

Determinação de vitamina A em pescado: adaptação de metodologia

Vitamin A determination in fish: methodology adaptation

Nilson G. LANKHE¹
Glênio MAGAGNIN²
Eliana B. FURLONG^{3*}

RIALA6/951

Lankhe, N. G.; Magagnin, G. e Furlong, E. B.- Determinação de vitamina A em pescado: adaptação de metodologia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 151 - 158, 2003.

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi extrair e determinar a vitamina A em músculo de pescado através de um método simples e confiável. A metodologia adaptada consistiu em determinar espectrofotometricamente palmitato de retinila extraído de lipídios de músculo de pescado pelo método de Bligh e Dyer (1959). No extrato lipídico aplicou-se uma técnica de limpeza empregando cromatografia de partição em minicoluna de alumina neutra, para separar a vitamina sem o emprego da saponificação, seguida de quantificação espectrofotométrica a 325 nm pela técnica de adições sucessivas. Para avaliação do potencial do método foram avaliados os coeficientes de variação (4 a 7%) e a recuperação média (90,7%). Estes dados de recuperação são promissores quando comparados a valores obtidos quando se empregou o método colorimétrico de Carr Price às amostras, contendo concentrações conhecidas de padrão, eliminando interferentes pelo método oficial (57%) e pelo proposto (75%). O método adaptado foi aplicado em amostra *in natura*, industrializada (enlatada) e processada termicamente (assada), mantendo suas características de repetibilidade e recuperação, a exceção de quando aplicado às amostras de pescado enlatado. A aplicação do método a amostras *in natura* de enchova (*Pomatomus saltatrix*) e de tainha (*Mugil brasiliensis*), porção comestível, resultou em níveis de 303 ER/100g (CV=5%) e 214 ER/100g (CV=7%) de vitamina A. Em enchova assada foi encontrado 255 ER/100g (CV=4%) de vitamina A.

PALAVRAS-CHAVE. palmitato de retinila, vitamina A, pescado.

¹Mestre em Engenharia de Alimentos pela Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

²Estudante de graduação em Engenharia de Alimentos da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil.

³Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil.

*Endereço para correspondência - Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475 - 96201-900 Rio Grande, RS, Brasil
f: 053 2338645 fax: 053 2329716 - email: dqmebf@super.furg.br

INTRODUÇÃO

Os pescados são ricos em proteína, e algumas espécies também em ácidos graxos do tipo ômega três e vitaminas lipossolúveis que contribuem para o valor nutricional^{2,14}.

A vitamina A, retinol, é um álcool diterpênico formado por um anel trimetilcicloexenil e uma cadeia lateral de isoprenos, que se acumula nos depósitos de gordura, estando presente no fígado de peixes e de outros animais, na gordura do leite e na gema do ovo. O óleo de fígado de numerosas famílias de elasmobrânquios é rico em vitamina A^{10,12,14}.

Segundo Sikorski¹³, a carne de peixes magros pode atingir concentrações de vitamina A de até 100 UI/100g enquanto que em peixes gordos até 4500 UI/100g de carne, predominantemente como ésteres de ácidos graxos. Em peixes de água doce e anádromos predomina a forma de vitamina A2 que possui 40% da atividade do trans retinol^{4,9,10}.

A presença destes ésteres de retinol em pescados chama atenção por suas quantidades excederem em muito as necessidades biológicas e por permanecerem em níveis constantes mesmo que variem os teores de gorduras durante o ciclo de vida dos peixes⁴. No entanto, informações sobre a composição química dos pescados mais consumidos na América Latina são escassas, principalmente no que se refere aos nutrientes traços, como as vitaminas^{5,6}.

Parte desta situação se deve à dificuldade oferecida pelos métodos oficiais que sendo acessíveis são muito susceptíveis aos efeitos operacionais. Além disso uma mesma vitamina pode aparecer nos alimentos em diferentes formas químicas apresentando atividades vitamínicas distintas que podem ser determinadas para uma melhor avaliação do valor nutricional^{2,4,12}. Os métodos que permitem distinguir as diferentes formas químicas exigem instrumentação cromatográfica nem sempre disponível na maioria dos laboratórios de países em desenvolvimento, onde o conhecimento dos nutrientes dos alimentos é fundamental para definir políticas de desenvolvimento social^{10,12}.

O objetivo deste trabalho foi extrair e determinar a vitamina A em músculo de pescado e para tal foi adaptado um método. Desta forma poder-se-ia disponibilizar um procedimento menos susceptível aos erros inerentes do manuseio analítico de amostras contendo as diferentes formas de vitamina A e acessível a laboratórios que não disponham de condições para empregar rotineiramente técnicas mais sofisticadas de separação e quantificação. Para demonstrar o potencial do método proposto foram avaliados os níveis de recuperação, a repetibilidade, os resultados obtidos foram comparados com o método recomendado pela AOAC e os valores encontrados nas amostras de diferentes tipos de pescado com os registrados em bibliografia específica^{5,6}.

O método oficial de Carr Price, indicado pela AOAC possui dois pontos críticos: a necessidade de saponificação, que expõe a vitamina A a temperatura elevada, e a instabilidade do complexo colorido formado pelo retinol e o tricloreto de

antimônio, que gera resíduos tóxicos após as determinações^{6,10,12}. Na tentativa de diminuir estes problemas o método adaptado procurou efetivar a extração e determinação do palmitato de retinila, uma das principais formas da vitamina presente nos músculos, sem saponificação e empregando a absorvidade deste na região do ultra violeta a 325 nm¹².

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

As amostras de enchova (*Pomatomus saltatrix*) foram coletadas diretamente de barcos pesqueiros no porto da cidade do Rio Grande, RS, tomando um mínimo de 0,8% da captura para compor a amostra bruta. Foi aleatoriamente tomado 1% da amostra bruta para constituir a amostra de laboratório (aproximadamente 10 kg de pescado fresco). As amostras foram evisceradas e colocadas em recipientes fechados sob atmosfera de nitrogênio e congeladas até o momento das determinações.

As amostras de tainha (*Mugil brasiliensis*) foram adquiridas no mercado público da cidade do Rio Grande, RS, em três diferentes períodos do ano 2000, abril, agosto e outubro. Estas foram evisceradas e fileteadas no entreposto pesqueiro da cidade do Rio Grande, RS, levadas ao laboratório e homogeneizadas antes da tomada das amostras analíticas, para a determinação sem congelamento prévio.

O atum enlatado foi adquirido no comércio local e o lote foi formado por uma única marca, produzida por uma fábrica local. Após a homogeneização foram tomadas as amostras analíticas.

As enchovas assadas foram adquiridas numa festa popular da região, onde o pescado foi eviscerado, colocado em espetos fincados perpendicularmente no fogo, conforme o hábito regional.

2. Determinação de umidade e lipídios totais

O conteúdo de água presente foi determinado em todas as amostras de pescado pelo método de secagem em estufa a 100 – 110°C, até atingir peso constante, de acordo com AOAC nº 935.29¹. Lipídios totais foram determinados pelo método gravimétrico de Bligh e Dyer^{3,11}.

3. Determinação de palmitato de retinila em porção comestível de Pescado

Os pescados frescos eviscerados foram homogeneizados em liquidificador, bem como os outros tipos de amostras. Destes homogeneizados foram pesados exatamente 5 g de amostra, transferidos para um gral e macerados com 10 ml de metanol e 5ml de clorofórmio. Posteriormente foram acrescentados 5ml de clorofórmio e 5ml de água, macerando a cada acréscimo de solvente. O conteúdo do gral foi transferido quantitativamente para um tubo de centrífuga separando suas fases com força de 2500 G por 10 minutos.

A camada inferior, clorofórmica, foi transferida para um frasco âmbar previamente tarado, e o solvente evaporado sob

atmosfera de nitrogênio.

O resíduo seco foi dissolvido com hexano, eluído por uma coluna cromatográfica contendo celite (aproximadamente 10g) e o eluato coletado num balão volumétrico de 25ml completando o volume com hexano, preparando assim uma solução de concentração expressa em g de óleo.

Foi preparada uma coluna de vidro com 12 cm de comprimento contendo aproximadamente 9g de óxido de alumínio (alumina) neutro com atividade I (partículas entre 63 e 200 μ M) e sulfato de sódio anidro (0,1g) na parte superior. Os adsorventes foram tratados primeiramente com álcool isopropílico a 50% em hexano, seguido de 10ml de hexano.

Seca a coluna cromatográfica foram eluídos 5ml da solução amostra com o triplo deste volume de hexano em três porções iguais, o eluato foi coletado em frasco âmbar e evaporado sob atmosfera de nitrogênio. O eluato foi reconstituído com 5ml de hexano com agitação em banho ultra sônico e sua absorbância lida em 325nm.

A quantificação final de palmitato de retinila, nas diferentes amostras estudadas, foi realizada usando a técnica de adições sucessivas. Neste caso foram adicionados a 5 ml de solução de extrato purificado, 5 ml de solução padrão de palmitato de retinila contendo 13; 18; 23 e 32 μ M. Os solventes dessas misturas foram evaporados sob atmosfera de nitrogênio e as novas soluções reconstituídas com 5ml de hexano. A partir das concentrações de padrão adicionadas e absorbâncias lidas em 325nm foram determinados os parâmetros da curva de adição empregada para a quantificação.

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução estoque contendo 0,0264g de palmitato de retinila (Sigma Chemical Corporation) em 50 ml de hexano. A partir desta foram preparadas soluções de concentrações que variaram entre 2 e 15 μ mol/L cujas absorbâncias foram lidas a 325 nm.

4. Repetibilidade

Após o estabelecimento do procedimento de extração, limpeza e clarificação do extrato vitamínico, a repetibilidade foi testada empregando o procedimento em seis alíquotas de polpa de enchovas provenientes do mesmo lote e os coeficientes de variação foram calculados⁷. Tais experimentos foram realizados em três períodos diferentes durante o desenvolvimento do trabalho.

5. Recuperação

A exatidão do método foi testada pela recuperação em três níveis diferentes, foram eles 67, 100 e 134 μ g de palmitato de retinila adicionados respectivamente a 10 g de massa de amostra de enchova homogeneizada. Os testes foram realizados em duplicata seguindo o procedimento de determinação de vitamina A, descrito no ítem 3.

6. Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado diluindo soluções de palmitato de retinila padrão (a partir de 5 μ l/L) e avaliando a

linearidade da relação concentração e absorbâncias em valores menores que 0,2⁷. Para estimar o limite de detecção na amostra foi empregado o procedimento recomendado por Horwitz et al.⁷, determinando a absorbância de soluções de amostras diluídas que resultavam em valores entre 0,15 e 0,2. Estes foram convertidos nas respectivas concentrações na curva padrão de adições sucessivas. Considerou-se o limite de detecção a concentração correspondente ao dobro do valor do desvio padrão de 6 determinações.

7. Comparação com outro método de determinação de vitamina A

Para estudo de comparação dos níveis de vitamina A obtidos pelos métodos de Carr Price (AOAC, n° 974.29) e pelo proposto foram usadas amostras de enchova, provenientes da mesma coleta. Foi avaliada a recuperação pelos dois métodos, empregando os mesmos níveis de palmitato de retinila descritos no ítem 5. O palmitato de retinila foi adicionado de duas formas diferentes, ao extrato e diretamente nas amostras de músculo homogeneizadas. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

8. Aplicabilidade do método proposto

Para avaliar a aplicabilidade do método proposto foram tomadas amostras homogeneizadas de músculos de enchovas (*Pomatomus saltatrix*) e de tainhas (*Mugil brasiliensis*) “in natura”, de atum enlatado e de enchova processada termicamente (assada). Todas as determinações foram realizadas em triplicatas em dois períodos diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. O método, quanto à extração dos lipídios

Os experimentos foram realizados na ausência de luz procurando prevenir a decomposição da vitamina A, sob a forma de palmitato de retinila. As determinações de umidade e lipídios totais foram úteis para informar o desempenho do método de extração utilizado e a integridade da composição química do pescado no que diz respeito às quantidades desses componentes, pois segundo Ogawa e Maia⁹ a soma dos teores de umidade e lipídios em pescado in natura está ao redor de 80% em relação à massa.

No método proposto a extração dos lipídios foi realizada segundo o método de Bligh e Dyer³, o que é uma vantagem pois as amostras não foram submetidas a temperaturas superiores a 50°C, foram extraídos os lipídios apolares e os polares³. A Tabela 1 apresenta os resultados médios da umidade (U) e dos lipídios totais (LT) determinados por métodos gravimétricos em músculos das amostras de enchovas e tainhas, coletados durante o desenvolvimento do trabalho (2000-2001).

Os resultados expressos na Tabela 1 concordam com Ogawa e Maia¹⁰ no que diz respeito à soma dos teores de umidade e lipídios. Os níveis de lipídios encontrados nas enchovas está conforme Contreras-Guzmán⁴, pois segundo o autor, “a enchova apresenta de 9,6 a 16% de gordura, estando

ela localizada na parte ventral e a soma U + LT permanecendo relativamente constante”.

Os coeficientes de variação para os LT foram baixos para as enchovas, 14,5% a 16,1%, o que decorre de os espécimes de pescado coletados na mesma amostragem, possuíam tamanhos similares e possivelmente não apresentavam influência das variações próprias do ciclo de vida⁹.

As tainhas não apresentaram essa regularidade, sendo seus LT de 1,7% até 11,1%, pois as amostras foram tomadas em diferentes locais de captura e épocas do ano.

2. Verificação da etapa de remoção de interferentes

Aplicando-se o procedimento de remoção de interferentes do método proposto em soluções hexânicas dos óleos extraídos de músculos de enchovas e de tainhas foram obtidos eluatos com espectros de absorção que foram comparados com o espectro do palmitato de retinila padrão submetido às mesmas condições.

A observação dos espectros da Figura 1 ilustra o que levou a considerar o procedimento de partição em colunas de alumina proposto (item 3) como satisfatório. Observa-se no palmitato de retinila uma banda larga de absorção entre 320 e 330nm, sendo possível observar o mesmo comportamento no espectro do extrato hexânico purificado do óleo de enchova, embora ambos difiram nas regiões de comprimentos de onda menores que 300 nm.

Tendo em vista que a espectroscopia de ultravioleta/visível não é conclusiva, principalmente na região de maior absorção do composto em estudo, foram adotados outros procedimentos que corroborassem com esta observação.

Um deles consistiu em submeter uma solução de padrão puro e soluções de extratos lipídicos de enchova e tainha puros e respectivamente acrescidos com palmitato de retinila, em concentrações conhecidas, ao procedimento de limpeza adotado. Os resultados médios de seis repetições mostraram que 99% (CV = 2%) do palmitato de retinila foram eluidos, quando estava puro. Nos extratos hexânicos de amostras em que se adicionou padrão foi observado um aumento de absorção, esperado em função dos níveis adicionados de padrão, que em média corresponderam a 95% (CV=3%).

A remoção dos interferentes dos extratos hexânicos de enchova foi estimada a partir da quantificação de retinol sem passa-los pelas colunas cromatográficas de limpeza. Foi observada uma diferença na absorção que correspondeu a uma remoção média de 81% (CV = 5%), dos interferentes.

A observação de todos estes dados indicaram que a eluição do palmitato de retinila (PR) pela coluna cromatográfica do método proposto é praticamente de 100%. Tal resultado poderia estar mascarado pela volatilidade do solvente, o que concentraria a solução ou pela instabilidade da vitamina A que facilmente sofre oxidação, dimerização e isomerização, o que o diminuiria¹⁴. No entanto, ambos os efeitos podem ocorrer simultaneamente e se compensarem, conforme indicam os resultados.

No caso do experimento realizado com a solução de amostras com ou sem o procedimento de limpeza, a informação prestada pelo resultado é que o método de partição usado removeu mais de 80% das substâncias que interferem na absorbância do palmitato de retinila, existente no óleo de enchova, e que o eluato hexânico possivelmente contenha este composto absorvendo em 325nm com menos interferentes.

Os mesmos experimentos realizados para avaliação da remoção de interferentes na tainha sugeriram a necessidade de se adequar o volume de solvente usado para eluir a forma vitamínica a ser determinada. Considerando esta observação ao trabalhar com amostras de tainhas e as processadas termicamente foi duplicada a fase estacionária e a remoção de interferentes obtida apresentava valores médios de remoção de 80%

Tabela 1. Umidade e lipídios totais em músculos de enchovas e tainhas

Espécies	Umidade	CV	LT	CV	Umidade + LT
		(%)		(%)	(%)
Enchova	63,3	1,0	15,2	3,9	78,5
Tainha	72,3	5,6	6,5	45,3	78,8

LT = lipídios totais e CV = coeficiente de variação

Estas observações nortearam a quantificação das amostras usando a técnica das adições sucessivas, pois desta forma seria minimizado o efeito dos interferentes, ainda presentes após a limpeza realizada, nos resultados finais de quantificação de palmitato de retinila.

3. Repetibilidade

Considerando-se que se trata da quantificação de traços possuidores de instabilidade química (o palmitato de retinila sofre fotoxidação e isomerizações) e o uso de um solvente com instabilidade física (volatilidade), podem ser considerados como satisfatórios coeficientes de variação até 20%^{7,10}. Nas determinações realizadas esses coeficientes foram, inclusive, inferiores a 10%, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Repetibilidade do método proposto em diferentes amostras

Amostra	ER/100g	CV(%)
Enchova (<i>Pomatomus saltatrix</i>)	303	4,6
Tainha (<i>Mugil brasiliensis</i>)	255	7,4
Enchova assada em braseiro	214	3,9
Atum enlatado	378	4,0

ER/100g = equivalente de retinol CV = coeficiente de variação

4. Recuperação

Os procedimentos de recuperação foram realizados de acordo com o descrito no item 5 de material e métodos em amostras de enchovas. Estas foram escolhidas por terem sido amostradas num sistema mais homogêneo, ou seja num único barco pesqueiro onde possivelmente foram capturadas de cardumes que se encontravam próximos e tomando espécimes de tamanhos semelhantes para comporem a amostra analítica.

A média obtida foi de 91%, com coeficiente de variação (CV) de 4% entre os diferentes níveis de adição, quando se considera as seis determinações. Novamente vale ressaltar que por se tratar de determinações em quantidades traços estes valores podem ser considerados bons para os níveis de adição abrangendo a faixa de linearidade do método (2 a 15 $\mu\text{moles/L}$)^{7,10}. Os resultados aparecem na Tabela 3.

6. Aplicabilidade do método proposto

O método proposto e avaliado foi aplicado nas amostras mencionadas no item material e métodos e os resultados médios de seis determinações estão na Tabela 3. Nesta os valores são expressos como equivalentes de retinol por grama de óleo e por 100g de amostra, pelo fato de que os níveis podem diferir consideravelmente em pescados que apresentem conteúdos diferentes de óleo. Este tipo de apresentação também possibilita que se faça uma estimativa da porcentagem de equivalentes de retinol de uma espécie a partir do seu conteúdo de lipídios totais, sempre lembrando que estes podem ser influenciados por variáveis bióticas e abióticas^{4,9,13}.

Sikorski¹³ mostrou que nas espécies gordas como o arenque, por exemplo, foram encontradas de 333,3 a 15000 UI de vitamina A em 100g de carne. A enchova é uma espécie gorda e segundo Contreras-Guzmán⁴ podem ser encontrados de 30 a

Tabela 3. Recuperação de palmitato de retinila em amostras de enchova *in natura*

Amostra	$\mu\text{g PR/g am.}$	$\mu\text{g PR/g adicionado}$	$\mu\text{g PR/g recup.}$	% recuperação
Enchova a	2,9	-	2,7	-
Enchova b	3,3	-	3,0	-
Enchova a sp1	9,6	6,7	6,1	90
Enchova b sp1	10	6,7	6,2	93
Enchova a sp2	12,9	10,01	9,3	93
Enchova b sp2	13,3	10,01	8,4	84
Enchova a sp3	16,2	13,34	11,6	87
Enchova b sp3	16,6	13,34	12,4	93

a, b = duplicata sp = solução padrão 1,2,3 = níveis adicionados resultados médios de 6 determinações

5. Limite de Detecção

Considerando-se que o limite de detecção depende da absorvidade do analito e do equipamento empregado, adotou-se a comparação da linearidade de concentrações de soluções que apresentaram absorvâncias inferiores a 0,2 com as obtidas em valores superiores a este. Os resultados mostraram que a curva padrão usando valores entre 2 e 5 $\mu\text{moles/L}$ apresentaram um coeficiente de correlação de 0,9951 e declividade 0,0504 comparada a 0,9917 e 0,0505, respectivamente, das curvas obtidas com maiores concentrações. Tal resultado permitiu empregar o método a amostras com menores níveis de concentração de palmitato de retinila.

A estimativa mostrou que a menor quantidade de palmitato de retinila presente na amostra para ser detectada deveria estar em torno de 1 $\mu\text{g/g}$ de amostra.

1350 ER em 100g de carne. Para Ludorf e Meyer⁸, os óleos da porção comestível dos pescados gordos contêm escassas percentagens de vitaminas lipossolúveis, mas proporcionam, em termos absolutos, notáveis quantidades de vitaminas para a dieta, por ser muito elevado o seu conteúdo em gordura.

Os valores encontrados nas amostras estudadas aparecem na Tabela 4.

Em amostra de pescado industrializada (enlatado de atum), o resultado de ER pareceu elevado, principalmente se comparado com os disponíveis na literatura, em que o percentual de vitamina A em atum em conserva varia de 6,5 a 25 ER/100g^{2,5}. Isso tornou a observação do espectro de absorção desse eluato, o qual se encontra na Figura 2, importante para outras discussões.

No espectro acima foi percebido que entre 290-350nm existem dois picos de absorção, um ao redor de 300nm e o outro,

Tabela 4. Equivalentes de retinol (ER) por grama de óleo e 100g de músculo em pescados *in natura* e processados

Tipo de amostra	ER/g de óleo	ER/100g de amostra (porção comestível)
Enchova in natura	21 (CV= 4%)	303 (CV = 5%)
Enchova assada	15 (CV= 8%)	255 (CV = 7%)
Tainha in natura	24 (CV= 9%)	214 (CV = 4%)
Atum enlatado	-	378 (CV = 4%)

CV= coeficiente de variação

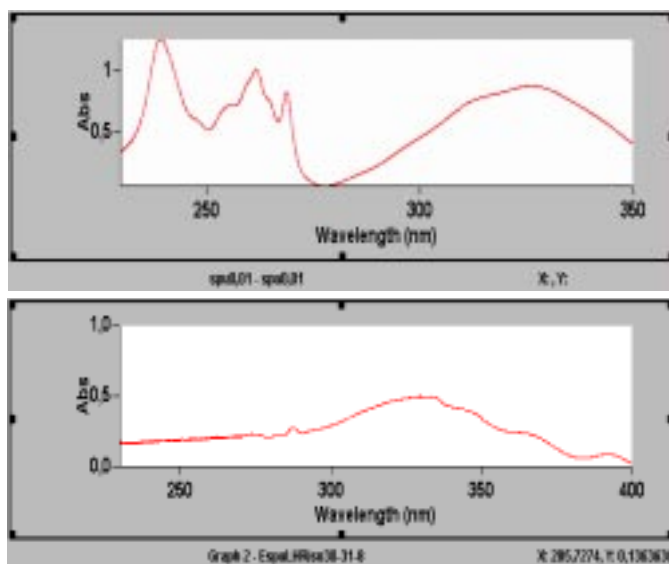


Figura 1. Espectros de absorção de soluções hexânicas de palmitato de retinila (1) e de óleo extraído de músculo de enchova após a remoção de interferentes(2)

de 315nm, esse provavelmente devido a uma das formas da vitamina A ou um produto de sua degradação, enquanto o segundo, poderia ser o do α -tocoferol, antioxidante cujo uso industrial é permitido e cuja absorbância máxima, de acordo com Parrish et al é 298nm¹⁰. Além disso os valores das absorbâncias, encontradas durante o registro do espectro destas amostras, estavam muito acima do que foi encontrado para outras empregando as mesmas massas analíticas.

Logo, a forma de vitamina A existente no atum em conserva pode não ser todo trans palmitato de retinila, e portanto não teria 100% de atividade biológica. Isso é explicável uma vez que, o processo de industrialização pode promover isomerizações e oxidações na vitamina A, além de acrescentar substâncias ao produto¹⁴. Tais resultados mostram que para determinações de palmitato de retinila em amostras de pescado processada com outras fontes de lipídios será necessário realizar adaptações no procedimento proposto para remoção dos interferentes.

Em enchova assada foi verificada a necessidade de utilização de uma coluna com dimensões duplicadas para a remoção dos interferentes. O resultado, quanto ao percentual

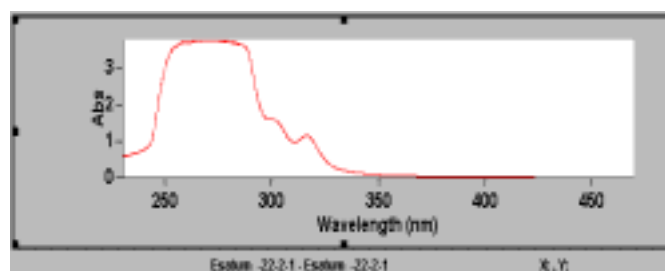


Figura 2. Espectro de absorção do eluato hexânico da amostra de atum industrializado removidos os interferentes pelo método proposto.

de óleo (de 17 a 19%), pareceu coerente uma vez que o mesmo sofreu pequeno acréscimo em termos quantitativos pois a massa total diminuiu pela perda de água devido ao processamento, ocasionando um aumento no percentual lipídico.

Comparações com dados de literatura mostraram que os valores determinados encontram-se nas faixas esperadas, porém tendo em vista o fato que especificamente determinações nas espécies em que se realizou o estudo não estão disponíveis, considerou-se mais adequado comparar os resultados obtidos com metodologia adaptada em um lote de amostras de enchova com os obtidos nas mesmas pelo método de Carr Price¹.

O resultado médio de três repetições com o método de Carr Price foi de 8,5 ER/g de óleo extraído de músculo do pescado, com um CV de 13%. Enquanto que usando o método proposto o resultado médio foi de 19,1 ER/g desse óleo com um CV de 4%, ou seja, 2,25 vezes superior ao obtido pelo método oficial.

O teste de recuperação, empregando extratos hexânicos purificados com o procedimento proposto, mostrou uma recuperação média de 75% (CV = 13%) para os mesmos níveis de palmitato de retinila da Tabela 3. Quando o método oficial foi testado adicionando os padrões nas amostras de músculo de enchova a recuperação média foi de 57% (CV = 16%).

No caso o menor valor era esperado se considerarmos a instabilidade do complexo colorido do analito com o tricloreto de antimônio, demonstrado pela recuperação após a limpeza dos extratos pelo método proposto e o efeito da temperatura de saponificação, demonstrado quando se adicionou padrões às amostras, antes de extração e eliminação de interferentes pelo método oficial. Estas observações indicam o que vem sendo mencionado, que o método oficial pode subestimar os níveis de palmitato de retinila presentes em amostras de pescado. As

diferenças observadas entre os resultados dos dois métodos mostraram que não seria necessário recorrer a testes estatísticos de significância.

CONCLUSÕES

A remoção de interferentes, no método alternativo proposto, foi realizada por uma técnica cromatográfica de partição em coluna, que substituiu a saponificação, rotineiramente utilizada para esse fim, e mostrou-se capaz de atingir esse objetivo, sendo isso demonstrado pelos experimentos nos quais 80% dos interferentes da determinação foram removidos quando o método foi testado em pescado “in natura”.

O indicativo de exatidão do método foi demonstrado pela recuperação média dos três níveis de adição 91%; a precisão indicada pela repetibilidade caracterizou-se por coeficientes de variação inferiores a 10% e pela possibilidade de detectar até 1 µg de palmitato de retinila/ grama de amostra.

A comparação com o método oficial, Carr Price, mostrou que a eliminação das etapas de saponificação e de derivação colorimétrica resultavam numa diferença superior a 20%, nas etapas de extração e quantificação, nos níveis de recuperação e em valores quantificados cerca de 2,5 vezes superiores de palmitato de retinila.

A determinação de palmitato de retinila pelo método proposto mostrou que as amostras de enchova possuíam valores de 19 a 21 ER/g de óleo (280 a 334 ER/100g de músculo) quando *in natura* e de 15 a 20 ER/g de óleo (255 a 374 ER/100g de enchova) quando assada, enquanto que o músculo cru de tainha apresentava de 22 a 25 ER/g de óleo (170 a 213 ER/100g de músculo). Para o atum enlatado os resultados não foram considerados confiáveis.

A simplicidade do método adaptado, os seus indicadores de precisão e exatidão mostram que o objetivo de disponibilizar procedimento confiável para possibilitar o melhor conhecimento dos alimentos consumidos pela população foi atingido com as adaptações realizadas.

RIALA6/951

Lankhe, N. G.; Magagnin, G. e Furlong, E. B - Vitamin A determination in fish: methodology adaptation.
Rev. Inst. Adolfo Lutz, 62(3): 151 - 158, 2003.

ABSTRACT. The aim of this study was the extraction and determination of Vitamin A in fish muscle by a simple and reliable method. The adapted methodology consisted of spectrophotometric determination of retinil palmitate in fish muscle, by using Bligh and Dyer³ method. To cleaned up the fish muscle extactact it was used a neutral alumina minicolumn and the determination of vitamin A was at 325 nm. The coefficient of variation ranged from 4 to 7% and recovery was 91%. It was higher when compared to the obtained on Carr Price's colorimetric method, 57 and 75%. The methodology was applied to determine vitamin A in fish samples “in natura”, industrialized and heat processed (baked), maintaining their characteristics of accuracy and precision, exception when sample was canned tuna. Edible parts of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) and mullet (*Mugil brasiliensis*) *in natura* resulted in 303 RE/100g (VC= 5%) and 214 RE/100g (VC=7%) respectively. In the processed products – baked bluefish 255 ER/100g (VC= 4).

KEY WORDS. retinil palmitate, vitamin A, fish

REFERÊNCIAS

1. Association of Analytical Chemists Society. **Official Methods of Analysis of A.O.A.C.**, 15. ed., 1995.
2. Anderson, L. et. al. **Nutrição**. 17. ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.
3. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, **Can. J. of Biochem. and Phys.**, 37(8): 911 – 917, 1959.
4. Contreras-Guzmán, E. S. **Bioquímica de pescados e derivados**, Jaboticabal : FUNEP, 1994.
5. Franco, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. 9. ed., São Paulo – Rio de Janeiro – Belo Horizonte: Atheneu, 1997.
6. Hole, S; Hole, M.; Taylor, K.D. Methods of Extraction Composition and Stability of Vitamin A and Other Components in Dogfish (*Squalus acanthias*) Liver Oil, **Food Chemistry**, 55 (3): 215 – 220, 1996.
7. Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyer, K.W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **J Assoc. Off.**

- Anal. Chem.** 63 : 1344-1355, 1980.
8. Ludorff W.; Meyer, V. **El Pescado y los Productos de la Pesca**, Zaragoza(España): Acribia, 1988.
 9. Ogawa, M.; Maia, E.L. **Manual de Pesca. Ciência e Tecnologia do Pescado**. vol. 1, São Paulo: Varela, 1999.
 10. Parrish, D. R. et al. Vitamin A. In: Augustin, J. et al; **Methods of Vitamin Assay**. 4th ed.; New York: John Wiley & Sons, 1985, Chap. 7, p. 153-184.
 11. Reguly, J.C. **Introdução à analítica e à tecnologia dos carboidratos, lipídios, proteínas e enzimas**. Rio Grande do Sul: Editora da FURG, 1983.
 12. Santana, D. M. N. **Determinação de palmitato de retinil, retinol e β -caroteno em margarina vegetal, manteiga e leite por cromatografia líquida de alta eficiência**, Campinas: Faculdade de Engenharia dos Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1993. 125 p. [Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos].
 13. Sikorski, Z. E. **Tecnologia dos produtos do mar: recursos, composição nutritiva e conservação**, Zaragoza: Acribia, p. 130, 1994.
 14. Wong, D. W. S. **Química dos alimentos: mecanismos e teoria**, Zaragoza Acribia, 1995.

Recebido em 23/04/2002; Aprovado em 12/11/2003