortes crus) fatiado em bifes, em pedaço para assar e cortado em iscas apresentou diferentes teores de tiamina (1597,2 $\mu\text{g}/100\text{g}$; 2022,2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e 1498,8 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectivamente; expressão em base seca). Nossas análises mostraram que o fatiamento do pernil provocou perda de suco (umidade), o que pode ter levado à perda de tiamina no pernil fatiado em bifes e naquele cortado em iscas. Nossos valores de tiamina (base úmida) para pernil suíno cru são comparáveis aos encontrados por ANG & MOSELY (1980) e BARNA & DWORSCHÁK (1994), mas inferiores aos obtidos por HUTCHISON et alii e (1987b) e RHEE et alii (1993).

Em carne de frango crua (TABELA 10) os cortes estudados também apresentaram teores diferenciados de tiamina (base seca). Peito de frango apresentou menor teor de tiamina (277,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$) que a coxa e sobrecoxa de frango cruas (318,8 $\mu\text{g}/100\text{g}$). Esta tendência foi também relatada por AL-KHALIFA & DAWOOD (1993). BARBEAU & SCHNEPF (1989) relataram valores ligeiramente superiores e ANG & MOSELY (1980) e SHAMSUZZAMAN et alii (1992) encontraram teores superiores aos encontrados em nosso estudo.

É importante ressaltar que a diferença da metodologia de análise utilizada, da origem das carnes, da idade (ONO et alii, 1984) e da alimentação (ONO et alii, 1986; LEONHARDT et alii, 1996) dos animais utilizados nos diferentes estudos podem levar a diferenças significativas nos teores de vitaminas.

Os métodos de cocção utilizados causaram uma redução bastante expressiva nos níveis de tiamina (base seca) presentes nos cortes de carnes bovina, suína e de frango (TABELA 8; 9 e 10). Tal redução se deve,

principalmente, aos métodos de cocção, já que as perdas da vitamina durante o descongelamento dos cortes para preparação não foram significativas nos três tipos de carnes utilizados. Estes resultados mostram a instabilidade desta vitamina frente às condições de processamento das carnes (tempo, temperatura, tipo de fatiamento) normalmente utilizadas nos Serviço de Alimentação.

Visando uma análise mais precisa, para as carnes submetidas à cocção, apenas os valores de tiamina expressos na base seca encontrados neste estudo e naqueles relatados na literatura puderam ser comparados. Para carne de frango (coxa e sobrecoxa assada no forno convencional) nossos resultados são bastante próximos aos obtidos por BARBEAU & SCHNEPF (1989) que prepararam este corte de forma semelhante e analisaram tiamina utilizando a técnica da AOAC (1980).

Constatou-se uma dificuldade em comparar os dados de tiamina obtidos das carnes processadas e os da literatura existentes na área. Primeiramente porque são poucos os relatos deste tipo de pesquisa em alimentos preparados em grandes quantidades ou a nível de Serviços de Alimentação. Até então, preparações efetuadas no forno combinado não têm sido alvo de pesquisas voltadas para o seu conteúdo ou retenção de nutrientes. Na maioria das vezes, as condições de processamento relatadas pela literatura são bastante incompletas, além de expressarem os resultados das vitaminas estudadas na base úmida. Em carne bovina, os cortes disponíveis para preparação são diversos, não existindo, na maioria das vezes, coincidência dos mesmos investigadores analisando as mesmas vitaminas no mesmo corte.

3.3. Avaliação da Estabilidade da Tiamina

A análise estatística (análise de variância) revelou que não houve diferença significativa entre os teores de umidade obtidos nos dois tempos de coleta (logo após preparo e 3h após preparo) (resultados não mostrados). Este

resultado indica que, nas condições em que as amostras de carne suína e de frango preparadas foram armazenadas (apenas tampadas com plásticos transparentes e sem uso de equipamento para mantê-las aquecidas), simulando o tempo de espera para distribuição aos usuários do Serviço de Alimentação, os teores de umidade nos dois tempos de coleta foram consideradas iguais estatisticamente. Assim, o teste de médias foi aplicado para testar diferenças entre médias de perda de umidade das oito formas de preparação das carnes.

Da mesma forma, para os três tipos de carnes, a análise de variância não mostrou diferenças significativas entre as médias de retenção da tiamina nos dois tempos de coleta das amostras (resultados não mostrados). Portanto, o teste de médias foi aplicado para testar as diferenças entre as médias de retenção das oito formas de preparação em cada espécie animal.

A estabilidade da tiamina, assim como as porcentagens de perda de umidade nas amostras de carnes bovina, suína e de frango submetidas à preparação em Serviço de Alimentação podem ser vistas nas TABELAS 11, 12 e 13, respectivamente.

TABELA 11. Retenção de tiamina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em **carne bovina** preparada em Serviço de Alimentação

Método de Preparo	Retenção de Tiamina (%)*		Perda de Umidade (%)*	
	Forno Combinado ¹	Equipamento Convencional ¹	Forno Combinado ²	Equipamento Convencional ²
Grelhada	70,5 b ± 9,7	59,9 cde ± 8,0	19,8 c ± 2,4	15,3 d ± 2,9
Frita	66,0 bc ± 5,7	53,01 ef ± 5,8	25,5 a ± 2,6	23,5 ab ± 4,0
Assada	57,3 de ± 5,5	47,2 f ± 4,35	20,7 bc ± 1,4	20,9 bc ± 2,1
Refogada	84,7 a ± 2,9	63,2 bcd ± 5,3	13,0 de ± 2,8	11,0 e ± 2,2

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± SD (desvio padrão)

¹ Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

² Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

TABELA 12. Retenção de tiamina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em **carne suína** preparada em Serviço de Alimentação

Método de Preparo	Retenção de Tiamina (%) [*]		Perda de Umidade (%) [*]	
	Forno Combinado ¹	Equipamento Convencional ¹	Forno Combinado ²	Equipamento Convencional ²
Grelhada	66,4 b ± 4,2	58,8 cd ± 4,0	17,7 bc ± 2,6	15,6 c ± 2,9
Frita	61,2 c ± 3,9	55,2 d ± 2,6	25,9 a ± 3,4	22,9 a ± 3,5
Assada	60,5 cd ± 3,7	49,6 e ± 2,1	17,2 bc ± 1,5	19,6 b ± 2,6
Refogada	79,8 a ± 6,8	60,7 c ± 1,9	10,5 d ± 2,7	23,5 a ± 2,3

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± SD (desvio padrão)

¹ Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

² Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

TABELA 13. Retenção de tiamina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em **carne de frango** preparada em Serviço de Alimentação

Método de Preparo	Retenção de Tiamina (%) [*]		Perda de Umidade (%) [*]	
	Forno Combinado ¹	Equipamento Convencional ¹	Forno Combinado ²	Equipamento Convencional ²
Grelhada	65,2 bc ± 9,8	69,0 b ± 4,8	18,5 c ± 4,6	14,8 d ± 1,9
Frita	53,7 d ± 5,1	56,0 d ± 3,1	26,1 a ± 2,5	24,3 ab ± 2,5
Assada	56,2 d ± 6,8	59,2 cd ± 2,4	22,6 b ± 1,5	24,4 ab ± 0,9
Cozida	77,9 a ± 4,9	81,1 a ± 3,1	6,7 e ± 2,0	8,8 e ± 1,8

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± SD (desvio padrão)

¹ Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

² Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

De uma maneira geral, observou-se uma redução significativa dos teores de umidade nas amostras submetidas à preparação quando comparadas com as amostras cruas. As perdas de umidade foram, provavelmente, causadas pelo escoamento do suco das carnes antes e durante a cocção e pela evaporação durante a cocção.

Verifica-se que as perdas de umidade variaram entre 11,0 e 25,5% para carne bovina; entre 10,5 e 25,9% para carne suína e entre 6,7 e 26,1% para carne de frango. Embora a proporção de perdas para os três tipos de carnes seja, de um modo geral, bem semelhante, as porcentagens de perdas entre os métodos de preparo utilizados mostraram-se bastante diferenciadas. Considerando que a solubilidade em água é uma das causas das perdas das vitaminas hidrossolúveis em alimentos (SELMAN, 1994), a análise da umidade nas carnes após preparação pode ser de grande importância para auxiliar a avaliação de níveis reais de retenção destas vitaminas.

Além do exposto, a redução da umidade leva a um aumento no teor de sólidos totais por unidade de peso. Assim, quando se deseja avaliar a estabilidade das vitaminas, a expressão dos teores na base úmida poderia levar a resultados errôneos. Por outro lado, a expressão destes resultados utilizando-se a base seca (sólidos totais) possibilita uma análise mais correta dos dados obtidos. Poucos estudos fizeram uma avaliação do teor de umidade para determinação da estabilidade de vitaminas durante o processamento (AWONORIN & ROTIMI, 1991; RAMOS, 1991; PINHEIRO-SANT'ANA, 1995).

As médias de retenção da tiamina obtidas para a carne bovina (TABELA 11) variaram bastante (47,2 a 84,7%), visto que as condições de preparo e forma de fatiamento das amostras foram distintas (TABELAS 2 e 5). Ao comparar as médias de retenção da tiamina em carne bovina preparada de oito formas diferentes, observa-se que a carne refogada no forno combinado se destacou das demais (84,7% de retenção da tiamina e 13,0% de perda de umidade). Desde que a tiamina é hidrossolúvel sua perda está estreitamente relacionada à perda de umidade (LACHANCE & ERDMAN, 1977). As carnes assada e a frita no equipamento convencional apresentaram os menores

valores retenção de tiamina (47,2% e 53,0%, respectivamente). Aqui também se observou uma relação direta com a perda de umidade, visto que as condições de preparação causaram uma das maiores perdas de umidade (20,9% e 23,5%). Para se obter uma maciez adequada, a carne bovina (peixinho) assada no forno combinado precisou permanecer sob cocção durante 90 minutos (TABELA 5), fato que pode ter contribuído para uma retenção de apenas 57,3% de tiamina em relação ao seu conteúdo inicial. As perdas de tiamina ocorridas nas carnes grelhada e refogada nos equipamentos convencionais (59,9% e 63,2% de retenção, respectivamente) parecem ter sido ocasionadas, principalmente, pela forma de fatiamento dos cortes (bifes e iscas) e pela ação do tempo e temperatura de cocção (TABELA 5), uma vez que as perdas de umidade nestas amostras foram mais reduzidas.

Observa-se que, para carne bovina, o uso do forno combinado preservou significativamente mais a tiamina em todas preparações, quando comparado com os equipamentos convencionais.

A influência das condições de preparo (tipo de fatiamento, temperatura) sobre a retenção da tiamina em carne bovina foi claramente percebida em um estudo efetuado por YANG et alii (1994). Eles utilizaram o fatiamento em tiras e o método grelhar e refogar de maneira convencional, em pequenas quantidades, usando temperaturas superiores, mas tempos mais reduzidos aos utilizados em nosso estudo (TABELA 5), obtendo 50% de retenção de tiamina na carne grelhada e 64% na carne refogada. Os valores por nós encontrados foram 60,0% de retenção na carne grelhada e 63,2% na carne refogada, ambas preparadas de maneira convencional.

Verifica-se que para carne suína (TABELA 12) a porcentagem de retenção da tiamina variou de 49,6 a 79,8%. Novamente, a carne refogada no forno combinado se destacou como aquela que reteve melhor a tiamina (79,8%) e a umidade (10,5% de perda). A melhor relação tempo-temperatura utilizados (TABELA 3) para esta preparação apresentou influência marcante sobre estes resultados, evidenciando como este binômio é importante na estabilidade da vitamina.

Analogamente à carne bovina, a carne suína assada no equipamento convencional apresentou o menor nível de retenção da tiamina (49,6%) e redução elevada do teor de umidade (19,6%). O maior tempo de cocção utilizado para esta preparação (TABELA 6) parece ter sido responsável por estes resultados. As perdas maiores de umidade ocorridas nas amostras de carnes fritas no forno combinado e no equipamento convencional, e nas refogadas no equipamento convencional (25,9; 22,9 e 23,5% respectivamente) foram refletidas diretamente na retenção de tiamina (61,2; 55,2 e 60,7% respectivamente), deixando bastante clara a inter-relação entre estes dois fatores. AWONORIN e ROTIMI (1991) também encontraram grande concordância entre a redução de umidade e a perda de tiamina, riboflavina e niacina em carnes bovina e suína assadas em grandes quantidades. Acredita-se, também, que a baixa capacidade do forno convencional em repor a temperatura após a introdução do pernil para assar tenha dificultado o fechamento dos poros da carne e, assim, propiciado a maior perda de umidade e da tiamina por lixiviação. Apesar das perdas importantes ocorridas nas oito formas de preparação, o forno combinado permitiu a melhor porcentagem de retenção da tiamina em todas as preparações, sugerindo a preferência deste equipamento em relação aos métodos de preparação convencionais.

Pesquisas sobre a estabilidade das vitaminas em carne suína são mais frequentemente relatadas utilizando o método de preparação assar em pequenas quantidades. UHEROVÁ et alii (1993) encontraram 67% de retenção de tiamina em carne suína assada em forno convencional. Ao preparar carne suína em pequenas quantidades, utilizando equipamentos convencionais, BATENHORST et alii (1995) obtiveram retenção da tiamina semelhante à encontrada por nós em carne assada (52%) e retenção bem mais reduzida em carne refogada (43%) do que a encontrada em nosso estudo. AWONORIN et alii (1996) relataram uma porcentagem de retenção superior àquela encontrada em nosso estudo em carne suína assada em pequenas quantidades (59%). AWONORIN & ROTIMI (1991), trabalhando com carne suína assada em grandes quantidades, de maneira convencional, encontraram

46,5% de retenção de tiamina, porcentagem ligeiramente inferior à obtida em carne suína assada em equipamento convencional no presente estudo (49,6%).

Ao analisar as oito formas de preparação de carne de frango (TABELA 13), verifica-se que a carne cozida no forno combinado e no equipamento convencional apresentaram os maiores teores de retenção da vitamina (77,9% e 81,1%, respectivamente), sendo consideradas iguais estatisticamente. Este resultado está claramente ligado às menores porcentagens de perda de umidade ocorridos nestas preparações (6,7% e 8,8%, respectivamente). As melhores condições de preparo, especialmente a melhor relação tempo-temperatura, parece ter sido conseguida para a estabilidade da tiamina nestas preparações (TABELAS 4 e 7). Em contrapartida, as carnes fritas e assadas nos dois tipos de equipamentos retiveram as menores porcentagens de tiamina e foram consideradas iguais pela análise estatística. As condições de preparo, especialmente o tempo e a temperatura necessários para a cocção adequada destas preparações (TABELAS 4 e 7) tiveram grande influência nas maiores perdas de umidade apresentadas por estas amostras (consideradas iguais estatisticamente). Observa-se, ainda, que as carnes de frango grelhadas utilizando os dois equipamentos tiveram médias de retenção da tiamina e médias de perdas de umidade intermediárias. Apesar da forma de fatiamento em bifes propiciar a exposição de uma grande área superficial, a utilização do pré-aquecimento (TABELAS 4 e 7) ocasiona um choque térmico, fechando os poros da carne e reduzindo a perda de suco durante a cocção. O tempo reduzido necessário para o processo de grelhagem também impediu que as perdas fossem maiores. Os resultados obtidos mostram que, levando em consideração as condições de preparo das carnes utilizadas neste estudo, a retenção da tiamina em carne de frango não foi diferente estatisticamente quando se utilizou o forno combinado ou os equipamentos convencionais.

A retenção de tiamina obtida para frango assado de maneira convencional (59,2%) foi superior àquela encontrada por UHEROVÁ et alii

(1993) (48%), mas inferior à relatada por BARBEAU & SCHNEPF (1989) (83%) que utilizaram este método de preparo, mas em pequenas quantidades.

Como relatado por RYLEY & KAJDA (1994) na maioria dos estudos envolvendo processos de cocção dos alimentos, as condições não são adequadamente controladas, sendo difícil fazer comparações dos resultados. Percebe-se que esta dificuldade aumenta em função das mais variadas condições de preparo utilizadas e dos poucos relatos deste tipo de estudo envolvendo preparações a nível de Serviços de Alimentação.

Uma síntese dos teores de retenção da tiamina nos três tipos de carnes preparadas em forno combinado e em equipamento convencional pode ser vista na FIGURA 6.

FIGURA 6. Estabilidade da tiamina em carnes bovina, suína e de frango preparadas em Serviço de Alimentação (FC: forno combinado; EC: equipamento convencional).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- Os métodos de preparo em Serviço de Alimentação causaram uma redução significativa do teor de umidade nos cortes de carnes bovina (11,0 a 25,5%), suína (10,5 a 25,9%) e de frango (6,7 e 26,1%) utilizados. Esta redução foi associada, principalmente, ao escoamento de suco das carnes antes e durante a cocção, e à ação da temperatura e tempo de cocção.
- Os teores de tiamina contidos nos três tipos de carne foram considerados iguais estatisticamente nas amostras provenientes dos dois tempos de coleta utilizados (logo após preparação e após armazenadas por 3h). A não utilização de equipamento para manter as preparações aquecidas (balcão térmico, por exemplo) durante o tempo de espera para distribuição aos usuários parece ter sido responsável por esta estabilidade da vitamina após o processamento das carnes.
- A tiamina presente nas carnes bovina, suína e de frango mostrou-se bastante sensível aos métodos de preparo a nível de Serviço de Alimentação utilizados.
- A estabilidade da tiamina variou nos três tipos de carnes estudados: 47,2 a 84,7% de retenção em carne bovina; 49,6 a 79,8% de retenção em carne suína e 53,7 a 81,1% de retenção em carne de frango.
- Para carne bovina e suína, o uso do forno combinado preservou mais a tiamina em todas preparações, quando comparado com os equipamentos convencionais. Estes resultados sugerem a preferência do forno combinado quando se deseja uma qualidade superior destas preparações.
- Não houve diferença significativa na estabilidade da tiamina em carne de frango preparada de diferentes formas quando se utilizou o forno combinado ou os equipamentos convencionais.
- Nos três tipos de carnes preparados de formas semelhantes a perda de tiamina foi claramente associada às perdas de umidade. Além disso, as condições de preparo dos cortes das carnes, especialmente a combinação

tempo-temperatura, também apresentaram grande significância nas perdas desta vitamina, já que estão diretamente relacionadas com a perda de umidade quando as carnes são submetidas à cocção.

- O método de preparação refogar ou cozer sem imersão em água no forno combinado se destacou em termos de retenção da tiamina nos três tipos de carnes estudados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AL-KHALIFA, A .S., DAWOOD, A. A . Effects of cooking methods on thiamin and riboflavin contents of chicken meat. **Food Chem.**, Barking, v.48, p.69-74, 1993.

ANG, C. Y. W. , MOSELEY, F. A. Determination of thiamin and riboflavin in meat and meat products by high-performance liquid chromatography, **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 28, n. 3, p. 486-489, 1980.

AWONORIN, S. O. , ROTIMI, D. K. Effects of oven temperature and time on the losses of some B vitamins in roasted beef and pork. **J. Foodservice Syst.**, Trumbull, v. 6, p. 89-105, 1991.

AWONORIN, S. O., BAMIRO, F. O., AYOADE, J. A. The effect of freezing rate, storage and cooking on some B-vitamins in beef and pork roasts. **J. Foodservice Syst.**, Trumbull, v. 9, p. 7-23, 1996.

BARBEAU, W. E. , SCHNEPF, M. Sensory attributes and thiamine content of roasting chickens cooked in a microwave, convection microwave end conventional electric oven. **J. Food Qual.**, Westport, v. 12, p. 203-213, 1989.

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1996.

- BARNA, E., DWORSCHÁK, E. Determination of thiamine (vitamin B₁) and riboflavin (vitamin B₂) in meat and liver by HPLC. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 668, p. 359-363, 1994.
- BATENHORST, J. H., SUN, J., GIRAUD, D. W., YOUNG, L. J., HAMOUZ, F. L., DRISKELL, J. A. Retention of selected nutrients in pork roasts prepared by variations in cookery methods. **J. Muscle Foods**, Trumbull, v. 6, p. 359-368, 1995.
- BRIGGS, G. M. Muscle foods and human health. **Food Technol.**, Chicago, v.39, n.2, p. 54, 56-57, 1985.
- COMBINAÇÃO é novidade na cozinha. **Coz. Ind.**, São Paulo, v.14, p. 26-29, 1991.
- COOKSEY K., KLEIN, B. P., McKEITH, F. K. Thiamin retention and other characteristics of cooked beef loin roasts. **J. Food Sci.**, Chicago, v.55, n.3, p. 863-864, 1990.
- DAWSON, K. R., UNKLESBAY, N.F. , HEDRICK, H. B. HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate heat-processing methods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.36, p. 1176-1179, 1988.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 307p.
- GODDARD, M. S., MATTHEWS, R. H. Current knowledge of nutritive values of vegetables. **Food Technol.**, Chicago, v.33, n.2, p.71-73, 1979.
- GREENFIELD, H. , KUO, Y. L., HUTCHISON, G. I., WILLS, R. B. H. Composition of australian foods. 34. Beef and veal. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.208-215, 227-228, 1987.
- HUTCHISON, G. I., GREENFIELD, H., WILLS, R. B. H. Composition of australian foods. 35. Pork. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.216-222, 1987b.
- HUTCHISON, G. I., THOMAS, D. E., TRUSWELL, A. S. Nutrient composition of australian beef. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.199-201, 1987a.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3.ed. São Paulo, 1985. v.1.
- LACHANCE, P. A., ERDMAN, J. W. Effects of home food preparation practices on nutrients content of foods. In: HARRIS, R. S., KARMAS, E., eds. **Nutritional evaluation of food processing**. 2 ed. Westport: AVI, 1977. p.529-567.

- LEONHARDT, M., GEBERT, S., WENK, C. Stability of α -tocopherol, thiamin, riboflavin and retinol in pork muscle and liver during heating as affected by dietary supplementation. **J. Food Sci.**, Chicago, v.61, n.5, p. 1048-1051, 1996.
- NASVADI, G. E., LAW, C., MACKEY, J. D., LOGUE, K. P. Nutrient composition and sensory characteristics of canadian grain-fed veal cutlets. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v.73, p.183-189, 1993.
- ONO, K., BERRY, B. W., DOUGLASS, L. W. Nutrient composition of some fresh and cooked retail cuts of veal. **J. Food Sci.**, Chicago, v.51, n.5, p.1352-1357, 1986.
- ONO, K.; BERRY, B. W.; JOHNSON, H. K.; RUSSEK, E.; PARKER, C. F.; CAHILL, V. R.; ALTHOUSE, P. G. Nutrient composition of lamb of two age groups. **J. of Food Sci.**, **49**: 1234-1239, 1984.
- PAULUS, K. Vitamin degradation during food processing and how to prevent it. In: SOMOGYI, J. C., MÜLLER, H. R., eds. **Nutritional impact of food processing**. Basel. Karger, 1989. p. 173-187.
- PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. **Efeito do método de preparo sobre a estabilidade de carotenóides em cenoura (*Daucus carota* L.)**. Viçosa, 1995. 115p. [Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa].
- RAMOS, D. M. R. **Avaliação das perdas de carotenóides e valor de vitamina A durante a desidratação e a liofilização industrial de cenoura e espinafre**. Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 1991. 106 p. [Tese de Mestrado].
- REVOLUÇÃO na boca do forno. **Coz. Ind.**, São Paulo, v.48, p.24-28, 1996.
- RHEE, K. S., GRIFFITH-BRADLE, H. A., ZIPRIN, Y. A. Nutrient composition and retention in browned ground beef, lamb and pork. **J. Food Compos. Anal.**, Barking, v.6, p.268-277, 1993.
- RYLEY, J. R., KAJDA, P. Vitamins in thermal processing. **Food. Chem.**, Barking, v.49, p.119-129, 1994.
- SELMAN, J. D. Vitamin retention during blanching of vegetables. **Food. Chem.**, Barking, v.49, p.137-147, 1994.
- SHAMSUZZAAMAN, K., CHUAQUI-OFFERMANN, N., LUCHT, L., MCDUGALL, T., BORSA, J. Microbiological and others characteristics of chicken breast meat following electron-beam and sous-vide treatments. **J. Food Prot.**, Ames, v.55, n.7, p. 528-533, 1992.

UHEROVÁ, R., HOZOVÁ, B. , SMIRNOV, V. The effect of microwave heating on retention of some B vitamins. **Food Chem.**, Barking, v.46, p.293-295, 1993.

YANG J., SULAEMAN, A., SETIAWAN, B., ATUGHONU, A., GIRAUD, D. W., DRISKELL, J. A .Sensory qualites and nutrient retention of beef strips prepared by different household cooking techniques. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.94, n.2, p.199-201, 1994.

Capítulo 4

RETENÇÃO DA RIBOFLAVINA EM CARNES PREPARADAS EM SERVIÇO DE ALIMENTAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais fatores responsáveis pelo desempenho de uma organização é a qualidade de seus produtos e serviços. Desta forma, os restaurantes coletivos têm investido em programas de treinamento para capacitar melhor as equipes de trabalho (COSTA, 1997). No Brasil, as empresas líderes no setor de refeições coletivas têm investido cada vez mais em programas de qualidade e produtividade, buscando a maior satisfação de seus clientes (QUALIDADE... 1997). Neste contexto, as variáveis que influenciam a estabilidade dos nutrientes durante os passos de pré-preparo e preparo dos alimentos têm grande importância na qualidade das refeições servidas aos usuários e, ainda, carecem das principais informações. O estudo destas variáveis pode permitir a reestruturação dos métodos de cocção e, assim, garantir um conteúdo mais alto dos nutrientes nos alimentos.

Bastante utilizado na Europa e Estados Unidos, o forno combinado é um dos equipamentos de cocção mais modernos, estando presente em alguns Serviços de Alimentação no Brasil (COMBINAÇÃO... 1991). Apesar da sua versatilidade em relação à possibilidade de preparações, retenção do sabor, umidade e suculência dos produtos, informações sobre a qualidade nutricional dos alimentos preparados nestes equipamentos ainda não são conhecidas.

Perdas de vitaminas, principalmente as hidrossolúveis, em carnes submetidas à cocção, podem ocorrer em maior ou menor porcentagem, dependendo da temperatura, do tempo e do método de processamento utilizado (AWONORIN & ROTIMI, 1991). A análise da tiamina e da riboflavina é usada para julgar a qualidade da carne processada termicamente, pois ambas são sensíveis ao calor (GESTER, 1989), sendo a riboflavina sensível também à luz (BEKBÖLET, 1990). E, como uma vitamina hidrossolúvel, a riboflavina pode também ser perdida por lixiviação (PAULUS, 1989). Por outro lado, o processamento térmico pode ser controlado para maximizar a retenção de vitaminas, sem prejuízo da segurança microbiológica e qualidades sensoriais (RYLEY & KAJDA, 1994).

Este estudo objetivou estudar a influência de diferentes métodos de preparo em Serviço de Alimentação sobre o conteúdo de riboflavina (vitamina B₂) em carnes bovina, suína e de frango. A estabilidade da vitamina foi avaliada após preparação das carnes em forno combinado e em equipamentos convencionais. As carnes citadas são as mais consumidas pelos brasileiros, além de serem consideradas boas fontes de riboflavina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. Matéria Prima

Conforme descrição no Capítulo 3.

2.1.2. Reagentes e Outros Materiais

Os reagentes e materiais descritos no capítulo 2 foram utilizados nesta etapa.

2.1.3. Equipamentos

Utilizou-se os mesmos equipamentos descritos no Capítulo 2.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Delineamento Experimental

Utilizou-se o delineamento descrito no Capítulo 3. As análises estatísticas foram conduzidas com o auxílio do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas), versão 7.0, 1997 da Universidade Federal de Viçosa.

2.2.2 Preparo das Amostras

As carnes bovina, suína e de frango foram submetidas a diferentes métodos de cocção em Serviço de Alimentação, conforme descrição no Capítulo 3.

2.2.3. Determinação da Umidade e dos Sólidos Totais

De acordo com Capítulo 3.

2.2.4. Análise da Riboflavina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As etapas de extração da riboflavina, preparo do padrão, análise e quantificação da vitamina nas amostras de carnes foram efetuadas de acordo com a metodologia definida no Capítulo 2.

Todas as operações de extração da vitamina foram efetuadas ao abrigo da luz, utilizando-se vidraria de cor âmbar ou papel alumínio.

Os resultados finais foram expressos em microgramas da riboflavina por 100g da amostra ($\mu\text{g}/100\text{g}$) e, ainda, em porcentagens de retenção da vitamina em cada método de preparação das carnes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise Qualitativa da Riboflavina

A FIGURA 1 mostra cromatogramas típicos obtidos da solução padrão de riboflavina e de amostras de carnes bovina preparadas em Serviço de Alimentação. A FIGURA 2 apresenta o perfil cromatográfico obtido de amostras de carnes suína e de frango preparadas em Serviço de Alimentação.

Observa-se que o pico da riboflavina foi completamente resolvido nas amostras de carnes oriundas da preparação em forno combinado e em equipamentos convencionais, assegurando uma quantificação adequada da vitamina.

FIGURA 1. Análise por CLAE da riboflavina em carne bovina preparada em Serviço de Alimentação. (a) solução padrão de riboflavina; (b) carne grelhada em forno combinado; (c) carne grelhada em equipamento convencional; (d) carne frita em forno combinado. Condições cromatográficas: fase móvel: 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico); coluna RP18; detecção por fluorescência; vazão: 1 ml/min.

FIGURA 2. Análise de riboflavina por CLAE em carnes preparadas em Serviço de Alimentação. (a) carne suína refogada em forno combinado; (b) carne de frango assada em forno combinado; (c) carne de frango assada em equipamento convencional. Condições cromatográficas: fase móvel: 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico); coluna RP18; detecção por fluorescência; vazão: 1 ml/min.

3.2. Análise Quantitativa da Riboflavina

A curva padrão e a equação de correlação obtida entre os teores de riboflavina e a área dos picos correspondentes encontram-se na FIGURA 3. A partir desta equação, calculou-se os teores da vitamina nas amostras de carnes estudadas.

$$Y = 265,5352 X + 109,913 \quad R^2 = 0,999354$$

Y = área do pico X = peso de riboflavina (ng)

FIGURA 3. Curva padrão de riboflavina (traçada com valores médios das análises em triplicata).

Os teores de riboflavina, expressos na base úmida e seca, obtidos das amostras de carnes bovina, suína e de frango cruas e após preparação são apresentados nas TABELAS 1; 2 e 3, respectivamente.

TABELA 1. Teores de riboflavina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em **carne bovina** crua e após preparação em Serviço de Alimentação

Amostra	Crua		Preparada em Forno Combinado		Preparada em Equipamento Convencional	
	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
Coxão mole cru / grelhado	224,7 $\pm$ 2,0	855,0 $\pm$ 14,8	312,5 $\pm$ 9,5	764,2 $\pm$ 29,1	230,3 $\pm$ 4,4	615,3 $\pm$ 38,3
Coxão mole cru / frito	224,7 $\pm$ 2,0	855,0 $\pm$ 14,8	267,2 $\pm$ 11,3	592,2 $\pm$ 1,9	296,3 $\pm$ 22,5	679,8 $\pm$ 15,5
Peixinho cru / assado	186,3 $\pm$ 9,6	765,2 $\pm$ 27,2	277,9 $\pm$ 15,7	692,6 $\pm$ 27,5	276,8 $\pm$ 10,6	688,3 $\pm$ 27,2
Acém crua / refogada	213,9 $\pm$ 5,3	714,5 $\pm$ 23,8	255,6 $\pm$ 20,8	653,6 $\pm$ 44,5	245,1 $\pm$ 17,2	650,6 $\pm$ 41,4

TABELA 2. Teores de riboflavina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em **carne suína** crua e após preparação em Serviço de Alimentação

Amostra	Crua		Preparada em Forno Combinado		Preparada em Equipamento Convencional	
	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
Pernil, bife cru / grelhado	302,8 $\pm$ 9,8	1036,1 $\pm$ 31,2	356,0 $\pm$ 40,7	850,7 $\pm$ 66,8	303,1 $\pm$ 24,8	752,6 $\pm$ 52,2
Pernil, bife cru / frito	302,8 $\pm$ 9,8	1036,1 $\pm$ 31,2	453,4 $\pm$ 22,4	953,7 $\pm$ 14,1	334,8 $\pm$ 36,8	735,2 $\pm$ 51,9
Pernil, pedaço cru / assado	307,3 $\pm$ 15,7	1129,1 $\pm$ 41,1	416,5 $\pm$ 29,0	1047,1 $\pm$ 61,0	329,3 $\pm$ 13,0	794,9 $\pm$ 55,1
Pernil, isca crua / refogada	323,1 $\pm$ 13,7	1048,0 $\pm$ 25,5	353,1 $\pm$ 38,0	928,7 $\pm$ 111,0	409,5 $\pm$ 11,3	870,6 $\pm$ 25,1

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) $\pm$ DP (desvio padrão)

TABELA 3. Teores de riboflavina ($\mu\text{g}/100\text{g}$; média* $\pm$ DP) em **carne de frango** crua e após preparação em Serviço de Alimentação

Amostra	Crua		Preparada em Forno		Preparada em Equipamento	
			Combinado		Convencional	
	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
Peito, bife cru / grelhado	142,5 $\pm$ 3,9	570,1 $\pm$ 19,5	209,3 $\pm$ 23,5	525,3 $\pm$ 51,2	136,2 $\pm$ 14,3	374,0 $\pm$ 43,7
Coxa e sobrecoxa crua/frita	214,8 $\pm$ 11,8	961,6 $\pm$ 7,7	254,8 $\pm$ 34,8	629,4 $\pm$ 43,8	240,0 $\pm$ 32,1	577,7 $\pm$ 46,2
Coxa e sobrecoxa crua/assada	214,8 $\pm$ 11,8	961,6 $\pm$ 7,7	316,6 $\pm$ 32,4	791,0 $\pm$ 75,8	318,7 $\pm$ 22,9	769,0 $\pm$ 61,6
Peito, inteiro cru / cozido	142,4 $\pm$ 2,0	548,6 $\pm$ 5,3	151,9 $\pm$ 17,6	489,3 $\pm$ 32,0	120,0 $\pm$ 18,2	368,1 $\pm$ 44,6

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) $\pm$ DP (desvio padrão)

Observa-se que, para o mesmo tipo de corte de carne, os teores de riboflavina expressos na base úmida e encontrados nas amostras cruas são, em geral, menores do que aqueles obtidos nas amostras submetidas à preparação. Sabe-se que a maioria dos métodos de cocção podem levar a perdas de suco ou umidade nas carnes e, assim, ocasionar um aumento do conteúdo de sólidos totais, aumentando o conteúdo de vitamina por unidade de peso. Isso explica por que diversos estudos (ONO et alii, 1986; HUTCHISON et alii, 1987a; HUTCHISON et alii, 1987b; DAWSON et alii (1988); SHAMSUZZAMAN et alii, 1992; NASVADI et alii, 1993), que expressaram os resultados obtidos na base úmida, têm relatado valores de vitaminas mais elevados em carnes processadas do que naquelas cruas correspondentes. Uma análise superficial destes dados poderia levar à conclusão errônea de que certos processamentos promoveram um aumento do teor de vitaminas. Por outro lado, as TABELAS 1; 2 e 3 mostram que a utilização da base seca (100% de sólidos totais para os cortes de carne crus e processados) elimina a diferença do teor de umidade existente entre as amostras, permitindo uma avaliação correta dos valores e da estabilidade da vitamina.

Dentro de uma mesma espécie animal os teores de riboflavina variaram bastante nos cortes crus analisados (especialmente os valores expressos na base seca). A quantidade de riboflavina foi distinta nos cortes crus de carne bovina estudados (TABELA 1). O coxão mole, um corte de primeira, indicado para preparações grelhadas por conter pouca quantidade de tecido conjuntivo, apresentou um conteúdo de riboflavina superior aos demais cortes (855,0 µg/100g). Já o peixinho, um corte de segunda, apresentou um teor intermediário (765,2 µg/100g), sendo que o menor teor de riboflavina (714,5 µg/100g) foi encontrado em acém, um corte de segunda e com teores mais elevados de tecido conjuntivo e gordura em relação aos dois primeiros cortes. Os valores de riboflavina obtidos neste estudo para os cortes de carne bovina crua (base úmida) são próximos àqueles encontrados por RISS et alii (1983); GREENFIELD et alii (1987) e NASVADI et alii (1993). Nossos resultados são 33% superiores aos relatados por HUTCHISON (1987a); e 8% inferiores aos

reportados por AWONORIN et alii (1996). ONO et alii (1986) relataram valores de riboflavina próximos aos nossos em coxão mole cru e 29% superiores em acém crua.

Os cortes crus de pernil (TABELA 2) (fatiado em bifos, em pedaço e cortado em iscas) mostraram diferentes teores de riboflavina (1036,1 µg/100g; 1129,1 µg/100g e 1048,9 µg/100g, respectivamente; expressão em base seca). A perda de umidade (suco) devida ao fatiamento em bifos e em iscas pode ter sido a causa da redução dos teores da riboflavina nestes cortes. Nossos valores de riboflavina (base úmida) para pernil cru são 22% superiores aos obtidos por HUTCHISON et alii (1987b). O teor de riboflavina relatado por OLLILAINEN et alii (1990) foi 20% superior ao obtido nesta pesquisa para pernil cru (base úmida).

Observa-se pela TABELA 3 que o conteúdo de riboflavina (base seca) em coxa e sobrecoxa de frango crua foi bem mais elevado (961,6 µg/100g) que em bifos de peito e em peito inteiro (570 µg/100g e 548,6 µg/100g, respectivamente). AL-KHALIFA & DAWOOD (1993) encontraram teores bastante próximos aos nossos (base úmida) em peito cru e coxa e sobrecoxa cruas. ANG & MOSELY (1980) relataram valores iguais aos nossos em coxa e sobrecoxa cruas de frango (base úmida).

Como mostrado pelas TABELAS 1; 2; e 3, os métodos de preparação em Serviço de Alimentação reduziram os teores de riboflavina (base seca) presentes originalmente nos cortes de carnes bovina, suína e de frango. Esta redução se deve, principalmente, aos métodos de cocção utilizados, uma vez que não houve diferença significativa entre os valores de riboflavina nos três tipos de carne antes e após descongelamento dos cortes para cocção.

Houve dificuldade de se comparar os teores de riboflavina obtidos nas amostras de carne após preparação com estudos semelhantes encontrados na literatura, uma vez que carnes preparadas em forno combinado não têm sido alvo de pesquisas desta natureza. Além disso, dificilmente se encontra estudos que expressem os teores da vitamina na base seca. Alguns estudos envolvendo métodos de preparo de maneira convencional puderam ser

comparados, calculando-se os valores na base seca, a partir da porcentagem de umidade relatada pelos pesquisadores.

GREENFIELD et alii (1987) relataram teores de riboflavina 19% e 12% superiores aos encontrados neste estudo para carne bovina grelhada e assada de maneira convencional, porém em pequenas quantidades. NASVADI et alii (1993), trabalhando com cocção de carnes bovina em pequenas quantidades, encontraram valores 13% e 21% maiores que os obtidos por nós para carne refogada e frita de maneira convencional. Os teores de riboflavina encontrados em nosso estudo para carne suína grelhada de maneira convencional foram 10% inferiores àqueles obtidos por HUTCHISON et alii (1987b) que também prepararam esta carne em pequenas quantidades.

3.3. Avaliação da Estabilidade da Riboflavina

A análise da estabilidade da riboflavina foi feita com base nas oito formas de preparação em cada espécie animal, já que não houve diferença significativa entre as médias de retenção da vitamina nos dois tempos de coleta das amostras (logo após preparo e 3h após preparo - resultados não mostrados).

A estabilidade da riboflavina, bem como a porcentagem de perda de umidade em amostras de carne bovina, suína e de frango submetidas à preparação em Serviço de Alimentação podem ser vistas nas TABELAS 4; 5 e 6, respectivamente.

TABELA 4. Retenção de riboflavina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em **carne bovina** preparada em Serviço de Alimentação

Método de Preparo	Retenção de Riboflavina (%)*		Perda de Umidade (%)*	
	Forno Combinado ¹	Equipamento Convencional ¹	Forno Combinado ²	Equipamento Convencional ²
Grelhada	89,4 a ± 4,1	72,0 c ± 5,8	19,8 c ± 2,4	15,3 d ± 2,9
Frita	69,3 c ± 1,1	79,5 b ± 1,0	25,6 a ± 2,6	23,5 ab ± 4,0
Assada	90,5 a ± 0,7	90,1 a ± 1,3	20,7 bc ± 1,4	20,9 bc ± 2,1
Refogada	91,4 a ± 4,1	91,0 a ± 3,6	13,0 de ± 2,8	11,0 e ± 2,2

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± SD (desvio padrão)

¹ Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

² Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

TABELA 5. Retenção de riboflavina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em **carne suína** preparada em Serviço de Alimentação

Método de Preparo	Retenção de Riboflavina (%)*		Perda de Umidade (%)*	
	Forno Combinado ¹	Equipamento Convencional ¹	Forno Combinado ²	Equipamento Convencional ²
Grelhada	82,2 c ± 7,7	72,6 d ± 4,1	17,7 bc ± 2,6	15,6 c ± 2,9
Frita	92,1 a ± 2,7	70,9 d ± 3,0	25,9 a ± 3,4	22,9 a ± 3,5
Assada	92,7 a ± 2,7	71,8 d ± 3,7	17,2 bc ± 1,5	19,6 b ± 2,6
Refogada	88,6 ab ± 10,1	83,1 bc ± 1,0	10,5 d ± 2,7	23,5 a ± 2,3

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± SD (desvio padrão)

¹ Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

² Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

TABELA 6. Retenção de riboflavina e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em **carne de frango** preparada em Serviço de Alimentação

Método de Preparo	Retenção de Riboflavina (%)*		Perda de Umidade (%)*	
	Forno Combinado ¹	Equipamento Convencional ¹	Forno Combinado ²	Equipamento Convencional ²
Grelhada	92,3 a ± 7,3	66,0 c ± 9,9	18,5 c ± 4,6	14,8 d ± 1,9
Frita	65,4 c ± 4,1	60,1 c ± 4,4	26,1 a ± 2,5	24,3 ab ± 2,5
Assada	82,2 b ± 7,4	80,0 b ± 6,9	22,6 b ± 1,5	24,4 ab ± 0,9
Cozida	89,2 ab ± 6,3	67,1 c ± 8,2	6,7 e ± 2,0	8,8 e ± 1,8

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± SD (desvio padrão)

¹ Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

² Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

As médias de retenção da riboflavina obtidas para a carne bovina preparada em Serviço de Alimentação variaram entre 69,3% e 91,4% (TABELA 4). As carnes grelhada no forno combinado e aquelas assadas e refogadas no forno combinado e em equipamentos convencionais apresentaram as maiores médias de retenção da riboflavina, não sendo consideradas diferentes estatisticamente. Uma boa relação tempo-temperatura parece ter evitado a degradação da riboflavina nas amostras grelhada no forno combinado e naquelas assadas nos dois equipamentos. Houve uma relação direta entre os maiores teores de riboflavina encontrados nas amostras de carne refogadas no forno combinado e em equipamento convencional (91,4 e 91,0%, respectivamente) e as menores perdas de umidade ocorridas nestas preparações (13,0 e 11,0%, respectivamente). Nestas preparações, a perda de riboflavina parece ter sido reduzida, especialmente pela lixiviação mais baixa.

A TABELA 4 mostra ainda que a mais baixa porcentagem de retenção da riboflavina em carne bovina foi encontrada na carne frita no forno combinado (69,3%), sendo obtida nesta preparação a maior perda de umidade

combinado (69,3%), sendo obtida nesta preparação a maior perda de umidade (25,6%). Neste caso, o fatiamento em bifes, expondo as amostras a uma grande área superficial e a temperatura e tempo de cocção utilizados (TABELA 2, capítulo 3) tiveram influência sobre os resultados obtidos.

NASVADI et alii (1993) reportaram 83,5% e 72,0% de retenção para riboflavina em carnes bovina frita e refogada em pequenas quantidades pelo método convencional. Em nosso estudo, as preparações acima retiveram 79,5% e 91,0%, respectivamente. HUTCHISON et alii (1987a), trabalhando com cortes de carne bovina crus e submetidos à cocção convencional em pequenas quantidades, obtiveram retenção de 68,0% em carne grelhada e 91,0% em carne assada, enquanto que, neste estudo, as preparações similares retiveram 72,0% e 90,1%, respectivamente. AWONORIN et alii (1996), trabalhando com preparações em pequenas quantidades, obtiveram uma porcentagem de retenção de riboflavina inferior (85,0%) àquela encontrada em nosso estudo para carne bovina assada (90,1%). Ao analisar os teores de vitaminas hidrossolúveis em carne bovina assada pelo método convencional, em grandes quantidades, AWONORIN & ROTIMI (1991) relataram 69,6% de retenção para riboflavina.

Observa-se que para a carne suína (TABELA 5) preparada de oito formas diferentes, a porcentagem de retenção da riboflavina variou entre 71,8% e 92,7%. A carne assada no forno combinado foi a preparação que apresentou a maior porcentagem de retenção (92,7%). Este resultado parece se dever mais ao controle do tempo e temperatura de cocção utilizados. O uso do sensor térmico nesta preparação (TABELA 3, Capítulo 3) permitiu avaliar o momento exato da cocção adequada, impedindo o prolongamento do tempo de cocção e o uso de uma temperatura mais elevada. Uma alta porcentagem de retenção da riboflavina também foi obtida na carne suína frita no forno combinado (92,1%) e naquela refogada no forno combinado (88,6%). Esta última preparação obteve a menor perda de umidade (10,5%), indicando que neste caso a retenção mais alta se deveu a uma lixiviação mais reduzida.

Por outro lado, as amostras de carnes suína grelhada, frita e assada no equipamento convencional apresentaram as médias de retenção da riboflavina mais reduzidas (72,6%; 70,9% e 71,8%, respectivamente) e não foram consideradas diferentes estatisticamente. A porcentagem de retenção obtida em carne frita em equipamento convencional foi associada a maior perda de umidade ocorrida nesta preparação (22,9%), ao passo que nas carnes grelhada e assada, além das perdas por lixiviação, a riboflavina parece ter sido degradada pela ação da temperatura e tempo de cocção utilizados (TABELA 3, Capítulo 3). HUTCHISON et alii (1987b), trabalhando com carne suína preparada de maneira convencional, em pequenas quantidades, obtiveram retenção de 92% em carne grelhada e 90% em carne assada. LEONHARDT et alii (1996) encontraram 73% de retenção em carne suína assada, também em pequenas quantidades, pelo método convencional. Uma porcentagem de retenção de riboflavina superior (81,5%) àquela encontrada em nosso estudo para carne suína assada (71,8%) foi encontrada por AWONORIN et alii (1996), que submeteram amostras de carne à cocção em pequenas quantidades. AWONORIN & ROTIMI (1991), trabalhando com carne suína assada de maneira convencional, em grandes quantidades, encontraram 66,4% de retenção de riboflavina, porcentagem inferior à obtida em carne suína assada em equipamento convencional no presente estudo (71,8%).

Através da TABELA 5 observa-se, ainda, que o forno combinado se destacou, restando significativamente mais a riboflavina que os equipamentos convencionais em todas as preparações efetuadas com a carne suína.

Ao analisar as oito formas de preparação de carne de frango (TABELA 6), verificou-se uma variação entre 60,1 e 92,3% de retenção da riboflavina. As carnes grelhada e cozida no forno combinado apresentaram os maiores teores de retenção da vitamina (92,3 e 89,2%, respectivamente), não havendo diferença significativa entre elas. A maior retenção na carne grelhada no forno combinado foi associada à relação adequada entre tempo e temperatura, evitando a perda de riboflavina por degradação. A retenção obtida na carne cozida em forno combinado foi relacionada com a menor perda de umidade

ocorrida (6,7%), reduzindo perdas associadas ao caráter hidrossolúvel da riboflavina.

Em contrapartida, as carnes de frango frita no forno combinado e aquelas grelhada, frita e cozida nos equipamentos convencionais retiveram as menores porcentagens de riboflavina (65,4%; 66,0%; 60,1% e 67,1%, respectivamente) e foram consideradas iguais pela análise estatística. Novamente as altas taxas de perda de umidade ocorridas nas amostras fritas no forno combinado e no equipamento convencional (26,1% e 24,2%, respectivamente) contribuíram para que a riboflavina fosse perdida, especialmente, por lixiviação. As condições de preparo, especialmente o tempo e a temperatura utilizados para as preparações grelhada e refogada nos equipamentos convencionais (TABELA 7, Capítulo 3), tiveram influência maior sobre a perda de riboflavina nestas amostras, já que as porcentagens de perdas de umidade não foram as mais elevadas.

Como mostra a TABELA 6, a riboflavina foi mais estável em carne de frango grelhada e cozida em forno combinado do que nas mesmas preparações efetuadas em equipamento convencional. A retenção da riboflavina em carne de frango frita e assada não foi diferente estatisticamente quando se utilizou o forno combinado ou os equipamentos convencionais.

De acordo com o relatado anteriormente, a estabilidade da riboflavina em preparações à base de carnes varia bastante quando se compara métodos de cocção aparentemente similares encontrados na literatura. Na verdade, as condições de preparo (especialmente o tipo de corte de carne, a forma de fatiamento dos cortes, o tempo e a temperatura de cocção, o tipo de equipamento) são distintas, dependendo dos hábitos alimentares existentes na região onde os estudos são efetuados. Além disso, como encontrado por PINHEIRO-SANT'ANA (1995) a estabilidade de determinada vitamina pode diferir bastante quando se prepara os alimentos em pequenas quantidades (nível doméstico) ou em grandes quantidades (nível de Serviço de Alimentação). No caso da riboflavina, a comparação de nossos resultados com estudos encontrados na literatura mostrou esta diferenciação.

Uma síntese da estabilidade apresentada pela riboflavina após preparação das carnes bovina, suína e de frango em Serviço de Alimentação é mostrada na FIGURA 4.

FIGURA 4. Estabilidade da riboflavina em carnes bovina, suína e de frango preparadas em Serviço de Alimentação (FC: forno combinado; EC: equipamento convencional).

4. CONCLUSÕES

- O armazenamento das amostras de carne bovina, suína e de frango durante o tempo de espera para distribuição aos usuários do Serviço de Alimentação (sem o uso de equipamentos para manter as preparações aquecidas) não afetou a estabilidade da riboflavina nos três tipos de carne após preparação.
- A estabilidade da riboflavina variou bastante nas carnes preparadas de diferentes formas em Serviço de Alimentação (retenção de 69,3% a 91,4% em carne bovina; 71,8% a 92,7% em carne suína e 60,1 a 92,3% em carne de frango).
- Não houve diferença significativa na estabilidade da riboflavina em carne bovina assada e refogada quando se utilizou o forno combinado ou os equipamentos convencionais. O forno combinado preservou mais a riboflavina na carne bovina grelhada, ao passo que o equipamento convencional permitiu uma maior retenção da vitamina na carne frita.
- Durante a cocção de carne suína em Serviço de Alimentação o forno combinado se destacou, preservando mais a riboflavina em todas as preparações, em comparação com os equipamentos convencionais.
- Para as preparações envolvendo a carne de frango a estabilidade da riboflavina foi mais elevada nas carnes grelhada e cozida em forno combinado, sendo que não houve diferença significativa na retenção da vitamina quando se utilizou o forno combinado ou os equipamentos convencionais para as carnes frita e assada.
- Nos três tipos de carnes preparadas de formas semelhantes as perdas de riboflavina foram associadas às perdas de umidade (lixiviação) e às condições de preparo dos cortes das carnes, especialmente ao tipo de equipamento utilizado, ao tempo e à temperatura de cocção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AL-KHALIFA, A .S., DAWOOD, A. A . Effects of cooking methods on thiamin and riboflavin contents of chicken meat. **Food Chem.**, Barking, v.48, p.69-74, 1993.
- ANG, C. Y. W. , MOSELEY, F. A. Determination of thiamin and riboflavin in meat and meat products by high-performance liquid chromatography, **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 28, n. 3, p. 486-489, 1980.
- AWONORIN, S. O. , ROTIMI, D. K. Effects of oven temperature and time on the losses of some B vitamins in roasted beef and pork. **J. Foodservice Syst.**, Trumbull, v. 6, p. 89-105, 1991.
- AWONORIN, S. O., BAMIRO, F. O., AYOADE, J. A. The effect of freezing rate, storage and cooking on some B-vitamins in beef and pork roasts. **J. Foodservice Syst.**, Trumbull, v. 9, p. 7-23, 1996.
- BEKBÖLET, M. Light effects on food. **J. Food Prot.**, Ames, v. 53, n. 5, p. 430-440, 1990.
- COMBINAÇÃO é novidade na cozinha. **Coz. Ind.**, São Paulo, v.14, p. 26-29, 1991.
- COSTA, A. Treinamento, passo para a qualidade. **Coz. Ind.**, São Paulo, v. 60, p. 57-58, 1997.
- DAWSON, K. R., UNKLESBAY, N.F. , HEDRICK, H. B. HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate heat-processing methods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.36, p. 1176-1179, 1988.
- GREENFIELD, H. , KUO, Y. L., HUTCHISON, G. I., WILLS, R. B. H. Composition of australian foods. 34. Beef and veal. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n,5, p.208-215, 227-228, 1987.

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1996.

- HUTCHISON, G. I., GREENFIELD, H., WILLS, R. B. H. Composition of australian foods. 35. Pork. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.216-222, 1987b.
- HUTCHISON, G. I., THOMAS, D. E., TRUSWELL, A. S. Nutrient composition of australian beef. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.199-201, 1987a.
- LEONHARDT, M., GEBERT, S., WENK, C. Stability of α -tocopherol, thiamin, riboflavin and retinol in pork muscle and liver during heating as affected by dietary supplementation. **J. Food Sci.**, Chicago, v.61, n.5, p. 1048-1051, 1996.
- NASVADI, G. E., LAW, C., MACKEY, J. D., LOGUE, K. P. Nutrient composition and sensory characteristics of canadian grain-fed veal cutlets. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v.73, p.183-189, 1993.
- OLLILAINEN, V., MATTILA, P., VARO, P., KOIVISTOINEN, P. HUTTUNEN, J. The HPLC determination of total riboflavin in foods. **J. Micronutr. Anal.**, Barking, v.8, p.199-207, 1990.
- ONO, K., BERRY, B. W., DOUGLASS, L. W. Nutrient composition of some fresh and cooked retail cuts of veal. **J. Food Sci.**, Chicago, v.51, n.5, p.1352-1357, 1986.
- PAULUS, K. Vitamin degradation during food processing and how to prevent it. In: SOMOGYI, J. C., MÜLLER, H. R., eds. **Nutritional impact of food processing**. Basel. Karger, 1989. p. 173-187.
- PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. **Efeito do método de preparo sobre a estabilidade de carotenóides em cenoura (*Daucus carota* L.)**. Viçosa, 1995. 115p. [Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa].
- QUALIDADE, a vedete do mercado. **Coz. Ind.**, São Paulo, v. 59, p. 28-42, 1997.
- RISS, T. L., BECHTEL, P. J., FORBES, R. M., KLEIN, B. P., McKEITH, F. K. Nutrient content of special fed veal ribeyes. **J. Food Sci.**, Chicago, v.48, p. 1868-1870, 1983.
- RYLEY, J. R., KAJDA, P. Vitamins in thermal processing. **Food. Chem.**, Barking, v.49, p.119-129, 1994.
- SHAMSUZZAMAN, K., CHUAQUI-OFFERMANN, N., LUCHT, L., MCDOUGALL, T., BORSA, J. Microbiological and others characteristics of chicken breast meat following electron-beam and sous-vide treatments. **J. Food Prot.**, Ames, v.55, n.7, p. 528-533, 1992.

Capítulo 5

RETENÇÃO DO ÁCIDO NICOTÍNICO EM CARNES PREPARADAS EM SERVIÇO DE ALIMENTAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

No processamento ou cocção dos alimentos existe sempre o compromisso entre segurança microbiológica e retenção de nutrientes. O aquecimento é frequentemente requerido para tornar o alimento seguro para o consumidor, além de melhorar a palatabilidade, a digestibilidade e inativar certos fatores anti-nutricionais. No entanto, este processo pode interferir na estabilidade de certos nutrientes, entre eles as vitaminas (HILL, 1994; SELMAN, 1994).

Dependendo da temperatura, do tempo e do método de processamento utilizado, as carnes estão sujeitas a perdas de umidade e de vitaminas, especialmente as hidrossolúveis. Apesar de se buscar um controle cada vez maior na qualidade dos produtos processados, particularmente das carnes, o efeito de diversas variáveis em relação à estabilidade das vitaminas carece de muitas informações (AWONORIN & ROTIMI, 1991).

A niacina possui, geralmente, uma excelente estabilidade ao calor e à luz na faixa inteira de pH dos alimentos. Contudo, deve ser lembrado que, sendo uma vitamina hidrossolúvel, a niacina pode ser perdida por lixiviação no branqueamento, nas operações de lavagem e nos sucos resultantes da cocção dos alimentos (BORENSTEIN 1977; RYLEY & KAJDA, 1994).

O forno combinado, por sua versatilidade e agilidade, representa um equipamento importante no processo de produção de refeições para coletividades. Devido a suas potencialidades, este equipamento pode agilizar o processo de produção de um Serviço de Alimentação, resultando em maior qualidade do produto, redução da mão de obra e da estrutura física (COMBINAÇÃO... 1991). Embora os fabricantes dos fornos combinados destaquem como qualidade a maior retenção de nutrientes em relação às preparações feitas em equipamentos convencionais, o exame da literatura na área não mostra estudos científicos comprovando esta afirmação.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido considerada a técnica mais sensível, precisa e rápida na determinação de niacina nos

alimentos (BALL, 1994). Para determinações em matrizes alimentares mais complexas, como no caso das carnes, ou determinações simultâneas, o uso de agentes de interação iônica, adicionados na fase móvel, tem facilitado as análises (SKURRAY, 1981; WIMALASIRI & WILLS, 1985; VIDAL-VALVERDE & RECHE, 1991).

Este trabalho teve como finalidade estudar a influência da preparação em Serviço de Alimentação Coletivo sobre o conteúdo do ácido nicotínico (vitamina PP ou B3) em diferentes cortes de carnes bovina, suína e de frango, e avaliar a sua estabilidade após métodos de preparação tradicionais, comparados com métodos de preparação em forno combinado. As carnes citadas constituem fontes ricas de ácido nicotínico e sua presença é constante no cardápio dos brasileiros.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. Matéria Prima

Conforme descrição no Capítulo 3.

2.1.2. Reagentes e Outros Materiais

Os reagentes e materiais descritos no Capítulo 2 foram utilizados nesta etapa.

2.1.3. Equipamentos

Utilizou-se os mesmos equipamentos descritos no Capítulo 2.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Delineamento Experimental

Utilizou-se o delineamento descrito no Capítulo 3.

As análises estatísticas foram conduzidas com o auxílio do programa SAEG, (Sistema para Análises Estatísticas), versão 7.0, 1997, da Universidade Federal de Viçosa.

2.2.2 Preparo das Amostras

As carnes bovina, suína e de frango foram submetidas a diferentes métodos de cocção em Serviço de Alimentação de acordo com as condições descritas no Capítulo 3.

2.2.3. Determinação da Umidade e dos Sólidos Totais

De acordo com o Capítulo 3.

2.2.4. Análise do Ácido Nicotínico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os procedimentos de extração da vitamina, preparo do padrão e análise do ácido nicotínico nas diferentes amostras foram efetuados de acordo com a metodologia definida no Capítulo 2.

Mesmo considerando que, teoricamente, a niacina é estável em condições ambientais diversas, as amostras foram, por precaução, protegidas da luz durante a manipulação para extração da vitamina.

A quantificação da vitamina foi realizada por padronização externa, sendo que os teores reais foram obtidos considerando-se as quantidades injetadas para análise e os cálculos das diluições realizadas no preparo das amostras.

Os resultados finais foram expressos em miligramas do ácido nicotínico por 100g da amostra e, ainda, em porcentagens de retenção da vitamina em cada método de preparação das carnes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise Qualitativa do Ácido Nicotínico

Cromatogramas típicos obtidos das amostras de carne bovina cruas utilizadas neste trabalho, assim como da carne bovina grelhada no forno combinado e em equipamento convencional, estão ilustrados na FIGURA 1.

Na FIGURA 2 são apresentados cromatogramas típicos dos extratos de carne de suína crua, assim como daquelas fritas no forno combinado e em equipamento convencional.

A FIGURA 3 mostra o perfil cromatográfico típico dos extratos das carnes de frango cruas estudadas e daquelas cozidas em forno combinado e em equipamento convencional.

Verifica-se que os extratos obtidos das amostras apresentaram muitos compostos interferentes que eluíram na região UV utilizada. Apesar disso, a fase móvel usada, contendo o contra-íon ácido heptano sulfônico e a trietilamina, possibilitou uma eficiente separação cromatográfica do ácido nicotínico dos outros componentes presentes nos extratos.

FIGURA 1. Análise por CLAE do ácido nicotínico (AN) em carne bovina. (a) solução de H_2SO_4 1N onde o padrão de ácido nicotínico foi diluído; (b) solução padrão de ácido nicotínico; (c) coxão mole cru; (d) peixinho cru; (e) acém cru; (f) coxão mole grelhado em forno combinado; (g) coxão mole grelhado em equipamento convencional. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila + água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico e 0,15% de trietilamina (5 + 95), pH ajustado para 2,8 com H_2SO_4 1N; coluna RP18; detecção UV a 261 nm; vazão: 0,8 ml/min.

FIGURA 2. Análise por CLAE do ácido nicotínico (AN) em carne suína (pernil). (a) crua; (b) frita no forno combinado; (c) frita em equipamento convencional. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila + água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico e 0,15% de trietilamina (5 + 95), pH ajustado para 2,8 com H_2SO_4 1N; coluna RP18; detecção UV a 261 nm; vazão: 0,8 ml/min.

FIGURA 3. Análise por CLAE do ácido nicotínico (AN) em carne de frango. (a) coxa e sobrecoxa crua; (b) peito cru; (c) peito cozido no forno combinado; (d) peito cozido em equipamento convencional. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila + água contendo 0,005M de ácido heptano sulfônico e 0,15% de trietilamina (5 + 95), pH ajustado para 2,8 com H_2SO_4 1N; coluna RP18; detecção UV a 261 nm; vazão: 0,8 ml/min.

3.3. Análise Quantitativa do Ácido Nicotínico

A curva de calibração e a equação de correlação entre os teores de ácido nicotínico e a área dos picos correspondentes encontram-se na FIGURA 4. Os teores de ácido nicotínico nas amostras oriundas dos diferentes tratamentos foram calculados por meio da equação de regressão linear assim obtida.

$$Y = 1235,89 X - 100,324$$

Y = área do pico

$$R^2 = 0,996255$$

X = peso do ácido nicotínico (µg)

FIGURA 4. Curva de calibração do ácido nicotínico (traçada com valores médios das análises em triplicata).

Os teores de ácido nicotínico, expressos na base úmida e seca, obtidos das amostras de carnes bovina, suína e de frango cruas e após preparação, podem ser observados nas TABELAS 1; 2 e 3, respectivamente.

TABELA 1. Teores de ácido nicotínico (mg/100g; média* ± DP) em **carne bovina** crua e após preparação em Serviço de Alimentação

Amostra	Crua				Preparada em Forno Combinado		Preparada em Equipamento Convencional	
	Base Úmida		Base Seca		Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
Coxão mole cru / grelhado	3,35 ± 0,13	12,75 ± 0,30	4,15 ± 0,14	10,13 ± 0,12	3,83 ± 0,21	3,83 ± 0,21	10,21 ± 0,24	7,76 ± 0,20
Coxão mole cru / frito	3,35 ± 0,13	12,75 ± 0,30	3,49 ± 0,22	7,73 ± 0,29	3,38 ± 0,22	3,38 ± 0,22	8,19 ± 0,45	7,68 ± 0,08
Peixinho cru / assado	2,37 ± 0,03	9,76 ± 0,29	3,30 ± 0,20	8,22 ± 0,36	3,29 ± 0,12	3,29 ± 0,12		
Acém crua / refogada	2,54 ± 0,05	8,50 ± 0,49	3,04 ± 0,16	7,78 ± 0,31	2,90 ± 0,08	2,90 ± 0,08		

TABELA 2. Teores de ácido nicotínico (mg/100g; média* ± DP) em **carne suína** crua e após preparação em Serviço de Alimentação

Amostra	Crua				Preparada em Forno Combinado		Preparada em Equipamento Convencional	
	Base Úmida		Base Seca		Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
Pernil, bife cru / grelhado	3,86 ± 0,04	13,20 ± 0,20	4,12 ± 0,11	9,81 ± 0,47	4,08 ± 0,18	4,08 ± 0,18	10,13 ± 0,21	10,48 ± 0,54
Pernil, bife cru / frito	3,86 ± 0,04	13,20 ± 0,20	4,32 ± 0,17	10,65 ± 0,09	3,98 ± 0,16	3,98 ± 0,16	8,19 ± 0,45	7,56 ± 0,08
Pernil, pedaço cru / assado	3,76 ± 0,10	13,84 ± 0,32	4,32 ± 0,06	8,22 ± 0,36	4,28 ± 0,43	4,28 ± 0,43		
Pernil, isca crua / refogada	3,71 ± 0,07	12,03 ± 0,17	3,35 ± 0,09	8,79 ± 0,11	3,56 ± 0,08	3,56 ± 0,08		

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± DP (desvio padrão)

TABELA 3. Teores de ácido nicotínico (mg/100g; média* ± DP) em **carne de frango** crua e após preparação em Serviço de Alimentação

Amostra	Crua		Preparada em Forno Combinado		Preparada em Equipamento Convencional	
	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
Peito, bife cru / grelhado	8,47 ± 0,14	33,30 ± 0,76	9,35 ± 0,22	23,85 ± 1,21	8,91 ± 0,33	24,44 ± 0,77
Coxa e sobrecoxa crua/frita	3,92 ± 0,09	17,59 ± 0,48	5,94 ± 0,16	13,88 ± 0,29	5,33 ± 0,17	12,89 ± 0,42
Coxa e sobrecoxa crua/assada	3,92 ± 0,09	17,59 ± 0,48	5,93 ± 0,17	14,83 ± 0,47	5,42 ± 0,22	13,16 ± 0,40
Peito inteiro cru / cozido	8,06 ± 0,07	31,07 ± 0,40	6,92 ± 0,09	22,40 ± 1,18	6,57 ± 0,18	20,21 ± 0,47

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± DP (desvio padrão)

Considerando o mesmo tipo de corte de carne, os teores de ácido nicotínico (expressos na base úmida) obtidos nas amostras processadas, são, na maioria das vezes, maiores que aqueles obtidos para as amostras cruas. Isto ocorre porque as carnes submetidas à cocção apresentam um maior conteúdo de sólidos totais devido à perda de umidade em relação às carnes frescas e, portanto, maior conteúdo de vitamina por unidade de peso. Assim, a expressão dos teores da vitamina na base úmida não permite uma análise correta quando se trata de avaliar a estabilidade após processamento.

Quando os teores do ácido nicotínico são expressos na base seca (100% de sólidos totais para todas as amostras), a diferença de umidade não reflete o seu efeito, podendo a análise da estabilidade ser avaliada corretamente.

A comparação dos teores de ácido nicotínico em carnes cruas, utilizando a base úmida pode ser mais facilmente efetuada, já que a maioria dos pesquisadores expressa desta forma seus resultados e que as porcentagens de umidade varia pouco nestas carnes. Contudo, a diferença da idade (ONO et alii, 1984) e da alimentação (ONO et alii, 1986; LEONHARDT et alii, 1996) dos animais utilizados nos diferentes estudos e da metodologia de análise empregada podem levar a diferenças significativas nos teores de vitaminas encontrados.

Os valores de ácido nicotínico, encontrados neste estudo, para as amostras de carne bovina cruas são ligeiramente inferiores (5%) aos relatados por TYLER & GENZALE (1990). GREENFIELD et alii (1987) e NASVADI et alii (1993) relataram valores em carne bovina crua, em média, 23% superiores aos obtidos por nós. Em carne suína, HUTCHISON et alii (1987) reportaram teores ligeiramente inferiores (2%) aos encontrados em nosso estudo.

Analisando as TABELAS 1; 2 e 3 verifica-se que os teores de ácido nicotínico (base seca) em todas as amostras de carnes processadas são menores quando comparados com as amostras cruas correspondentes. Tal redução se deve, principalmente, aos métodos de cocção, já que as perdas da

vitamina durante o descongelamento dos cortes para preparação não foram significativas nos três tipos de carnes utilizados.

Os resultados obtidos para carnes bovina e suína submetidas à preparação (TABELAS 1 e 2; base úmida) são similares àqueles relatados por DAWSON et alii (1988) que trabalharam com análise de niacina em carnes bovina e suína cruas, assadas e grelhadas em grandes quantidades, e aos encontrados por RHEE et alii (1993), que analisaram niacina, também em carnes suína e bovina fritas em pequenas quantidades. No entanto, torna-se difícil fazer uma comparação precisa já que os estudos citados apresentaram os valores de niacina obtidos apenas na base úmida, além das condições de preparo (tempo, temperatura e equipamentos) utilizadas serem diferentes.

BOWERS et alii (1987), estudando a composição de vitaminas do complexo B em amostras de frango fritas em estabelecimentos "fast-food", encontraram, em média, teores de ácido nicotínico (base seca) 7% superiores aos obtidos em nosso estudo para carne de frango frita nos dois tipos de equipamentos.

3.4. Avaliação da Estabilidade do Ácido Nicotínico

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre as médias de retenção do ácido nicotínico nos dois tempos de coleta das amostras (logo após preparo e 3h após preparo - resultados não mostrados). Este resultado indica que, nas condições em que as amostras preparadas foram armazenadas, simulando o tempo de espera para distribuição aos usuários do Serviço de Alimentação, não houve perda de ácido nicotínico após processamento. Assim, o teste de médias foi aplicado para testar, apenas, as diferenças entre as médias de retenção das oito formas de preparação em cada espécie animal.

A estabilidade do ácido nicotínico nas carnes bovina, suína e de frango submetidas a diferentes métodos de preparo em Serviço de Alimentação é mostrada nas TABELAS 4; 5 e 6, respectivamente.

TABELA 4. Retenção de ácido nicotínico e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em **carne bovina** preparada em Serviço de Alimentação

Método de Preparo	Retenção de Ácido Nicotínico (%) [*]		Perda de Umidade (%) [*]	
	Forno Combinado ¹	Equipamento Convencional ¹	Forno Combinado ²	Equipamento Convencional ²
Grelhada	79,5 b ± 2,6	80,2 b ± 3,6	19,8 c ± 2,4	15,3 d ± 2,9
Frita	60,7 c ± 1,8	60,9 c ± 1,1	25,6 a ± 2,6	23,5 ab ± 4,0
Assada	84,2 b ± 4,6	84,1 b ± 6,8	20,7 bc ± 1,4	20,9 bc ± 2,1
Refogada	91,5 a ± 2,3	91,1 a ± 4,5	13,0 de ± 2,8	11,0 e ± 2,2

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± SD (desvio padrão)

¹ Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

² Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

TABELA 5. Retenção de ácido nicotínico e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em **carne suína** preparada em Serviço de Alimentação

Método de Preparo	Retenção de Ácido Nicotínico (%) [*]		Perda de Umidade (%) [*]	
	Forno Combinado ¹	Equipamento Convencional ¹	Forno Combinado ²	Equipamento Convencional ²
Grelhada	74,9 ab ± 2,9	76,8 a ± 1,3	17,7 bc ± 2,6	15,6 c ± 2,9
Frita	68,9 c ± 1,3	66,3 d ± 1,0	25,9 a ± 3,4	22,9 a ± 3,5
Assada	77,0 a ± 1,6	75,8 a ± 2,0	17,2 bc ± 1,5	19,6 b ± 2,6
Refogada	73,1 b ± 1,4	62,8 e ± 1,5	10,5 d ± 2,7	23,5 a ± 2,3

*Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± SD (desvio padrão)

¹ Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

² Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

TABELA 6. Retenção de ácido nicotínico e perda de umidade (em relação às amostras cruas correspondentes) em **carne de frango** preparada em Serviço de Alimentação

Método de Preparo	Retenção de Ácido Nicotínico (%) [*]		Perda de Umidade (%) [*]	
	Forno Combinado ¹	Equipamento Convencional ¹	Forno Combinado ²	Equipamento Convencional ²
Grelhada	71,7 c ± 5,0	73,4 c ± 3,8	18,5 c ± 4,6	14,8 d ± 1,9
Frita	79,0 b ± 2,3	73,3 c ± 1,8	26,1 a ± 2,5	24,3 ab ± 2,5
Assada	84,4 a ± 3,0	74,9 bc ± 4,0	22,6 b ± 1,5	24,4 ab ± 0,9
Cozida	72,1 c ± 3,0	65,1 d ± 1,2	6,7 e ± 2,0	8,8 e ± 1,8

^{*}Médias de seis repetições (três repetições do tempo de coleta logo após preparo + três repetições do tempo de coleta 3 h após preparo) ± SD (desvio padrão)

¹Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

²Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nestas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Duncan

Em relação à carne bovina (TABELA 4), ao comparar as médias de retenção do ácido nicotínico dos oito métodos de preparo, observa-se que as carnes refogadas no forno combinado e no equipamento convencional se destacaram como as preparações que obtiveram as maiores médias de retenção (91,5% e 91,1%, respectivamente), sendo consideradas iguais estatisticamente. Estas preparações foram as que obtiveram as menores perdas de umidade (13,0 e 11,0%, respectivamente) como consequência do tempo e temperatura de cocção utilizados. Sendo o ácido nicotínico uma vitamina hidrossolúvel e sabendo que sua perda se deve principalmente à lixiviação ou perda de umidade (LACHANCE & ERDMAN, 1977), as condições expostas anteriormente parecem explicar o resultado obtido. Em contrapartida, as carnes bovinas fritas no forno combinado e no equipamento convencional (fritadeira) apresentaram as menores médias de retenção do ácido nicotínico (60,9 e 60,7%, respectivamente) sendo iguais estatisticamente. As médias de perda de umidade destas amostras foram as maiores obtidas (25,6% e 23,5%, respectivamente), possivelmente como resultado da forma de fatiamento

(bifes), que facilita muito a perda de sucos da carne e, assim, da vitamina estudada. Como o fatiamento em bifes resulta em uma grande área superficial, a perda de suculência das carnes é bem maior, até mesmo nos bifes crus, que em outros tipos de fatiamento. Segundo SELMAN (1994) e HILL (1994), esta condição pode realmente contribuir para redução dos teores de vitaminas hidrossolúveis.

Analizando, ainda, a TABELA 4, quando os métodos de preparo são comparados usando o forno combinado e os equipamentos convencionais, verifica-se que as carnes bovinas grelhadas no forno combinado e no equipamento convencional apresentaram médias de retenção consideradas iguais estatisticamente (80,2 e 79,5%, respectivamente). Analogamente, as carnes bovinas assadas no forno combinado e no equipamento convencional apresentaram médias de retenção consideradas iguais pela análise estatística (84,2 e 84,1%, respectivamente). Os resultados obtidos mostram que, nas condições em que este estudo foi realizado, os níveis de retenção do ácido nicotínico em carne bovina preparada de quatro formas diferentes, não diferiram quando se utilizou o forno combinado ou os equipamentos convencionais.

Para carne suína (TABELA 5), quando as médias de retenção obtidas em relação aos oito métodos de preparo são analisadas, verifica-se que a carne assada no forno combinado foi a preparação que apresentou a maior porcentagem de retenção do ácido nicotínico (77,0%). A utilização do pré aquecimento a 300°C (TABELA 3, capítulo 3) permitiu o fechamento dos poros das peças de carne, reduzindo a perda de suco (LAWRIE, 1985) ou umidade. O uso do modo de operação combinado evita o ressecamento das peças, mantendo sua suculência. Além disso, o uso do sensor térmico permite avaliar o momento exato da cocção adequada, impedindo o prolongamento do tempo de cocção e o uso de uma temperatura mais elevada. Estes fatores somados, possivelmente, permitiram que a carne suína assada no forno combinado se destacasse em relação à estabilidade do ácido nicotínico. Por outro lado, a carne suína refogada no equipamento convencional resultou na mais baixa

porcentagem de retenção obtida (62,8%). Esta preparação sofreu a maior porcentagem de perda de umidade em relação às demais (23,5%) reforçando a inter-relação existente entre a perda do teor de umidade e a perda do ácido nicotínico que é hidrossolúvel.

Ainda pela TABELA 5, a comparação dos quatro métodos de preparo utilizando o forno combinado e os equipamentos convencionais mostra que a carne suína grelhada de maneira convencional reteve mais o ácido nicotínico (76,8%) que a grelhada no forno combinado (74,9%). A necessidade de uso de um tempo de cocção e temperatura mais elevados no forno combinado (TABELA 3, capítulo 3) e a perda mais elevada de umidade neste equipamento (17,7%) podem explicar estas diferenças de retenção. A retenção de ácido nicotínico em carne suína frita no forno combinado foi ligeiramente superior (68,9%) àquela frita em equipamento convencional (66,3%), embora a perda de umidade das duas preparações não tenha se mostrado diferente estatisticamente. Finalmente, um maior tempo de exposição ao calor (TABELA 6, capítulo 3), levando a uma perda bem mais acentuada de umidade na carne refogada no equipamento convencional (23,5%), podem ter causado uma menor retenção de ácido nicotínico nesta preparação (62,8%) em relação à carne refogada no forno combinado (73,0% de retenção).

Analisando as médias de retenção do ácido nicotínico obtidas dos oito métodos de preparo de carne de frango (TABELA 6), verifica-se que, como para a carne suína, a carne de frango assada no forno combinado se destacou como aquela que obteve a maior porcentagem de retenção de ácido nicotínico (84,4%) e que a carne cozida no equipamento convencional foi a que obteve a menor porcentagem de retenção da vitamina (65,1%). Os mesmos fatores expostos acima para carne suína explicam a obtenção destes valores.

Observa-se também pela TABELA 6 que, comparando cada método de preparação da carne de frango com os equipamentos utilizados (forno combinado e equipamentos convencionais), as médias de retenção do ácido nicotínico seguem um perfil semelhante àquele obtido para a carne suína. As carnes de frango grelhadas no equipamento convencional e no forno

combinado apresentaram níveis de retenção considerados iguais estatisticamente (73,5% e 71,7%, respectivamente). A carne frita no forno combinado reteve mais a vitamina (79,0%) que a frita no equipamento convencional (73,3%). A retenção do ácido nicotínico foi, também, maior na carne assada no forno combinado (84,4%) do que aquela obtida para carne assada no equipamento convencional (74,9%). A carne cozida no forno combinado obteve maior retenção do ácido nicotínico (72,1%) do que a cozida no equipamento convencional (65,1%). Os mesmos motivos expostos acima para carne suína podem, possivelmente, explicar as diferenças de retenção do ácido nicotínico na carne de frango.

Ao comparar os três tipos de carnes preparadas de formas semelhantes, observa-se que a estabilidade do ácido nicotínico foi, de um modo geral, maior em carne bovina (60,7 a 91,5% de retenção), intermediária em carne de frango (65,1 a 84,4% de retenção) e menor em carne suína (62,8 a 77,0% de retenção). Estes resultados mostram uma tendência semelhante àquela obtida por AWONORIN e ROTIMI (1991) em carnes bovina e suína assadas. A carne bovina contém maior quantidade de tecido conjuntivo que a carne suína, retendo mais a mistura água/gelatina durante a cocção (LAWRIE, 1985).

A perda de umidade parece ter favorecido as perdas de ácido nicotínico nos três tipos de carne. Além disso, a combinação tempo-temperatura também apresentou grande significância nas perdas desta vitamina, já que está diretamente relacionada com a perda de umidade quando as carnes são submetidas à cocção. Em um estudo realizado por AWONORIN e ROTIMI (1991), eles encontraram grande concordância entre a redução de umidade e a perda de tiamina, riboflavina e niacina em carnes bovina e suína assadas em grandes quantidades.

Na maioria dos estudos envolvendo processos de cocção dos alimentos, as condições não são adequadamente controladas, sendo difícil fazer comparações dos resultados (RYLEY & KAJDA, 1994). Além disso, as condições de preparação das carnes são bastante variáveis, dependendo dos

hábitos alimentares dos consumidores, especialmente no que diz respeito ao ponto de cocção preferido (carne mal passada, ao ponto ou bem passada).

A FIGURA 5 resume os níveis de retenção do ácido nicotínico nos três tipos de carnes preparadas em forno combinado e em equipamento convencional.

FIGURA 5. Estabilidade do ácido nicotínico em carnes bovina, suína e de frango preparadas em Serviço de Alimentação. (FC: forno combinado; EC: equipamento convencional).

4. CONCLUSÕES

- O armazenamento das amostras de carne bovina, suína e de frango durante o tempo de espera para distribuição aos usuários do Serviço de Alimentação (sem o uso de equipamentos para manter as preparações aquecidas) não afetou a estabilidade do ácido nicotínico nos três tipos de carne após preparação.
- A estabilidade do ácido nicotínico foi, de um modo geral, maior em carne bovina (60,7 a 91,5% de retenção), intermediária em carne de frango (65,1 a 84,4% de retenção) e menor em carne suína (62,8 a 77,0% de retenção).
- Na maior parte das preparações, o uso do forno combinado permitiu uma maior retenção do ácido nicotínico em carne suína e em carne de frango, quando comparado com os equipamentos convencionais. Estes resultados sugerem a preferência do forno combinado quando se deseja uma qualidade superior destas preparações.
- Não houve diferença significativa na estabilidade do ácido nicotínico em carne bovina preparada de diferentes formas quando se utilizou o forno combinado ou os equipamentos convencionais.
- O método refogar (carne bovina) e o método assar (carne suína e de frango) se destacaram como aqueles que preservaram mais o ácido nicotínico presente, originalmente, nas amostras.
- Nos três tipos de carnes preparados de formas semelhantes as perdas de ácido nicotínico foram associadas às perdas de umidade. Além disso, o tempo e a temperatura de cocção, tiveram influência nas perdas desta vitamina, visto que estas variáveis estão relacionadas com a perda de umidade em carnes processadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AWONORIN, S. O. , ROTIMI, D. K. Effects of oven temperature and time on the losses of some B vitamins in roasted beef and pork. **J. Foodservice Syst.**, Trumbull, v. 6, p. 89-105, 1991.
- BALL, G. F. M. **Water-soluble vitamin assays in human nutrition**. London: Chapman & Hall, 1994. 416 p.
- BORENSTEIN, B. Stability of nutrients in foods. In: HARRIS, R. S. , KARMAS, E., eds. **Nutritional evaluation of food processing**. 2.ed. Westport: AVI, 1977. p. 16-18.
- BOWERS, J. A., CRAIG, J. A., TUCKER, T. J., HOLDEN, M. S., POSATI, L. P. Vitamin and proximate composition of fast-food fried chicken. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.87, n.6, p.736-739, 1987.
- COMBINAÇÃO é novidade na cozinha. **Coz. Ind.**, São Paulo, v.14, p. 26-29, 1991.
- DAWSON, K. R., UNKLESBAY, N.F. , HEDRICK, H. B. HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate heat-processing methods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.36, p. 1176-1179, 1988.
- GREENFIELD, H. , KUO, Y. L., HUTCHISON, G. I., WILLS, R. B. H. Composition of australian foods. 34. Beef and veal. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.208-215, 227-228, 1987.
- HILL, M. A. Vitamin retention in microwave cooking and cook-chill foods. **Food Chem.**, Barking, v.49, p.131-136, 1994.
- HUTCHISON, G. I., GREENFIELD, H., WILLS, R. B. H. Composition of australian foods. 35. Pork. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.5, p.216-222, 1987.
- LACHANCE, P. A., ERDMAN, J. W. Effects of home food preparation practices on nutrients content of foods. In: HARRIS, R. S., KARMAS, E., eds. **Nutritional evaluation of food processing**. 2 ed. Westport: AVI, 1977. p.529-567.

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1996.

- LAWRIE, R. A. **Meat science**. 4.ed. Oxford: Pergamon Press, 1985. 267p.
- LEONHARDT , M., GEBERT, S., WENK, C. Stability of α -tocopherol, thiamin, riboflavin and retinol in pork muscle and liver during heating as affected by dietary supplementation. **J. Food Sci.**, Chicago, v.61, n.5, p. 1048-1051, 1996.
- NASVADI, G. E., LAW, C., MACKEY, J. D., LOGUE, K. P. Nutrient composition and sensory characteristics of canadian grain-fed veal cutlets. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v.73, p.183-189, 1993.
- ONO, K., BERRY, B. W., DOUGLASS, L. W. Nutrient composition of some fresh and cooked retail cus of veal. **J. Food Sci.**, Chicago, v.51, n.5, p.1352-1357, 1986.
- ONO, K.; BERRY, B. W.; JOHNSON, H. K.; RUSSEK, E.; PARKER, C. F.; CAHILL, V. R.; ALTHOUSE, P. G. Nutrient composition of lamb of two age groups. **J. of Food Sci.**, **49**: 1234-1239, 1984.
- RHEE, K. S., GRIFFITH-BRADLE, H. A ., ZIPRIN, Y. A . Nutrient composition and retention in browned ground beef, lamb and pork. **J. Food Compos. Anal.**, Barking, v.6, p.268-277, 1993.
- RYLEY, J. R. , KAJDA, P. Vitamins in thermal processing. **Food. Chem.**, Barking, v.49, p.119-129, 1994.
- SELMAN, J. D. Vitamin retention during blanching of vegetables. **Food. Chem.**, Barking, v.49, p.137-147, 1994.
- SKURRAY, G. R. A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamin en foods. **Food Chem.**, Barking, v.7, p.77-80, 1981.
- TYLER, T. A., GENZALE, J. A. Liquid chromatographic determination of total niacin in beef, semolina and cottage cheese. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.73, n.3, p.467-469, 1990.
- VIDAL-VALVERDE, C. V., RECHE, A. Determination of available niacin in legumes and meat by HPLC. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.39, p.116-121, 1991.
- WIMALASIRI, P., WILLS, R. B. H. Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by HPLC. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 318, p. 417-426, 1985.

CONCLUSÕES GERAIS

- A metodologia utilizada para extração da tiamina e riboflavina (hidrólise ácida a quente, seguida de hidrólise enzimática com clara-díastase) em carnes, que contém estas vitaminas principalmente nas formas ligadas, foi de fundamental importância na liberação das formas livres das vitaminas, facilitando as análises por CLAE. O uso da hidrólise ácida em autoclave foi eficiente para transformação da nicotinamida presente nas carnes para ácido nicotínico, o que simplificou as análises por CLAE e permitiu a quantificação de toda a niacina presente na forma de ácido nicotínico.
- As condições cromatográficas otimizadas para análise de tiamina, riboflavina e ácido nicotínico em carnes apresentaram eficiência na separação destas vitaminas e permitiram a obtenção de dados quantitativos confiáveis. Para as três vitaminas, foram necessárias avaliações de diversas condições até se chegar àquelas finalmente selecionadas.
- As porcentagens de recuperação obtidas confirmaram a adequação das condições de extração das vitaminas e das condições cromatográficas otimizadas para análise de tiamina, riboflavina e ácido nicotínico em carne bovina, suína e de frango.
- Os métodos de preparo em Serviço de Alimentação causaram uma redução significativa do teor de umidade nos cortes de carnes bovina (11,0 a 25,5%), suína (10,5 a 25,9%) e de frango (6,7 e 26,1%) utilizados. Esta redução foi associada, principalmente, ao escoamento de suco das carnes antes e durante a cocção, e à ação da temperatura e tempo de cocção.
- Os teores de tiamina, riboflavina e ácido nicotínico contidos nos três tipos de carne não foram diferentes estatisticamente nas amostras provenientes dos dois tempos de coleta utilizados (logo após preparação e após armazenameto por 3h). A não utilização de equipamento para manter as preparações aquecidas (balcão térmico, por exemplo) durante o tempo de espera para distribuição aos usuários parece ter sido responsável por esta estabilidade da vitamina após o processamento das carnes.

- A tiamina foi a vitamina mais sensível aos métodos de preparo em Serviço de Alimentação (47,2 a 84,7% de retenção em carne bovina; 49,6 a 79,8% de retenção em carne suína e 53,7 a 81,1% de retenção em carne de frango). O método de preparação refogar ou cozer sem imersão em água no forno combinado se destacou em termos de retenção da tiamina nos três tipos de carnes estudados.
- A riboflavina também foi bastante afetada pelos métodos de preparo utilizados, o que pode ser verificado pelas porcentagens de retenção obtidas (69,3% a 91,4% em carne bovina; 71,8% a 92,7% em carne suína e 60,1 a 92,3% em carne de frango).
- A estabilidade do ácido nicotínico foi, de um modo geral, maior em carne bovina (60,7 a 91,5% de retenção), intermediária em carne de frango (65,1 a 84,4% de retenção) e menor em carne suína (62,8 a 77,0% de retenção). O método refogar (carne bovina) e o método assar (carnes suína e de frango) se destacaram como aqueles que preservaram mais o ácido nicotínico presente, originalmente, nas amostras.
- O forno combinado se destacou, permitindo uma maior estabilidade das três vitaminas quando comparado com os equipamentos convencionais, na maioria das preparações envolvendo os três tipos de carne. Os resultados obtidos indicam que, a nível de Serviços de Alimentação, o forno combinado é a melhor opção para preparação de carnes bovina, suína e de frango quando se deseja uma qualidade superior destas preparações.
- Nos três tipos de carnes preparadas de formas semelhantes as perdas de tiamina, riboflavina e ácido nicotínico foram associadas à solubilidade em água (perdas de umidade) e às condições de preparo das carnes, especialmente ao tipo de equipamento utilizado, à forma de fatiamento dos cortes, ao tempo e à temperatura de cocção.

RESUMO

Apesar da evolução tecnológica, estudos sobre a estabilidade de nutrientes em alimentos preparados em Serviços de Alimentação têm recebido pouca atenção. No entanto, é cada vez maior o número de pessoas que fazem suas refeições nestes estabelecimentos.

Uma vez que o conteúdo em vitaminas é um dos fatores mais importantes na determinação da qualidade dos alimentos processados, o objetivo deste estudo foi definir métodos de análise quantitativa para tiamina, riboflavina e ácido nicotínico por CLAE em carnes, para, então, avaliar a influência da preparação em Serviço de Alimentação sobre o conteúdo destas vitaminas em diferentes cortes de carnes bovina, suína e de frango. Objetivou-se também avaliar a estabilidade das vitaminas citadas após métodos de preparação tradicionais comparados com métodos de preparação em forno combinado (um dos equipamentos de cocção mais modernos utilizados em Serviço de Alimentação).

As amostras de carnes foram grelhadas, fritas, assadas e refogadas ou cozidas sem imersão em água utilizando-se o forno combinado e também equipamentos industriais de modelo convencional.

Os resultados obtidos mostraram que a tiamina foi a vitamina mais afetada pelos métodos de preparo em Serviço de Alimentação (47,2 a 84,7% de retenção em carne bovina; 49,6 a 79,8% de retenção em carne suína e 53,7 a 81,1% de retenção em carne de frango). Para riboflavina as porcentagens de retenção foram de 69,3% a 91,4% em carne bovina; 71,8% a 92,7% em carne suína e 60,1 a 92,3% em carne de frango. A estabilidade do ácido nicotínico foi, de um modo geral, maior em carne bovina (60,7 a 91,5% de retenção), intermediária em carne de frango (65,1 a 84,4% de retenção) e menor em carne suína (62,8 a 77,0% de retenção). Para a grande maioria das preparações, o uso do forno combinado (em comparação com os equipamentos convencionais) preservou mais as três vitaminas, sugerindo que este equipamento é a melhor opção para preparação de carnes bovina, suína

e de frango quando se deseja uma maior estabilidade destas vitaminas. Nos três tipos de carnes preparadas de formas semelhantes as perdas das vitaminas foram associadas às perdas de umidade e às condições de preparo das carnes.

SUMMARY

Despite the progress achieved, studies on nutrient retention in food service preparation have not received much attention. However, more and more people eat at these places.

Since vitamin content is one of the most important factors in determining processed food quality, the objective of this study was to define quantitative analysis methods for thiamin, riboflavin and nicotinic acid by high-performance liquid chromatography (HPLC) in meat in order to evaluate the influence of food service preparation on the content of these vitamins on different beef, pork and chicken cuts. Another objective was to evaluate these vitamins' retention under conventional preparation methods, compared to combined oven, one of the most modern cooking methods used in food service.

Samples of meat were charbroiled, fried, roasted and cooked without water in a combined oven and in conventional equipments.

The results showed that thiamin was the vitamin most affected by the food service preparation methods (47.2 to 84.7% of retention in beef; 49.6 to 79.8% of retention in pork and 53.7 to 81.1% of retention in chicken). Riboflavin content retention was from 69.3 to 91.4% in beef; 71.8 to 92.7% in pork and 60.1 to 92.3% in chicken. Nicotinic acid retention was, in general, higher in beef (60.7 to 91.5%), medium in chicken (65.1 to 84.4%) and lower in pork (62.8 to 77.0%). For most preparations, the use of combined oven preserved the three vitamins better than the other conventional equipments. The results obtained indicate that, as far as food service is concerned, the combined oven is the best option for beef, pork and chicken preparation when a greater thiamin, riboflavin and nicotinic acid stability is desired. In the three types of meat prepared in a similar manner, vitamins losses were associated to moisture loss and to the conditions of meat preparation.