

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

RODRIGO ALBERT BARACHO RÜEGG

**ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE RETINOL EM FÍGADOS DE GALINHAS
SUBMETIDOS A DIFERENTES PROCESSAMENTOS TÉRMICOS**

NATAL/RN

2016

RODRIGO ALBERT BARACHO RÜEGG

ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE RETINOL EM FÍGADOS DE GALINHAS
SUBMETIDOS A DIFERENTES PROCESSAMENTOS TÉRMICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Dimenstein
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Héryka Myrna
Maia Ramalho

NATAL-RN

2016

Catálogo da Publicação na Fonte
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Sistema de Bibliotecas
Biblioteca Central Zila Mamede / Setor de Informação e Referência

Rüegg, Rodrigo Albert Baracho.

Análise da Concentração de Retinol em Fígados de Galinhas Submetidos a Diferentes Processamentos Térmicos / Rodrigo Albert Baracho Rüegg. - 2016.

101 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro e Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Natal, RN, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Dimenstein.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Héryka Myrna Maia Ramalho.

1. Vitamina A - Dissertação 2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) - Dissertação. 3. Frango (Fígado) - Dissertação. 4. Frango (Cocção) - Dissertação. 5. Frango (Congelamento) - Dissertação. I. Dimenstein, Roberto. II. Ramalho, Héryka Myrna Maia. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 577.161.1

RODRIGO ALBERT BARACHO RÜEGG

ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE RETINOL EM FÍGADOS DE GALINHAS
SUBMETIDOS A DIFERENTES PROCESSAMENTOS TÉRMICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito à
obtenção do título de Mestre em Nutrição.

APROVADA EM _____ de _____ de _____

Prof^a. Dr^a. Lucia de Fátima Campos Pedrosa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Dimenstein
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientador

1^o Examinador: Prof^a. Dr^a. Karla Danielly da Silva Ribeiro Rodrigues
Departamento de Nutrição - UFRN

2^o Examinador: Prof^a. Dr^a. Héryka Myrna Maia Ramalho
Universidade Potiguar - UNP

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo, pelas bênçãos, por me dar o prazer de viver, de me dar forças para me levantar e continuar a cada projeto que não deu certo, e pelo sucesso em realizar mais um objetivo na minha vida;

À minha mãe, Grácia Maria, pelo amor, conselhos, carinho, por incentivar e por acreditar em mim em todos os passos que tomei ao longo de minha vida;

À minha vó, Reny Nepomuceno, pelo incentivo, amor e ajuda. E aos meus demais familiares por sempre estarem do meu lado quando preciso;

À minha namorada, Aline Freire, que vivenciou meus momentos de alegrias e tristezas desde o começo, sempre com apoio, amor e paciência em todos os momentos.

Ao meu orientador, Roberto Dimenstein, pela confiança, apoio, ensinamentos transmitidos, amizade e conversas durante esse projeto;

Às alunas pós-graduandas Mayara Lima, Larissa Lira, Karla Danielly, Juliana Dametto, Cristiane Gurgel, Raphaela Falcão pela amizade que foi formada dentro do LABAN, pela ajuda e companheirismo nas atividades cotidianas;

Aos alunos de Iniciação Científica, Eduardo Paixão e Amanda Fernandes, pela colaboração, respeito, ajuda e companheirismo nesse projeto;

À Gustavo Prudencio, secretário administrativo do PPGNUT, pela ajuda nas mais diversas burocracias;

À minha turma de mestrado, a primeira do RN, pelas alegrias e companheirismo;

À FAPERN, CAPES e PPG pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

Complications arose, ensued, were overcome.

Captain Jack Sparrow.

RESUMO

No Brasil a produção e o consumo de miúdos estão em desenvolvimento, em especial o fígado, que é fonte de nutrientes, considerado uma rica fonte de vitamina A. Essa vitamina é um micronutriente que desempenha papel essencial na visão, no crescimento, no desenvolvimento e na manutenção do tecido epitelial, em processos imunológicos e na reprodução. Por ser um alimento de fácil aquisição e de baixo valor comercial, o fígado de galinha é uma aposta para o combate a deficiência de vitamina A (DVA), que acomete principalmente crianças e gestantes de países emergentes. O presente estudo teve como objetivo analisar a concentração de retinol, através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em fígados de galinhas de granjas, orgânicos e caipiras, em diferentes condições de descongelamento e cocção, comercializados na cidade de Natal/RN. Além disso, esse estudo objetivou validar uma adaptação na metodologia proposta por Hosotani & Kitawaga (2003) para a análise de retinol neste alimento de modo que o método de análise se tornasse simples, rápido e barato. Os valores das médias de retinol em fígado de galinha de granja para as três marcas analisadas, foram: $9152,9 \pm 719$; $4673,1 \pm 389$; $5943,6 \pm 614 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ($p < 0,05$). A média de retinol em fígado de galinha orgânica foi $3401,33 \pm 597,12 \mu\text{g}/100 \text{ g}$. A média de retinol em fígado de galinha caipira foi de $30094,79 \pm 4628,75 \mu\text{g}/100 \text{ g}$. Foi observado que o assamento em forno por 35 minutos a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e o processo de descongelamento por um minuto em microondas ocasionaram perdas significativas de $39,9 \%$ ($p < 0,05$) e de $26,2 \%$ ($p < 0,01$), respectivamente, na concentração de retinol no fígado de galinha de granja. A validação do método resultou em uma técnica com uma rápida extração e determinação e quantificação precisa de retinol em amostras de fígado de galinha, com tempo de retenção médio de 5.2 minutos a $23 \text{ }^\circ\text{C}$, com ótimos resultados de linearidade ($R = 0,9999$), estabilidade do padrão-estoque e do processo congelamento-descongelamento, precisão com coeficiente de variação abaixo de 15% e recuperação com valores de 93% a $101,2 \%$. Apesar das perdas significativas nos processos térmicos, o consumo de uma porção média de fígado assado (88 g) supre a necessidade diária de vitamina A de um homem acima de 14 anos em até 6 vezes e de até 20 vezes as necessidades diárias de crianças de 1 a 3 anos. O estudo mostrou uma diferença significativa entre marcas de fígados de granja assim

como em fígados de galinha caipira e orgânico, e uma perda significativa no conteúdo de retinol nos fígados de galinha quando submetido a processamentos térmicos. O método validado é apto e seguro para análise de retinol nesse tipo de alimento.

Palavras-Chave: CLAE, vitamina a, alimento, frango, cocção, congelamento.

ABSTRACT

In Brazil, the production and consumption of giblets are under development, in particular the liver, which is the source of nutrients considered to be a rich source of vitamin A. This vitamin is a micronutrient that plays an essential role in vision, growth, development and maintenance of the epithelial tissue, and in immunological processes in reproduction. Being a food easy acquisition and low commercial value, the chicken liver is a bet to combat vitamin A deficiency (VAD), which affects mainly children and pregnant women in developing countries. This study aimed to analyze the concentration of retinol by high performance liquid chromatography (HPLC) in livers of farms of chickens, organic and hillbillies in different conditions of thawing and cooking, marketed in the city of Natal/RN. In addition, this study aimed to validate an adaptation of the methodology proposed by Hosotani & Kitawaga (2003) for retinol analysis in this food so that the method of analysis become simple, fast and cheap. The mean values of retinol in farm chicken liver for the three brands analyzed were: $9152,9 \pm 719$; $4673,1 \pm 389$; $5943,6 \pm 614$ mg/100 g ($p < 0,05$). The average retinol organic chicken liver was $3401,33 \pm 597,12$ g / 100 g. The average retinol in hillbilly chicken liver was $30094.79 \pm 4628,75$ g/100 g. It was observed that the baking oven for 35 minutes at 200°C and thawing process in microwave for one minute caused a significant loss of 39,9 % ($p < 0,05$) and 26,2 % ($p < 0,01$), respectively, the retinol concentration in farm chicken liver. The method validation technique resulted in a rapid extraction and determination and quantification need retinol in chicken liver samples, with an average retention time of 5,2 minutes at 23°C , with excellent results linearity ($R = 0,9999$) standard stock stability and freeze-thaw process accurately coefficient of variation below 15% and recovery with values of 93 % to 101,2 %. Despite significant losses in thermal processes, consumption of an average serving of roasted liver (88 g) supplies the daily requirement of vitamin A for a man over 14 years up to 6 times and 20 times the daily needs of children 1 to 3 years. The study showed a significant difference between farm livers brands as well as free-range and organic chicken livers, and a significant loss in the retinol content in chicken livers when subjected to thermal processing. The validated method is suitable and safe for retinol analysis in this type of food.

Keywords: HPLC, vitamin a, food, chicken, cooking, freezing.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a.C.	Antes de Cristo
ANOVA	Análise de variância
CV	Coeficiente de Variação
cm	Centímetro(s)
dL	Decilitro(s)
DVA	Deficiência de Vitamina A
eV	Elétron-volt
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração Federal de Alimentos e Medicamentos)
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i> (Serviço de Inspeção e Segurança de Alimentos)
g	Gramas(s)
GHz	Gigahertz
HPLC	<i>High-performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
kg	Kilograma(s)
KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litro(s)
LABAN	Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição
mg	Miligrama(s)
MHz	Megahertz
mL	Mililitro(s)
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma(s)
nm	Nanômetro(s)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNDS	Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher

RAE	<i>Retinol Activity Equivalent</i> (Atividade equivalente de Retinol)
RDA	<i>Recommended Dietary Allowance</i> (Ingestão Diária Recomendada)
RN	Rio Grande do Norte
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
UI	Unidade Internacional
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
°C	Graus Celsius
°F	Graus Fahrenheit

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	15
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1 VITAMINA A.....	18
4.2 ESTRUTURA QUÍMICA, FUNÇÃO E METABOLISMO	18
4.3 RECOMENDAÇÕES E REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS	20
4.4 TERATOGENICIDADE	22
4.5 DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A (DVA).....	23
4.6 GALINHA ORGÂNICA E CAIPIRA.....	26
4.7 EFEITO DO PROCESSAMENTO NA CONCENTRAÇÃO DE VITAMINAS.....	27
5. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	29
5.1 AMOSTRA	29
5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO.....	29
5.2.1 Em diferentes marcas	29
5.2.2 Em diferentes métodos de preparo.....	30
5.2.3 Em diferentes tempos de congelamento seguido de descongelamento a temperatura ambiente	31
5.2.4 Em diferentes métodos de descongelamento.....	31
5.2.5 Em galinha orgânica.....	32

5.2.6	Em galinha caipira	32
5.3	ANÁLISE DO RETINOL	33
5.3.1	Extração de retinol do fígado	33
5.3.2	Condições cromatográficas.....	35
5.3.3	Preparo do padrão de retinol.....	37
5.4	MODIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	38
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6.	ARTIGOS PRODUZIDOS	39
6.1	ARTIGO 1	39
6.2	ARTIGO 2	63
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
	REFERÊNCIAS.....	85
	APÊNDICES	95

1. INTRODUÇÃO

A galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) está classificada na ordem galiforme e na família *phasianidae*. Sua origem veio da descendência de mudanças genéticas de uma ave silvestre - a galinha Vermelha do Mato (Red Jungle Fowl – *Gallus gallus*), sendo domesticada, primeiramente, pela população do Sudeste da Ásia, com relatos de períodos anteriores a 5400 a.C.¹⁻³ e com a difusão de sua raça para outros países, como o Japão, Irã, Índia, que utilizavam as galinhas para o uso de adornos (penas nas roupas), religião e esporte/lazer (briga de galo). Foi na Grécia onde começou a ser utilizada como alimento e em seguida sendo disseminada na própria Europa e em outros continentes como a África⁴⁻⁶.

No Brasil, com a chegada dos portugueses em 1500, Pedro Álvares Cabral trouxe os primeiros exemplares de raças puras, orientais, mediterrâneas e do sul da Europa, as quais foram domesticadas tanto pelos portugueses que vieram a nova terra quanto pelos índios nativos^{7,8}.

O desenvolvimento da avicultura no Brasil se deu na região sudeste do Brasil, onde primeiramente se cultivava galinhas para concursos de melhor penugem⁹. Após a Segunda Guerra Mundial, com a escassez alimentar foi que se procurou alimentos alternativos para a carne bovina. Assim, as aves passaram a ser criadas em áreas de pastos e grandes galpões com o objetivo de produzir carne e ovo. Concomitantemente, os avicultores começaram a importar linhagens híbridas originadas dos Estados Unidos que produziam mais e eram mais resistentes. Com isso, após os anos 60, os granjeiros da região sul do país já desenvolviam atividades independentes com criação e locais para o abate da ave^{10,11}.

Desde então, a avicultura busca novos mercados para seus produtos processados, cortes e miúdos⁹. Atualmente, o Brasil ocupa uma posição respeitada na produção de carne de frango, ocupando o primeiro lugar na produção e terceiro no consumo de carne de frango¹².

Esse valor agregado a produtos provindos da avicultura não está somente vinculado à elaboração de novos produtos, mas também a qualidade

intrínseca do alimento. O investimento de qualidade é considerado o principal diferencial de um produto. O tipo de conservação utilizado define o tempo de vida útil ou de conservação do produto de modo que o alimento conserve seu valor nutritivo, sensorial e seja seguro a sua ingestão¹³.

O fígado destes animais são considerados uma importante fonte de nutrientes, rico em proteínas, ferro e vitamina A^{14,15}.

A vitamina A foi a primeira vitamina lipossolúvel a ser descoberta em 1913 por dois grupos distintos de pesquisadores^{16,17}. É um termo genérico para se referir a um micronutriente que está efetivamente relacionado a três compostos pré-ativos: o retinol, o retinal e o ácido retinoico. Esses compostos são comumente encontrados em produtos de origem animal, se apresentando na forma de ésteres – o retinol estocado, geralmente, está ligado a um ácido graxo, como o palmitato, formando o retinil palmitato, que por sua vez ligam-se as proteínas dos alimentos, formando assim a forma ativa da vitamina A. Os alimentos de origem vegetal apresentam em sua composição um grupo de provitaminas conhecidas como carotenoides, compostos bioativos, não sintetizados pelo organismo humano e considerados precursores da vitamina A^{18,19}.

As necessidades de vitamina A para diferentes estágios de vida e sexo estão relacionadas com as quantidades de estoque, são preconizadas pelo Instituto de Medicina (IOM) e são representadas em atividade equivalente de retinol (RAE)^{20,21}.

Ressalta-se o cuidado com a ingestão em grandes quantidades que ultrapassem o limite diário podendo, dessa forma, causar intoxicação. Por mais rara que sejam os casos de hipervitaminose A em decorrência do consumo alimentar encontradas na literatura²², Chagas *et al.*¹⁸ relatam que gestantes com aportes adequados de vitamina A não devem receber uma suplementação diária superior a 8000 UI (2400 µg de RAE) com o risco de afetar o desenvolvimento do embrião até o fim da gestação. O estado nutricional da gestante é determinante para o estado nutricional dos recém-nascidos, principalmente em referência a proteção contra a deficiência de vitamina A²⁰.

Assim como o excesso da ingestão de vitamina A pode ser nocivo, a deficiência de vitamina A (DVA) também preocupa e é considerada uma das mais importantes deficiências nutricionais nos países emergentes causando problemas de saúde de graves proporções, principalmente no estado nutricional de crianças, jovens, adultos e idosos^{23,24}. A DVA não acontece imediatamente quando existe déficit na ingestão alimentar, mas sim quando os estoques corporais estão escassos²⁵. Nesta situação ocorrem alterações na visão, inicialmente com a cegueira noturna, levando a possíveis quadros de xeroftalmia e ceratomalácia. Quando não tratados tornam-se irreversíveis, com perda da visão. Ademais a vitamina está relacionada diretamente com a proteção epitelial, evitando quadros de hiperqueratose folicular – lesão na pele - e com o sistema imunológico²⁶⁻²⁸. As deficiências de vitamina A, ferro e iodo são responsáveis por englobar 2 bilhões de pessoas no mundo²⁹, afetando cerca de 40 % da população mundial, sendo a maioria crianças, gestantes e lactantes³⁰.

A DVA é muito comum em gestantes que vivem em países em desenvolvimento, devido a sua alta demanda de vitamina A. Aproximadamente 600 mil mulheres morrem em complicações de partos que poderia ser evitado através de um melhor acompanhamento nutricional, incluindo o aporte de vitamina A³¹.

A Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS)³², em 2006, relatou dados de prevalência nacionais de deficiência de vitamina A entre crianças menores do que 5 anos e mulheres entre 15 a 49 anos, onde 17,4 % das crianças e 12,3% das mulheres apresentaram níveis inadequados de vitamina A, sendo os maiores índices em crianças na região Sudeste (21,6 %) e Nordeste (19 %).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde, o Brasil se encontra em uma grave situação no que se diz a respeito à carência de vitamina A, segundo dados de indicadores subclínicos³³.

2. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A DVA é uma doença carencial que ainda é um problema mundial, principalmente em países emergentes nos quais o baixo nível socioeconômico está intimamente ligado ao seu diagnóstico. A carência de micronutrientes é conhecida como fome oculta. O Brasil se destaca em casos de DVA em crianças, gestantes e lactantes na região Nordeste e em algumas regiões do Sudeste devido a moradia em condições pouco satisfatória e o inadequado hábito alimentar de caráter tanto qualitativo quanto quantitativo²⁴.

A obtenção de dados sobre o consumo e a composição de alimentos regionais tem sido encorajada com o objetivo de agregar informações novas, atualizadas e representativas, garantindo segurança alimentar e nutricional. Dados sobre composição de alimentos são importantes para imensuráveis atividades como: avaliação do abastecimento e do consumo alimentar de um país, averiguação da adequação nutricional da dieta individual e de populações, avaliação do estado nutricional, o desenvolvimento de pesquisas sobre as associações entre dieta e doença, para orientações nutricionais, para a indústria no desenvolvimento de novos produtos, rotulagem nutricional de produtos, além de outras finalidades^{34,35}.

Atualmente o Brasil se destaca na produção de aves como frangos/galinhas⁹; conseqüentemente há uma grande disponibilidade de fígado destas aves no mercado. O fígado de galinha aparece como alternativa para o enfrentamento no combate a DVA, sendo um alimento de baixo custo, acesso fácil e seguro, sendo uma opção acessível, devido a seu alto teor de vitamina A. Entretanto, dados sobre sua real composição são confusas devido a resultados divergentes encontrados na literatura³⁵⁻⁴².

Além do mais, esses dados divergem quando o alimento é submetido a processamentos térmicos. Sabe-se que as mudanças químicas e físicas ocasionadas por diferentes métodos de cocção e descongelamento podem alterar o valor nutricional do alimento, e são influenciadas por fatores diversos como a forma de transferência de calor, a intensidade da temperatura, o tempo, a duração do processo e o meio de cocção utilizados⁴³.

O presente estudo trará a contribuição de novos dados quantitativos bioquímicos do fígado de galinha de granja cru, submetidos a diferentes métodos de cocção e descongelamento, assim como o fígado de galinhas orgânicas e caipira, podendo assim ser inserido nas tabelas de composição de alimentos, contribuindo nas ações de orientação e prescrição dietética baseadas em princípios desenvolvimentistas locais e na diversificação na busca de evitar dietas fatigantes e desequilibradas.

Na literatura, encontram-se também diversos métodos cromatográficos para a análise da vitamina A. A maioria deles apresentam técnicas de extração e quantificação que diferem entre si, ocasionando um aumento no tempo e no custo da metodologia. O presente trabalho objetivou fazer alterações e validar um método analítico utilizando HPLC, de modo que esse método resultasse em uma técnica precisa, rápida e de baixo custo.

No mais, o estudo analisará e quantificará o conteúdo de retinol no fígado de galinha de granja, caipira e orgânico relacionando com as necessidades diárias de indivíduos. Espera-se também que tais informações contribuam para alavancar e promover maiores ações de políticas públicas ao combate da DVA, como ações planejadas da atenção nutricional e das ações relacionadas à promoção da saúde e da alimentação adequada e saudável, a partir da identificação do problema, com o propósito de sugerir medidas de intervenção essenciais para o combate da carência nutricional.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a concentração de retinol em fígados de galinhas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar e validar um método analítico para determinação de retinol em fígado de galinha;
- Verificar a concentração de retinol em fígado de galinha após diferentes processos de descongelamento e de cocção;
- Avaliar a concentração de retinol em fígado de galinha adquiridos em supermercados de Natal e sua definição de alimento fonte.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 VITAMINA A

A vitamina A foi a primeira vitamina lipossolúvel a ser descoberta em 1913 por dois grupos distintos de pesquisadores^{17,44}. É um termo genérico para se referir a um micronutriente que está efetivamente relacionado a três compostos pré-ativos: o retinol, o retinal e o ácido retinóico, sendo esses compostos um subgrupo que possuem atividade biológica do *all-trans*-retinol. Esses compostos são comumente encontrados em produtos de origem animal, como o fígado, leite, ovos, óleo de peixe, entre outros, se apresentando na forma de ésteres – o retinol estocado, geralmente, está ligado a um ácido graxo, como o palmitato, formando o retinil palmitato, que por sua vez ligam-se as proteínas dos alimentos, formando assim a forma ativa da Vitamina A. Os alimentos de origem vegetal apresentam em sua composição um grupo de provitaminas conhecidas como carotenoides, compostos bioativos, não sintetizados pelo organismo humano, precursores da vitamina A^{19,45,46}.

Dos 600 carotenoides já descobertos na natureza, exclusivamente 30 a 40 estão disponíveis na alimentação humana⁴⁷. Frutas, legumes e verduras são as principais fontes de alimentos que possuem carotenoides⁴⁸ sendo sua presença caracterizada pelas cores amarelo, laranja e vermelho. Todavia, menos de 10 % são fontes potenciais de vitamina A⁴⁹. Alfacaroteno, betacaroteno, betacriptoxantina, luteína e zeaxantina são os principais carotenoides encontrados nos alimentos de origem vegetal⁵⁰.

4.2 ESTRUTURA QUÍMICA, FUNÇÃO E METABOLISMO

O retinol é um álcool de natureza isoprenóide, lipossolúvel, insaturado e tem um peso molecular de 286.5 kDa. Tipicamente, os retinóides possuem quatro unidades isoprenóides unidas e cinco duplas-ligações carbono-carbono^{45,46}.

A estrutura química das principais formas da vitamina A estão apresentadas na Figura 1.

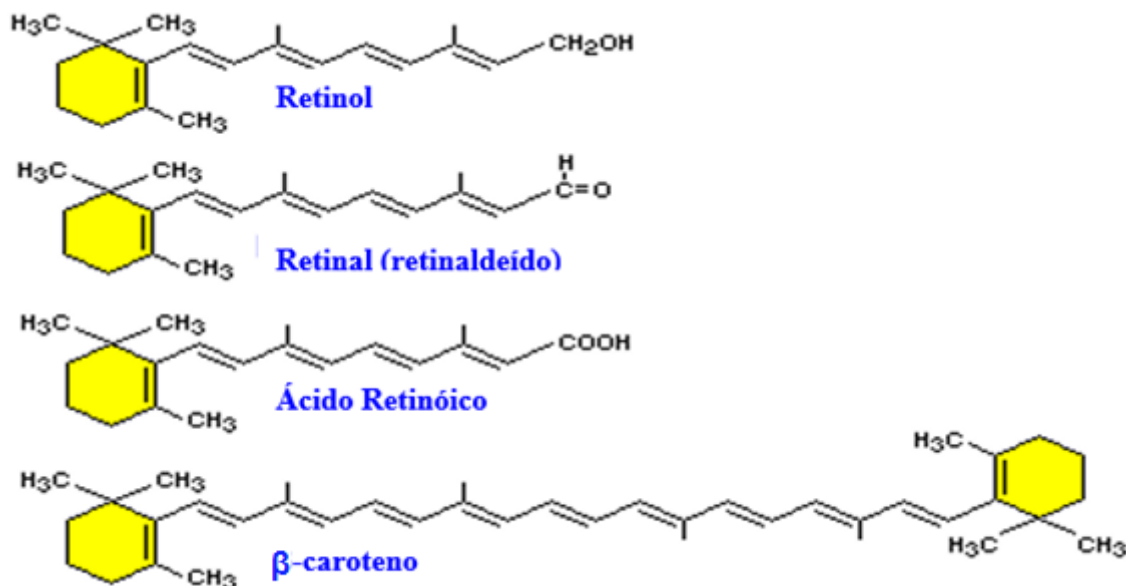


Figura 1. Vitamina A e suas principais formas estruturais químicas.

Fonte: http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/misc_topics/vitamina.gif

A vitamina A é insolúvel em soluções aquosas e solúvel em solventes orgânicos. Em presença de luz, oxigênio e metais reativos a vitamina A é sensível podendo ser oxidada sofrendo isomerização. É instável ao calor e em meio ácido, sendo estável em meio básico^{46,51}.

O retinol é fundamental aos animais, participando de uma gama de atividades biológicas: participa no metabolismo geral de gorduras e proteínas; na função visual, na diferenciação celular, no funcionamento correto dos tecidos epiteliais (pele, mucosa e endotélio); no crescimento normal de estruturas ósseas e dos dentes durante o desenvolvimento; ajuda na função imunológica; previne câncer e reduz as possíveis chances de anemia, diminuiu a mortalidade materna e previne doenças crônicas, sendo essencial durante o desenvolvimento e na manutenção da integridade do organismo humano⁵². A vitamina A também é necessária para a metabolização do ácido fólico, piridoxina e niacina⁵³.

A classificação dos alimentos fontes em vitamina A são: “muito ricas” com teor acima de 1000 µg/RAE a cada 100 g do produto; “ricas” com teor

entre 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{RAE}$ a cada 100 g do produto; “medianas” com teor entre 100 e 500 $\mu\text{g}/\text{RAE}$ a cada 100 g do produto; e “com baixos teores” para aqueles alimentos com teores menores que 100 $\mu\text{g}/\text{RAE}$ a cada 100 g do produto⁵⁴.

Tanto a biodisponibilidade quanto a digestão da vitamina A são afetadas pelo estado nutricional do indivíduo e também pela boa função das microvilosidades do intestino. Quando o organismo necessita recorrer a formação de vitamina A para suas atividades, é necessário a quantidade de 12 μg de betacaroteno ou 24 μg dos demais carotenoides para a produção de 1 μg de retinol⁵⁵. Alguns fatores podem interferir na bioconversão dos carotenoides em retinol, como o tipo e a quantidade de carotenoides ingeridos, presença de alimentos fontes de gorduras, ligações e interações moleculares, principalmente entre os micronutrientes ferro e zinco, estado nutricional e genética do indivíduo^{50,56,57}.

Quando o indivíduo apresenta um bom estado nutricional sabe-se que em torno de 90 % da vitamina A é estocada no fígado, outras pequenas quantidades são encontradas em outros tipos de tecidos. O retinol é carregado na forma de ésteres de retinil para as células hepáticas estreladas perisinusoidais, também conhecidas como células de Ito, que vão fazer o seu armazenamento na forma de um combinado lipídico. Essa forma adotada e estocada no fígado será disponibilizada para manter a homeostase do retinol no organismo humano entre 1 e 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$, correspondentes a 28,6 e 57,2 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$, respectivamente⁵⁸.

4.3 RECOMENDAÇÕES E REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS

Valores de referência para o consumo de nutrientes são determinados, periodicamente, e revisados. Assim, são incorporados novos conhecimentos sobre eventuais manifestações aos extremos de exposição e limites, ou seja, sinais de carência decorrentes de ingestão insuficiente, ou de toxicidade, que indicam efeitos contrários decorrentes do consumo excedente⁶⁸.

As *Dietary Reference Intakes* (DRI's) representam o conjunto de referências de ingestão de nutrientes adotadas nos países norte-americanos, determinados para uso no planejamento e avaliação de dietas para indivíduos aparentemente saudáveis⁶⁸.

A necessidade média da vitamina A para um indivíduo é definido como a quantidade necessária dessa vitamina, expressa como microgramas de atividade de retinol equivalente (μg RAE), para prevenir os sinais clínicos de deficiência, possibilitar o crescimento normal e diminuir os riscos de morbidade e mortalidade severa pertinente a vitamina A em qualquer grupo populacional²⁵. A ingestão dietética recomendada (RDA) é o nível de ingestão diária considerável para suprir os requerimentos nutricionais de 97 a 98 % dos indivíduos com bom estado de saúde, compreendidos em um determinado grupo, por gênero e estágio de vida. O limite máximo de ingestão tolerável (UL) de vitamina A é o nível mais alto de ingestão diária de vitamina A que não descreve risco de efeitos adversos a saúde em quase todos os indivíduos²¹.

A Tabela 1 mostra a ingestão dietética recomendada de retinol para todos os estágios de vida, de acordo com as DRI's, do Instituto de Medicina. O limite máximo de ingestão tolerável (UL), ou seja, o limite de consumo máximo por dia de vitamina A é de 3000 μg /dia para adultos²¹.

Idade (anos)	Recomendação diária (µg)
1 – 3	300
4 – 8	400
Mulheres > 14	700
Homens > 14	900
Grávidas 19-50	770
Lactantes 19-50	1300

Tabela 1. Ingestão dietética diária recomendada de retinol em diferentes estágios de vida.

Fonte: IOM (2001)

4.4 TERATOGENICIDADE

Pequenas quantidades da vitamina A são fundamentais para vários processos indispensáveis do organismo. No entanto, o alto consumo de vitamina A pode acarretar em efeitos tóxicos e teratogênicos⁵⁹.

No organismo humano, existem estudos mostrando a má-formação em crianças, quando as gestantes consomem doses acima de 7500 µg/dia de vitamina A durante a gravidez⁶⁰.

Em um estudo de caso, após a ingestão de uma dose oral de 150 000 µg de vitamina A durante a gestação foi relatado malformações no recém-nascido⁶¹.

A Universidade Americana de Ginecologia e Obstetrícia afirmou que existe uma relação direta entre o uso de altas quantidades de vitamina A durante a gestação e o nascimento de crianças com má formação⁶².

Para uma ingestão crônica, uma quantidade de 3000 µg de vitamina A/dia não tem apresentado ameaça de provocar anormalidades no

desenvolvimento do embrião, sendo classificada como segura^{63,64}. Assim, a Organização Mundial de Saúde recomenda que mulheres gestantes não devam ultrapassar a dose diária máxima 3000 µg de vitamina A⁶⁰.

Rothman *et al.* (1995) mostraram que quantidades iguais ou acima de 10 000 UI/dia (3000 µg) durante a gravidez podem gerar anormalidades na crista neural em humanos⁶⁵.

Estudos demonstram que o ácido retinóico e seus metabólitos são formas de vitamina A que resultam em efeitos teratogênicos⁶⁶. Recomenda-se, nos primeiros 3 meses da gravidez, que evitem doses de 0.4 a 2.0 mg/kg/dia de ácido retinóico para evitar abortos espontâneos e sérios defeitos no feto, tais como malformação no cérebro, coração, artérias, face e timo. Esses defeitos provenientes do ácido retinóico estão relacionados com o seu poder de diferenciação celular⁶⁷.

Estudos sugerem, que o ácido retinóico está intimamente relacionado na organização de um modelo específico de expressão gênica. O ácido retinóico liga-se a sequências de DNA próximas a genes marcados, estabelecendo a expressão desses genes que interferem em quase todas as funções biológicas da vitamina A⁵².

4.5 DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A (DVA)

A DVA, também denominada de hipovitaminose A ou carência de vitamina A, xeroftalmia e desordens ou transtornos da DVA, é caracterizada pela inadequação do estado nutricional desse micronutriente, quando as reservas hepáticas se encontram abaixo de 20 g/g (0,07 µmol/g). Níveis séricos de retinol menor que 0,35 µmol/l caracterizam a carência grave, fortemente associada a sinais de xeroftalmia. Retinol sérico abaixo de 0,7 µmol/l caracteriza a DVA subclínica³³.

A DVA é considerada uma das mais importantes deficiências nutricionais nos países emergentes, principalmente na África, sul e sudeste da Ásia, região oeste do Pacífico e partes da América Latina e Central, causando problemas de saúde de graves proporções, principalmente no estado nutricional de

crianças, jovens, adultos e idosos^{23,24}. A deficiência contínua dessa vitamina não acontece imediatamente quando existe déficit na ingestão alimentar, mas sim quando os estoques corporais estão escassos²⁵. Na deficiência de vitamina A, a integridade das barreiras epiteliais e o sistema imune são comprometidos antes das alterações da função visual, o que caracteriza a deficiência subclínica ou marginal de vitamina A.

Depois desta situação, ocorrem alterações na visão, inicialmente com a cegueira noturna, levando a possíveis quadros de xeroftalmia e ceratomalácia. Quando não tratados tornam-se irreversíveis, com perda da visão (Figura 2).

Fonte: Instituto Helen Keller



XEROSE

Fonte: Sightandlife



MANCHA DE BITOT

Fonte: Sightandlife



MANCHA DE BITOT

Fonte: Sightandlife



CERATOMALÁCIA

Figura 2. Principais complicações da deficiência de vitamina A na função visual.

Fonte: Sightandlife & Instituto Helen Keller

Alerta-se ainda que a deficiência de vitamina A pode interferir no metabolismo de outros nutrientes, principalmente nas vitaminas do complexo B, tais como folato, cianocobalamina e piridoxina⁴⁶.

Ademais essa vitamina está relacionada diretamente com a proteção epitelial, evitando quadros de hiperqueratose folicular – lesão na pele -, queratinização das membranas mucosas que revestem o trato respiratório, urinário e reprodutivo e com o sistema imunológico, diminuindo o papel de barreira que essas membranas exercem para proteger o organismo contra infecções microbianas^{26-28,69}.

No mundo as deficiências de vitamina A, ferro e iodo são responsáveis por englobar 2 bilhões de pessoas²⁹, afetando cerca de 28 % da população mundial, sendo a maioria crianças, gestantes e lactantes. O Ministério da Saúde do Brasil (2000) reconhece que a carência de vitamina A está associada a 23 % das mortes por diarreia em crianças brasileiras³⁰.

A DVA é muito comum em gestantes que vivem em países subdesenvolvidos. Devido a alta demanda de vitamina A, aproximadamente 600 mil mulheres morrem em complicações de partos que poderia ser evitado através de um melhor acompanhamento nutricional, incluindo o aporte de vitamina A³¹.

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde, o Brasil se encontra em uma grave situação no que se diz a respeito à carência de vitamina A, segundo dados de indicadores subclínicos³³. A DVA é considerada um problema de saúde pública propagando-se em crianças em idade pré-escolar, recém-nascidos, mulheres grávidas e nutrízes, sendo relatada principalmente na região Nordeste e em algumas regiões do Sudeste, devido a estas áreas possuírem características propícias a casos dessa deficiência como a seca, a baixa classe social da população, a falta de informação sobre o que é alimentação saudável, falta de saneamento ambiental adequado, abastecimento de água deficitário e a prática de maus hábitos alimentares e tabus^{26,70}.

A carência de micronutrientes é conhecida como fome oculta. Hoje em dia o governo tenta diminuir essas taxas através do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A (PNNSA) que consiste na suplementação preventiva com megadoses de vitamina A de 100 000 UI às crianças de 6 a 11 meses e com megadoses de vitamina A de 200 000 UI às crianças de 12 a 59 meses e às puérperas.

Além disso, o governo estimula o plantio e consumo de alimentos fontes de vitamina A que sejam de baixo custo, acesso fácil e seguro para o enfrentamento em programas no combate a DVA²⁴.

4.6 GALINHA ORGÂNICA E CAIPIRA

De acordo com o artigo 2º da Lei nº 10 831/2003, entende-se por produto orgânico, seja ele in natura ou processado, aquele adquirido em sistema orgânico de produção agropecuário ou oriundo de processo extrativista sustentável e que não prejudique o ecossistema local⁷⁵.

As galinhas orgânicas não ficam presas em gaiolas, são criadas em áreas livres onde pastejam e podem expressar seu comportamento natural. Ou seja, tem relações sociais, correm, tomam sol, podem andar, ciscar, abrir as asas para se refrescarem e empoleirar. Esses animais são alimentados com uma ração especial, a partir de grãos orgânicos certificados, sem nenhum ingrediente de origem animal. Também não são adicionados antibióticos a esta alimentação⁷⁶.

Já as galinhas caipiras são aves não industriais que são criadas soltas, sem instalações e em condições nas quais o manejo, aspectos reprodutivos e sanitários não são contemplados eficientemente⁷⁷. Nesse tipo de criação, característico da agricultura familiar, os animais são alimentados com ração à base de milho, complementada com concentrados específicos, a depender da finalidade da criação. E por terem certa liberdade, consomem o que encontram disponível, como capins, sementes, insetos, minhocas, restos de culturas e colheitas. Alguns agricultores, na tentativa de melhorar a qualidade das galinhas, oferecem ainda restos de comida (verduras, legumes, arroz)⁷⁸.

4.7 EFEITO DO PROCESSAMENTO NA CONCENTRAÇÃO DE VITAMINAS

Essa preocupação em conservar o alimento originou-se desde o tempo pré-histórico quando o processamento rudimentar compreendia o abate, fermentação, dessecamento ao sol, preservação com sal e vários tipos de cozimento (como assar, cozer a vapor, defumar e mesmo grelhar), e eram feitos com o propósito de tornar um alimento seguro e estável, apesar das perdas nutricionais.

O teor de vitaminas nos alimentos é bastante variado. No caso de alimentos de origem animal, essa variante depende da raça, do local de criação, do tipo de alimentação, de variáveis durante o processamento e durante o preparo. As vitaminas no alimento *in natura* e sua estabilidade podem influenciar a qualidade nutricional do alimento processado⁷¹.

Fatores como temperatura, presença de oxigênio, luz, umidade, pH e duração do processamento podem diminuir ou até remover as vitaminas presentes no alimento. Dessa forma, qualquer processamento feito no alimento pode diminuir significativamente a quantidade presente de micronutrientes, apesar dos principais processamentos terem como objetivo o aumento da vida de prateleira e tornar o alimento mais atraente ao consumidor⁷².

O processamento com a utilização de calor é o método mais comum para aumentar a palatabilidade e a vida de prateleira dos alimentos. Para a conservação, um dos métodos mais utilizados é o congelamento, na qual a deterioração é retardada e o alimento permanece com sua qualidade nutricional por um longo tempo. O descongelamento também é uma etapa muito importante no que compreende a estabilidade do conteúdo de vitaminas e palatabilidade do alimento, já que o descongelamento envolve adição de calor latente de fusão através da camada de água congelada que podem não retornar a posição de origem nos tecidos. Além disso, um descongelamento feito incorretamente pode provocar o crescimento de microrganismos resultando em decomposição e perda de nutrientes⁷³.

A estabilidade de vitaminas diferencia-se entre os alimentos até mesmo quando estes são submetidos às condições de processamento e estocagem

iguais. Isso é devido, principalmente, à matriz de cada alimento que interage de forma dessemelhante com as vitaminas, preservando-as, e fazendo com que as consequências do processamento sejam diferentes⁷⁴.

5. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 AMOSTRA

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de três lotes de três marcas de fígados de galinhas, resfriados, dentro do prazo de validade, comercializados e adquiridos em supermercados da região metropolitana de Natal, Brasil; fígados de galinhas caipira resfriados, adquiridos de granjas do município de Nova Cruz-RN e fígados de galinhas orgânicos, congelados, dentro do prazo de validade, comercializados e adquiridos em supermercado da região metropolitana de Natal, Brasil.

5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO

5.2.1 Em diferentes marcas

Para a análise de retinol em diferentes marcas (A, B e C) pesou-se 1,0 kg de fígado de galinha de cada marca, no qual foram colocadas, separadamente, em liquidificador, modelo Arno, juntamente com 1,0 L de solução salina (NaCl) 0,9 %, resultando em aproximadamente 2 L de homogeneizado (50 %) para cada marca.

As preparações dos homogeneizados foram feitas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição (DNUT)/UFRN.

Em um tubo de Falcon, com capacidade de 15 mL, foi pesado 1,0 g do homogeneizado da marca A e esse processo foi repetido para mais 2 tubos, e repetido nas marcas B e C. Os tubos foram refrigerados, mantidos em geladeira a 3 °C até o momento da análise. O processo de preparo da amostra foi repetido em mais outros dois lotes distintos de cada marca.

Os homogeneizados de fígados de galinhas foram transportados em caixa térmica resfriada até o Laboratório da Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição, do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e submetidos a extração do retinol.

5.2.2 Em diferentes métodos de preparo

Para a análise de retinol em fígado de galinha em diferentes métodos de preparo foram adquiridos 4 kg de fígados de galinhas resfriado, da marca A, em um supermercado na cidade de Natal/RN, Brasil. Os métodos foram descritos e adaptados a partir da metodologia proposta pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)³⁵, de 2011, e descritos a seguir.

Para o fígado assado, uma amostra de 1,0 kg de fígado resfriado fresco foi colocada em assadeira antiaderente e colocado em forno, pré-aquecido a 200 °C, por 35 minutos. Após o procedimento o fígado foi colocado para resfriar.

Para o fígado cozido, em uma panela grande foi colocado 1,0 kg de fígado resfriado fresco e adicionado aproximadamente 1,0 L de água, de modo que a água cobrisse todo o fígado. Em fogo médio foi cozido por 40 minutos, em temperatura que foi de 26 °C a 100 °C. Após o procedimento a água foi retirada e o fígado colocado para resfriar.

Para o fígado frito, foi colocado em uma frigideira anti-aderente, para aquecer, uma colher de sobremesa com aproximadamente 6 mL de óleo de soja. Foram colocadas poucas unidades do fígado resfriado fresco por vez, deixando fritar por 5 minutos cada lado, atingindo temperatura de 180 °C e a cor dourada, sendo repetido o mesmo procedimento com o restante do fígado. Após o processo, o fígado foi colocado em papel absorvente e deixado esfriar.

Para o fígado resfriado fresco, foi colocado em geladeira a 3 °C até o momento da análise.

Foi retirado uma amostra de 600 g de fígado de cada processo de cocção e colocado em liquidificador, modelo Arno, juntamente com 600 mL de solução salina (NaCl) a 0,9 %, e triturado até formar uma solução homogênea, formando assim um homogeneizado de 50 %.

Para cada homogeneizado obtido de diferentes processos de cocção, 1,0 g do homogeneizado foi pesado em 3 tubos tipo Falcon, com 15 mL de capacidade, e colocado em geladeira até os procedimentos de extração do retinol.

5.2.3 Em diferentes tempos de congelamento seguido de descongelamento a temperatura ambiente

Para análise do retinol em fígado de galinha em diferentes processos de congelamento-descongelamento, 1,0 kg de fígado de galinha fresco, da marca B, foi adquirido e colocado em liquidificador, modelo Arno, juntamente com 1,0 L de solução salina (NaCl) 0,9 %, formando um homogeneizado a 50 %. A seguir foi colocado 1,0 g do homogeneizado em 9 tubos de Falcon e levados ao congelador a -18 °C e mantidos por 0, 15 e 30 dias. Os tubos foram descongelados em temperatura ambiente (23 °C) por duas horas até o momento da extração do retinol.

5.2.4 Em diferentes métodos de descongelamento

Para a análise de retinol em fígado de galinha em diferentes tipos de descongelamento, foi adquirido 1,0 kg de fígado de galinha resfriado fresco da marca B em um supermercado na cidade de Natal/Rio Grande do Norte, Brasil, e colocado em geladeira até os procedimentos a seguir.

Foi colocado 1,0 kg do fígado de galinha em liquidificador, modelo Arno, juntamente com 1,0 L de solução salina (NaCl) a 0,9 %, liquidificado até formar uma solução homogênea, formando assim um homogeneizado de 50 %.

Foi pesado 1,0 g de homogeneizado em 15 tubos de Falcon, com capacidade de 15 mL. Em seguida 12 tubos foram colocados para congelamento em freezer a -18 °C por 72 horas. Após as 72 horas, os 12 tubos foram separados em quatro grupos, de acordo com método adaptado de um estudo feito na Irlanda por chefes e gestores sobre suas práticas com descongelamentos⁷⁹, e um estudo sobre o consumo e preparação doméstica de carnes na Turquia⁸⁰: um grupo de três tubos foi deixado em geladeira para descongelamento por 8 horas, a 3 °C, outro grupo de três tubos foi deixado em bancada com temperatura ambiente (23 °C) por 2 horas, outro grupo de 3 tubos foi colocado submerso em água a 25 °C por 35 minutos e outro grupo de três tubos foi colocado em micro-ondas, modelo Brastemp, na função

descongelamento por 1.0 minuto. Os outros 3 tubos contendo o fígado fresco foram levados imediatamente para análise.

5.2.5 Em galinha orgânica

Para análise do retinol em fígado de galinha orgânico, foi adquirido em supermercado na cidade de Natal/RN 1,0 kg e colocado em liquidificador, modelo Arno, juntamente com 1,0 L de solução salina (NaCl) 0,9 %, formando um homogeneizado a 50 %. Foi pesado 1.0 g do homogeneizado em 3 tubos tipo Falcon, com 15 mL de capacidade, e colocado em geladeira até os procedimentos de extração do retinol no dia seguinte.

5.2.6 Em galinha caipira

Para a análise de retinol em fígados de galinhas caipiras foram adquiridos 6 fígados, totalizando 160 g, de diferentes sítios vinculados ao município de Nova Cruz-RN. Dentre eles citam-se o sítio Juriti, Lagoa dos Currais e Lagoa Limpa. As galinhas obtidas eram criadas livres e em grandes quintais, com uma alimentação voltada ao consumo de milho e sobras de alimentos, como arroz, feijão e macarrão, sem a adição de rações a sua dieta. Após o abatimento das galinhas, os fígados foram congelados e no dia seguinte transportados em caixa térmica refrigerada e encaminhados ao Laboratório de Alimentos do Departamento de Nutrição para a preparação do homogeneizado.

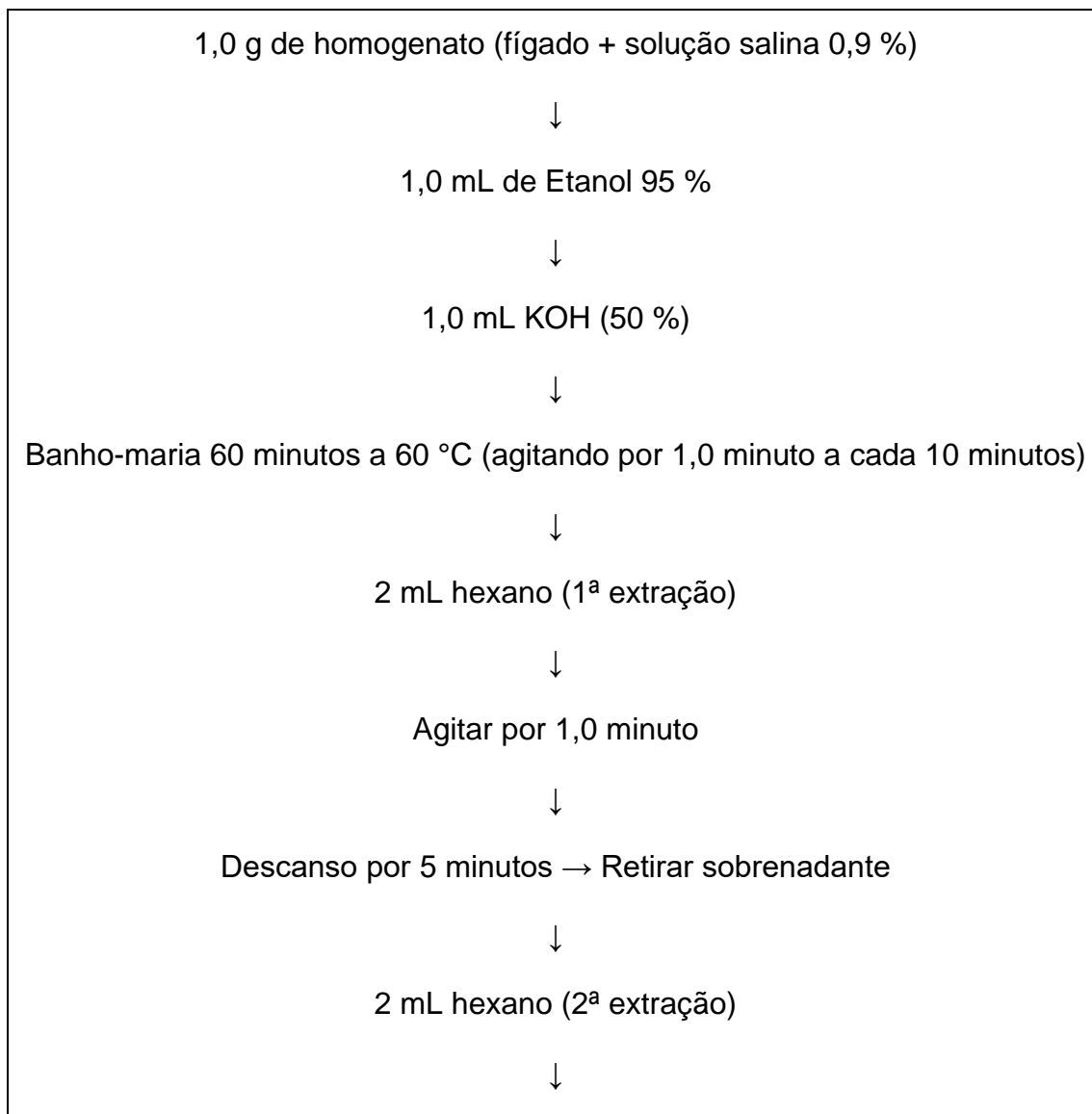
Os 160 g de fígado foram descongelados e colocados em liquidificador, modelo Arno, juntamente com 160 mL de solução salina (NaCl) 0,9 %, formando um homogeneizado a 50 %. Foi pesado 1,0 g do homogeneizado em 3 tubos tipo Falcon, com 15 mL de capacidade, e colocado em geladeira até os procedimentos de extração do retinol no dia seguinte.

5.3 ANÁLISE DO RETINOL

5.3.1 Extração de retinol do fígado

A extração e análise de vitamina A nos fígados de galinha foram realizadas em triplicatas e segundo Hosotani & Kitawaga (2003)⁸¹. O método foi adaptado de acordo com as condições laboratoriais (Figura 3). Dentro de cada tubo de Falcon contendo 1,0 g do homogeneizado foi adicionado 1,0 mL de etanol 95 % com o objetivo de precipitar as proteínas presentes na amostra.

Antes da extração lipídica foi realizada uma saponificação adicionando 1.0 mL de hidróxido de potássio (KOH) 50% e banho-maria a 60 °C por 1,0 hora, sob agitação, com o objetivo de hidrolisar os ésteres de retinol presentes nas amostras.



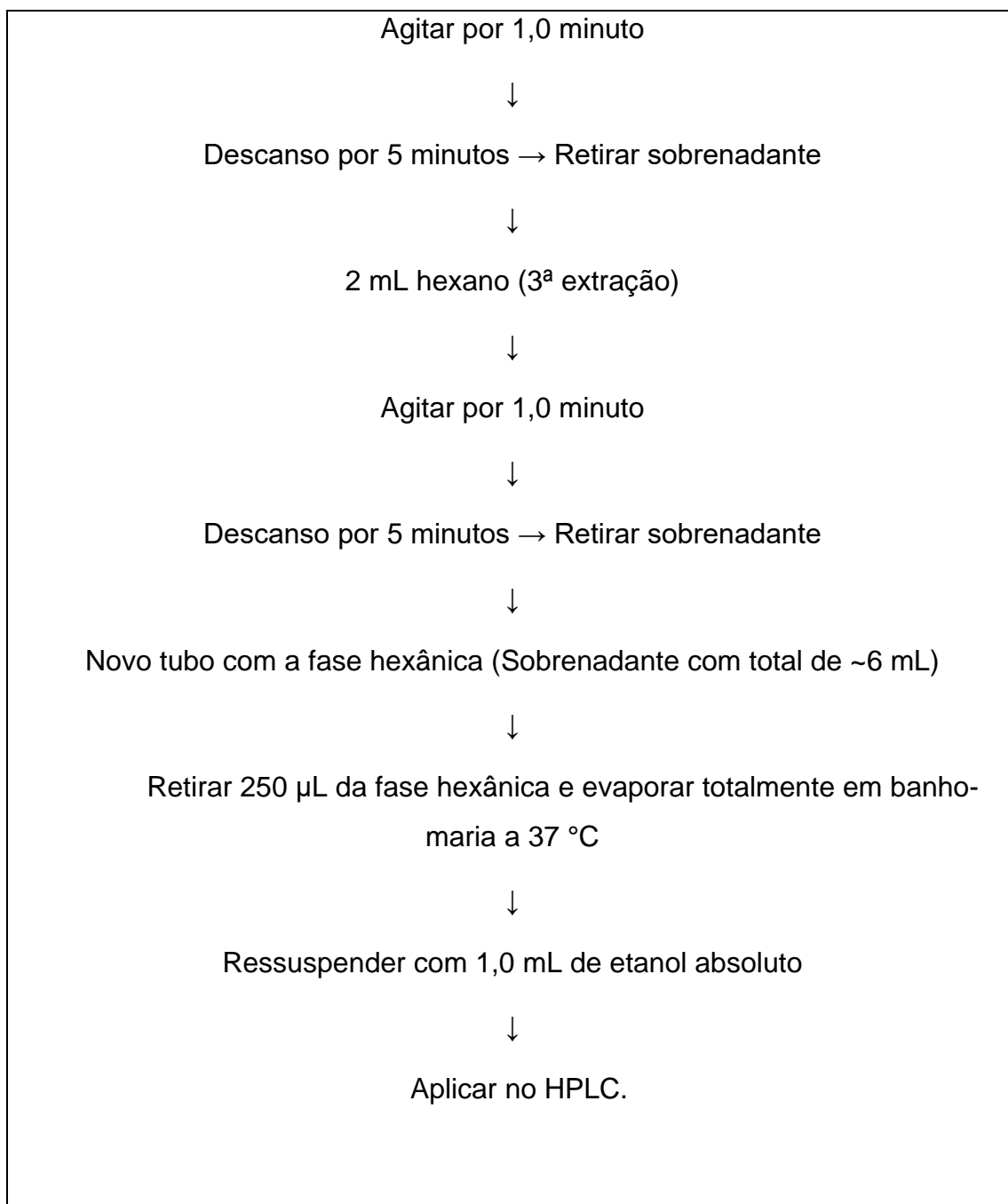


Figura 3. Técnica adaptada de extração da vitamina A dos alimentos segundo Hosotani & Kitawaga (2003).

Para a extração lipídica as amostras foram lavadas com 2 mL de hexano e agitados por 1,0 minuto, deixadas em repouso por 5 minutos e posteriormente o sobrenadante foi colocado em um novo tubo, sendo esse processo repetido por mais duas vezes, resultando no final em

aproximadamente 6 mL de hexano. Uma alíquota de 250 µL do hexano foi retirado, colocado em novo tubo de polipropileno de 5 mL e evaporado até a secura em banho-maria a 37 °C. Em seguida as amostras foram armazenadas à -18 °C, protegidas da luz e sob atmosfera de nitrogênio (*White Martins*®).

Antes da aplicação no HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), as amostras foram redissolvidas em 1,0 mL de etanol absoluto e aplicou-se 20 µL das amostras no HPLC. As amostras foram aplicadas em duplicata e foi feita uma média entre as duas áreas obtidas.

5.3.2 Condições cromatográficas

A concentração de retinol no fígado de galinha foi determinada em cromatógrafo constituído de bomba LC-20 AT, acoplada a um detector SPD-20A UV-VIS, coluna de fase reversa Luna 5µ C18(2) 100A phenomenex®, 250 mm x 4,6 mm e computador com o *software LC solution* para processamento dos dados.

A fase móvel utilizada para a análise de retinol nas amostras foi metanol a 100 %, em sistema isocrático com fluxo de 1,0 mL/min para retinol. O comprimento de onda (λ) adotado para monitoramento da absorbância do retinol foi de 325 nm.

A identificação e quantificação do retinol nas amostras foi dada por comparação de sua área obtida no perfil cromatográfico com as áreas do padrão de *all-trans* retinol (Figura 4).

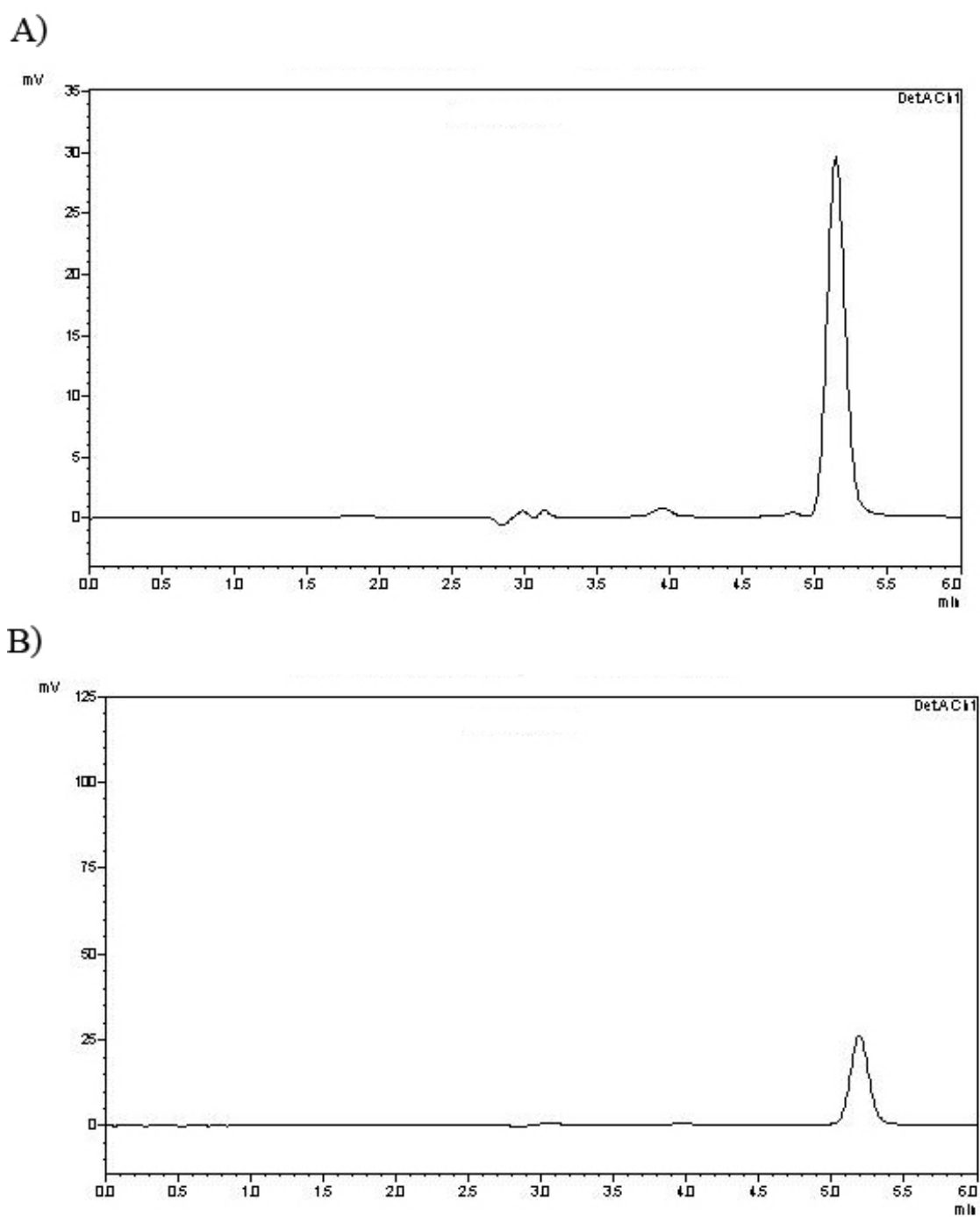


Figura 4. Perfil de eluição de retinol em CLAE. A) Cromatograma do retinol *all-trans* de 24,35 ng/20 μ L; B) Cromatograma da amostra de fígado de galinha submetido a extração de retinol descrita anteriormente.

5.3.3 Preparo do padrão de retinol

Foi preparado a solução padrão de retinol pesando-se 1,0 mg de retinol (Sigma) em um tubo tipo *ependorf*, diluindo em 1,0 mL de etanol absoluto e agitado por 1 minuto. Em seguida foram feitas duas diluições, com o objetivo de alcançar a concentração aproximada de 10 $\mu\text{g/mL}$, obtendo-se esse valor com a realização da leitura deste padrão em espectrofotômetro modelo U-2000 da Hitachi, utilizando-se cubetas de quartzo (Figura 5).

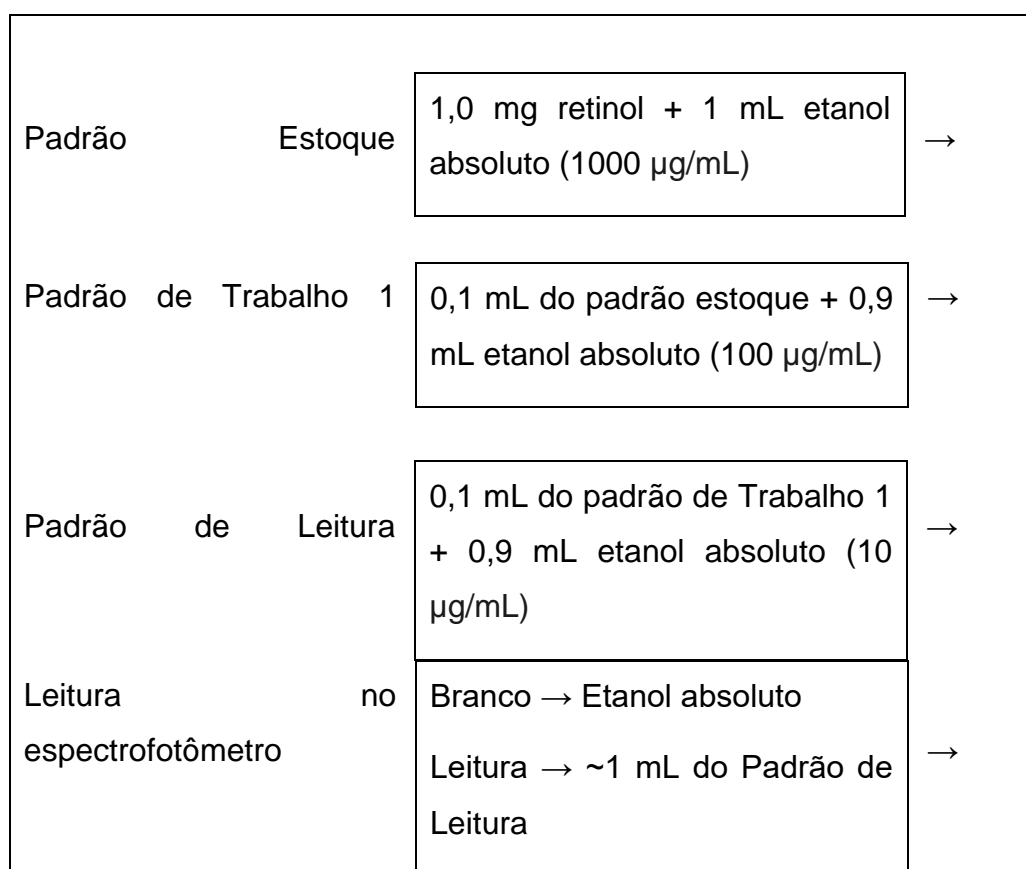


Figura 5. Metodologia para preparo do padrão de leitura de retinol.

A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico em etanol absoluto para retinol (ϵ 1,0 %, 1,0 cm em etanol = 1780 com leitura a 325 nm)^{46,82}.

Após a confirmação da concentração real do padrão, foi feita uma nova diluição a partir do padrão de leitura em etanol absoluto (Figura 6), resultando

em uma concentração aproximada de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (1,0 ng/1,0 μL) para aplicação no aparelho CLAE.

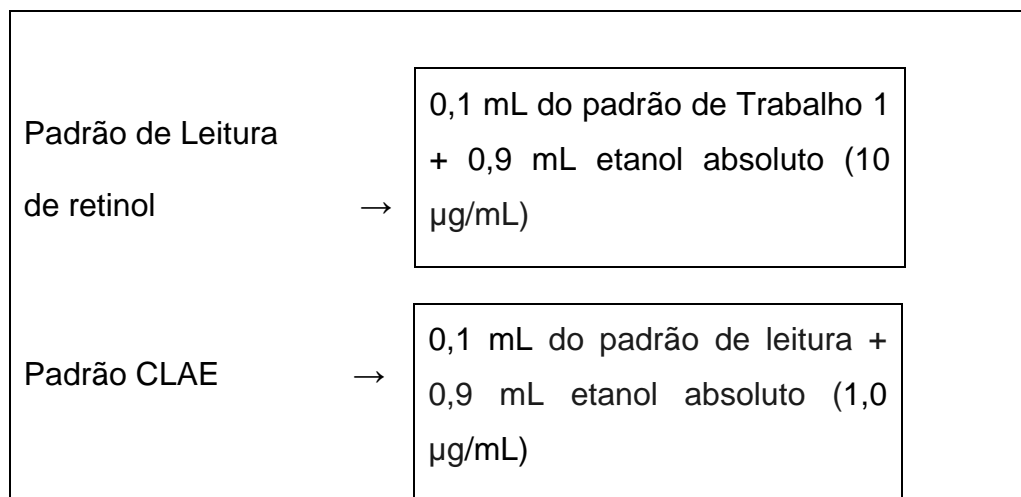


Figura 6. Metodologia para preparo do padrão de retinol para CLAE.

5.4 MODIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Foi feita uma modificação do método proposto por Hosotani & Kitawaga (2003) para extração e quantificação da vitamina A. A validação do método foi feita e seguiu as recomendações do guia *Guidelines on Bioanalytical Method Validation* da *Food and Drug Administration* (FDA)⁸³, sendo os parâmetros fundamentais do método de validação a determinação da precisão, recuperação, linearidade, sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à estatística descritiva utilizando o Microsoft Excel. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para verificar diferenças estatísticas na composição de vitamina A entre as amostras. Em seguida foi utilizado o teste de Tukey, ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$), para verificar diferenças entre as médias. As análises foram realizadas por meio do software SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL).

6. ARTIGOS PRODUZIDOS

6.1 ARTIGO 1

O artigo intitulado "*Effects of Cooking and Defrost Methods on Retinol Concentration in Chicken Liver*" foi submetido para publicação no periódico "*Journal of Food Composition and Analysis*", que possui fator de impacto 1.985 e Qualis B1 da CAPES para área de Nutrição.

Effects of Cooking and Defrost Methods on Retinol Concentration in Chicken Liver

Rodrigo Albert Baracho Rüegg and Roberto Dimenstein

ABSTRACT

The liver, like other viscera, provides an important source of animal protein, while being accessible to a less affluent population; furthermore, it is considered an important source of iron and vitamins, especially vitamin A. The quality of food is understood as a set of factors related to the final product, covering nutritional, organoleptic, and hygienic-sanitary characteristics, from effective control of many processing steps. We aimed to analyze the retinol concentration, by HPLC, in chicken livers in different brands, batches and types - organic and free-range chicken livers, and analyze the retinol in chicken livers submitted in different methods of cooking and defrost. Chicken livers samples were roasted for 35 minutes at 200 °C, cooked for 40 minutes at (26 to 100) °C, fried for 5 minutes at 180 °C, and defrosted by fridge for 8 hours at 3 °C, at ambient temperature for 2 hours at 23 °C, submersed in water for 35 minutes at 25 °C, and microwaved on defrost function for 1 minute, where all methods were compared to its natural state (3 °C). The mean retinol concentrations in brands A, B, C and organic and free-ranged were 9152.9a ± 719, 4673.1 ± 389b, 5943.6 ± 614c, 3401,33 ± 597,12b, 30094,79 ± 4628,75d µg/100 g (p < 0.001). Roast was the only method of cooking, and microwave was the only

process of defrost, showing significant losses of 39.9 % ($P < 0.05$), and 26.2 % ($P < 0.01$). This study showed a significant difference between brands and types of chicken livers, and a significant loss of retinol in chicken liver, in food processes commonly used.

1. Introduction

After World War II, due to food shortages, an alternative to beef was required. Consequently, the birds were raised on pastureland and in large warehouses with the objective of producing meat and eggs (Filho, 2002).

The liver is one of the principal parts of chicken giblets, and is considered an important economic and nutritional resource, rich in proteins, iron, and vitamin A (Akase et al., 2003; Devatkal et al., 2004; Monte et al., 2007).

Food products from animals are highly perishable, its low stability results from activity of diverse agents, where the microorganism, the enzyme activity, the wrong food processing, and the lack of information are the largest agents of food inadequacy for human consumption (Asiegbu et al., 2016; He et al., 2015; Lim et al., 2016; Luning et al., 2013; Shinbaum et al., 2016).

The use of high and low temperatures is an old method for food preservation due to the partial or total inhibition of the activity, and development of agents that change the foods. As the freezing, defrost is also a very important process, especially when you try to conserve the texture and flavor of foods derived from meat. Thus, defrost performed in a wrong way causes microbial growth and chemical reactions of protein insolubility, and lipid oxidation, resulting in loss of nutritional quality of food (Colla and Prentice-hernández, 2003; Ordóñez Pereda et al., 2005a).

Vitamins and minerals are the fundamental components of human metabolism, being involved in almost all known reactions and biochemical pathways involved in growth, reproduction and maintenance of life (Gallagher, 2010).

The food processing affects, in large scale, the vitamin level in foods, which may be a critical factor in the final quality of the food. This fact is dependent on nutritional value analysis, how this nutrient will contribute to the diet, and to whom it applies (Luterotti et al., 2015; Pereira, 1999; Rodrigues et al., 2010; Ryley and Kajda, 1994).

There is a need for knowledge on the vitamin A level evaluation, in different food preparation methods, from storage to preparation, being this knowledge of huge nutritional importance. The study aimed to evaluate the concentration of retinol in chicken liver, in different brands, batches and types (organic and free-range chicken), in different cooking methods and in traditional and different methods of defrost.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 BIOLOGICAL MATERIAL

For this work, we used samples from three batches and three brands of chicken liver, chilled, within the expiry date, and traded and purchased in supermarkets in the greater area of Natal, Brazil. We also used one batch from one brand of organic chicken liver and one batch of free-range chicken liver.

2.2 PREPARATION OF SAMPLES

2.2.1 Homogenate preparation

The preparation of the homogenates was performed in the Food Laboratory of the Department of Nutrition (DNUT)/Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Brazil.

We weighed 1 kg of chicken liver, these were then placed separately in a blender, Arno model, together with 1 L of a 0.9 % saline solution (NaCl), resulting in approximately 2 L of homogenate (50 %) and repeated for each brand, type and cooking and defrost methods.

2.2.2 Different brands and types

For retinol analysis of the different chicken brands livers (A, B, and C) and types (organic and free-range chicken).

In each of three 15 mL Falcon tubes, we introduced 1 g of homogenate from brand A, and repeated the process for the B, C brands and organic and free-range chicken. The tubes were chilled and kept in a refrigerator at 3 °C until the time of analysis. The sample preparation procedure was repeated on two additional batches of each brand.

The homogenates were transported in a refrigerated cooler to the Laboratory of Biochemistry of Food and Nutrition at the Center for Biosciences of the Federal University of Rio Grande do Norte, where there were subjected to retinol extraction.

2.2.3 Different cooking methods

In order to make roasted liver, 1 kg of raw liver was put in a roasting dish and placed in an oven, preheated in 200 °C, for 35 minutes. After that, the liver was put apart to cool down.

In order to make a cooked liver, 1 kg of raw liver was put in a large pan, approximately 1 L of water was added in order to cover the liver, and it was cooked in medium heat for 40 minutes, in a temperature starting (26 to 100) °C. After the procedure, the water was removed and the liver was put apart to cool down.

In order to make a fried liver, 6 mL of soybean oil (dessertspoon) was put in a pan, "Teflon" type, to heat. A small portion of raw liver was put at a time, frying for 5 minutes each side, reaching the temperature of 180 °C and golden color. The same procedure was repeated with the rest of the liver. After the process, the liver was put on absorbent paper and cooled down.

Another kilo of raw liver was put in the fridge at 3 °C.

The livers were submitted to homogenate preparation. Three Falcon tubes, with 15 ml capacity, were utilized to weighed 1 g of raw liver homogenate and for each other method: roasted, cooked, and fried.

2.2.4 Different defrost methods

One kilo of raw chicken liver was acquired and transported in a cooler to the Laboratory of Biochemistry of Food and Nutrition, of Biosciences Center, of Federal University of Rio Grande do Norte and it was submitted to homogenate preparation.

Fifteen Falcon tubes was utilized to weighed 1 g of fresh homogenized liver, where 12 tubes were put in a freezer at -18 °C for 72 hours. After 72 hours, the 12 tubes were separated into four groups, such methodology has been adapted according to a study performed in Ireland with head chef and managers, on their practices with defrost, and a study on consumption and domestic preparation of meat in Turkey (Bolton et al., 2008; Karabudak et al., 2008): a group of three tubes was left in the fridge for defrosting for 8 hours, at 3 °C, other group of three tubes was left in the table at ambient temperature (23 °C) for 2 hours, another group of three tubes was submerged in water at 25 °C for 35 minutes, and then, other group of three tubes was put in a microwave, Brastemp model, in defrost function for one minute. The other three tubes containing fresh liver were taken for analysis as following described.

2.3 RETINOL ANALYSIS

2.3.1 Extraction of retinol from the liver

The extraction and measurement of retinol in the foods was performed in triplicate and according to Hosotani and Kitagawa (2003). The methods were adapted according to laboratory conditions.

Into each Falcon tube containing 1 g of homogenate, we added 1 mL of 95 % ethanol to precipitate the proteins present in the sample.

Before the lipid extraction, saponification was performed by adding 1 mL of potassium hydroxide (KOH) 50 % to a bain-marie at 60 °C for 1 hour, while

stirring, with the objective of hydrolyzing the retinyl esters present in the samples.

For the lipid extraction, the samples were washed with 2 mL of hexane and stirred for 1 minute, allowed to stand for 5 minutes and then the supernatant was placed in a new tube. This process was then repeated two more times, resulting in approximately 6 mL of hexane. A 250- μ L aliquot of hexane was removed, placed in a new 5-mL polypropylene tube and evaporated to dryness in a bain-marie at 37 °C before storing the samples at -18 °C, under a nitrogen atmosphere and protected from light.

Before the application of HPLC (*High-performance liquid chromatography*), the samples were redissolved in 1 mL of absolute ethanol and 20 μ L of the samples were analyzed by HPLC. The samples were administered in duplicate and a mean between the two areas was obtained.

2.3.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The concentration of retinol in the chicken liver was determined by a chromatograph consisting of a LC-20 AT pump coupled to an SPD-20A UV-VIS detector, a reversed phase Phenomenex® Luna® 5 μ m C18(2) 100 Å , 250 mm x 4.6 mm column and a computer with the *LC solution software* for data processing.

The mobile phase used for retinol analysis of the samples was 100 % methanol in an isocratic flow system of 1 mL/min. The wavelength (λ) adopted for the monitoring of retinol absorbency was 325 nm.

The identification and measurement of the retinol in the samples was established by comparing the area obtained in the chromatographic profile with the areas of standard all-*trans* retinol (Figure 1).

2.3.3 Linearity, precision and accuracy of the method

The linearity of the method is the instrumental response of the linear relationship of calibration (obtained area) with the standard concentration, it is satisfactory when the straight line correlation coefficient nears 1 (Brito et al., 2003).

Six different dilutions of standard retinol (3.37 ng/20 μ L, 6.75 ng/20 μ L, 13.49 ng/20 μ L, 26.98 ng/20 μ L, 53.96 ng/20 μ L, and 107.92 ng/20 μ L) were applied in the HPLC. A graph was then constructed from the straight line equation using their respective areas (26 426, 55 687, 119 135, 238 471, 498 955, 989 117). The straight line equation was obtained by linear regression (peak area vs. standard concentration), with $R = 0.9999$ (Figure 2).

The precision of the method was analyzed by a repeatability test, using extractions from the same sample of each brand, on five alternate days. The coefficient of variation (CV) was calculated by the standard deviation about the mean and expressed as a percentage. The results were <15%, which in accordance with Pinto and Jardim (2000), is considered admissible.

The accuracy of the method was verified by recovery testing. Additional known quantities of standard retinol were added to the samples from the three brands. These samples passed through the same method of retinol extraction, described in section 2.3.1, and the method accuracy showed recoveries above 93 %.

2.3.4 Relationship between the recommended single serving of liver and vitamin A requirement

According to the Food Guide for the Brazilian Population, the recommended intake of giblets is one serving per week. Regarding its cooking measure, this portion corresponds to 2 units of chicken liver or 88 g (Brasil, 2008). The amount of retinol contained in a chicken liver portion was thus calculated following this principle and the ratio of the daily nutritional requirement was verified according to the recommendations from the Institute of Medicine (Institute of Medicine (IOM), 2001). Next, the chicken liver was classified as a source of vitamin A. A food is considered a certain nutrient

source when it contains more than 5 % of the Dietary Reference Intakes (DRI) in one portion. A food is a good source if it contains between 10 % and 20 %, and an excellent source if it contains more than 20 % of the DRI in a single serving (Philippi, 2008).

2.3.5 Statistical analysis

The results were tabulated and submitted to descriptive statistics using Microsoft Excel. Retinol levels were expressed as means and standard deviations. Analysis of variance (ANOVA) was performed to verify statistical differences in retinol composition between batches of each brand and between brands. Afterwards, we used the post-hoc Tukey test, at a significance level of 0.01 ($P < 0.01$), to evaluate differences between means. The analyzes were performed using Statistica 7.0 software (StatSoft, 2004).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 RETINOL IN DIFFERENT BRANDS AND DIFFERENT BATCHES

The average concentration of retinol in the three batches of the three different brands is shown in Table 1.

Our study found statistically different values among the means of the three lots of the three brands (Table 1).

V. V. A. dos Santos et al. (2009) assessed the concentration of vitamin A in two different strains of chicken liver, Cobb and Ross, subjected to the same breeding process, and they presented values of 6678 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ and 8324.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, respectively. The results of the Cobb breed were close to the mean of the three batches of brand C, and the Ross breed, to the mean of the three batches of brand A.

Some breeds of chicken have higher requirements for certain nutrients due to differences in the absorption and conversion of pro-vitamin A compounds to retinol, thereby influencing the quantity stored in the liver (Torres, 1979).

Other studies analyzing the retinol concentration in chicken liver are shown in Table 2.

Table 3 shows the quantity of vitamin A in chicken liver in the main tables of food composition. The present study revealed results superior to all the tables, except for the Tucunduva Food Composition Table.

Ribeiro et al. (2005) mention that the incorrect description of foods, inadequate sampling, the use of counter analytical methods, variability of genetic and environmental factors, and the form of preparation and processing are key biases that may result in differences between the data in the various tables of food composition. They also cite the breed, as well as the management and age of the animals, as key influencing factors in the results of the composition of nutrients in food. In this regard, in order to diminish biases, a methodological standardization in nutrient analysis is recommended (P. C. P. dos Santos et al., 2009).

Surai and Kuklenko (2000) analyzed the concentration of vitamin A in the livers of 56 days old chickens, with vitamin supplementation of 10 IU/g to their diet, and found values of 25 820 μg of retinol/100 g, which represents about 5 times more than that found in brand C during the present study. This same study made a comparison with 42 days old chickens, and obtained results of 12 240 μg of retinol/100 g of liver. These different concentrations show a positive relationship between a higher intake of vitamin A and a greater amount of vitamin A in the liver of these animals, suggesting that chicken producers are not concerned with vitamin A supplementation in the diet, or, are using diets that lack pre-formed vitamin A.

Furthermore, the environment in which the animal lives, and factors such as temperature and stress, can influence food intake, causing problems in their development and performance (Bottje and Harrison, 1985).

The group represented by free-range chicken showed significantly higher values in relation to the farm and organic. This difference comes from, for the most part, the food. Hens are created predominantly in semi-intensive systems, characterized by the availability of an aviary, where are the feeders, drinkers

and nests, however, also there is the option of having access to a free area of grazing and recreation (Souza et al., 2010).

In this kind of creation, characteristic of family farming, animals are fed corn-based diets, supplemented with specific concentrates, depending on the purpose of creation. Due to hens have some freedom, they consume what are available, such as grasses, seeds, insects, worms and crops. Some farmers in an attempt to improve the quality of chickens, even offer food waste such as rice and vegetable rich in beta-carotene (Souza et al., 2010).

3.2 VITAMIN A IN DIFFERENT COOKING METHODS

Changes in vitamin A values after diverse cooking methods are shown in Table 4.

Cooking methods of meat products are designed to be more palatable, soft, and digestible products, besides ensure the food safety because heat-sensitive microorganisms are eliminated or reduced (Botelho et al., 2009).

Roasted foods are healthy and practical, but take longer to cook, which allows the heat contact with the food, causing losses of certain nutrients such as vitamin A, sensitive to excess heat, besides turning the food dry.

Foods after roasted continue to cook inside, even after its being removed from the oven; it occurs because the heat continues to transfer energy from outside to inside of the food (Botelho et al., 2009).

3.3 VITAMIN A IN DIFFERENT DEFROST METHODS

Changes in vitamin A values after diverse defrost methods are shown in Table 5.

The lack of information on the correct defrost method of food is one of the major mistakes that compromise the food safety. Studies show that the relationship between the socioeconomic and educational status is directly linked to erroneous practices in food preparation (Bolton et al., 2008; Karabudak et al., 2008).

According to Food Safety and Inspection Service (FSIS) of the United States Department of Agriculture (USDA), there are safe methods to make the defrost, which guarantee the nutritional quality and safety of food at the end of the process, such as defrost in the fridge, in cold running water, and microwave (Food Safety and Inspection Service, 2013).

Though it may be a safety and fast method (Li and Sun, 2002), the defrost in microwave had a significant decrease (Table 5) in the physical and chemical quality of the food, especially in vitamin A, when compared to concentration of vitamin A in fresh chicken liver.

A study evaluating the effect of cow's milk heating in a microwave, on vitamins A, E, B1, B2, and B6, showed a significant decrease of vitamin A (Sieber et al., 1996).

Ribeiro and colleagues studied the effect of breast milk defrost in microwave, on vitamin A values, and observed a significant decrease of 34 % (Ribeiro et al., 2005).

Another study showed a significant loss of carotenoids around 57 % in papaya purees submitted to thermal processes using microwave (de Ancos et al., 1999).

Microwaves are characterized by their emission frequency between 300 MHz and 300 GHz, with a wavelength ranging from 1 cm to 1 mm, and associated energy from 1.2×10^{-12} to 1.2×10^{-7} eV. Its energy is converted into heat when absorbed by matter, where the water is the main component absorbing energy, and generating heat to the food. Microwaves easily penetrate the food, generating heat around the entire food uniformly and quickly. One of the mechanisms of heat generation by microwaves is dipoles rotating, favored in food with a high moisture level, which generates friction and molecular shock, increasing the kinetic energy, and consequently, the food temperature. Besides water, sugar and ethanol are components interacting with the microwaves by dipoles rotating, thereby increasing the heat supplied to the food, and consequently, increasing the loss of labile vitamins (Ordóñez Pereda et al., 2005b).

Thus, although it is stable to heat, vitamin A was lowered significantly. In addition, it is a vitamin sensitive to light and subject to oxygen actions, which helps in the significant losses.

Chicken liver is a great food, given its accessibility, good palatability, low cost, a good source of vitamin A, thus minimizing cases of vitamin A deficiency in developing countries (Sommer and Davidson, 2002).

3.4 CHICKEN LIVER AS A SOURCE OF VITAMIN A

Considering the amount of retinol in a normal serving, chicken liver is considered an excellent source of vitamin A, as one serving exceeds 20% of the DRI.

Acute or chronic toxicity or hypervitaminosis A are reported when retinol levels are greater than 100 µg/dL. Signs of this toxicity are: hair loss, mucosal dryness, chapped skin, double vision, headache, hepatic fibrosis, ascites, and fractures (Gallagher, 2010; Solomons, 2012). Penniston and Tanumihardjo (2006) describe chronic toxicity resulting from the ingestion of large amounts of previtamins, for months or years, where the quantities of this ingestion may vary accordingly with the individualities of the organism (Penniston and Tanumihardjo, 2006).

Rothman et al. (1995) presented, in their study, possible risks of congenital anomalies in babies born to mothers who took more than 3000 µg of vitamin A per day in the form of supplements during the gestation period. According to the study, about 1 infant in 57 had a malformation attributable to the supplement.

Although it is necessary for bone growth, evidence indicates that vitamin A intake above 1500 µg/day is associated with decreased bone density and an increased risk of fractures (Morais and Burgos, 2007).

4. CONCLUSIONS

Chicken liver showed significantly different retinol levels among the different brands. This difference could signify that livers originating from

different farms and distinct breeds of chicken with contrasting diets, and should be investigated.

A significantly reduction was found in concentration of vitamin A, in values of 39.9 % and 26.2 %, in chicken livers subjected to roast in oven at 200 °C for 40 minutes, and defrost by microwave for 1 minute. However, chicken livers have a high amount of vitamin A, meeting the daily needs and proving to be a food of excellent source of vitamin A, being a great alternative against the deficiency of this vitamin. It is highlighted that in populations with a good nutrition of vitamin A, the consumption of this food shall be moderate, considering the toxic and teratogenic effects of a high ingestion can cause.

Acknowledgements

The authors thank FAPERN, CAPES and PPG/UFRN for financial support.

REFERENCES

- Akase, T., Yamashina, S., Akase, T., Onodera, S., Okuda, H., Tashiro, S., 2003. Effects of liver-supplemented food on the development of embryos in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 553–556. doi:10.1248/bpb.26.553
- Asiegbu, C. V., Lebelo, S.L., Tabit, F.T., 2016. The food safety knowledge and microbial hazards awareness of consumers of ready-to-eat street-vended food. *Food Control* 60, 422–429. doi:10.1016/j.foodcont.2015.08.021
- Bolton, D.J., Meally, a., Blair, I.S., McDowell, D. a., Cowan, C., 2008. Food safety knowledge of head chefs and catering managers in Ireland. *Food Control* 19, 291–300. doi:10.1016/j.foodcont.2007.04.006
- Botelho, R.B.A., Araújo, H.M.C., Zandonadi, R.P., Ramos, K.L., 2009. Transformação dos alimentos: carnes, vísceras e produtos cárneos., in: *Alquimia Dos Alimentos Vol. 2*. Senac, Brasília/DF, pp. 219–264.

- Bottje, W.G., Harrison, P.C., 1985. Effect of carbonated water on growth performance of cockerels subjected to constant and cyclic heat stress temperatures. *Poult. Sci.* 64, 1285–92.
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, 2008. Guia Alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília.
- Brito, N.M., Amarante Jr, O.P., Polese, L., Ribeiro, M.L., 2003. Validação De Métodos Analíticos : Estratégia E Discussão. *Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambient.* 13, 129–146.
- Colla, L.M., Prentice-hernández, C., 2003. Congelamento e Descongelação - Sua Influência sobre os Alimentos. *Vetor* 13, 53–66.
- de Ancos, B., Cano, M.P., Hernandez, A., Monreal, M., 1999. Effects of microwave heating on pigment composition and colour of fruit purees. *J. Sci. Food Agric.* 79, 663–670. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199904)79:5<663::AID-JSFA232>3.0.CO;2-L
- Devatkal, S., Mendiratta, S., Kondaiah, N., Sharma, M., Anjaneyulu, A.S., 2004. Physicochemical, functional and microbiological quality of buffalo liver. *Meat Sci.* 68, 79–86. doi:10.1016/j.meatsci.2004.02.006
- Filho, P.H., 2002. Efeito de fatores genéticos e do sistema de criação sobre o desempenho e o rendimento de carcaça de frangos tipo caipira. Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP.
- Food Safety and Inspection Service (FSIS), 2013. The Big Thaw — Safe Defrosting Methods.
- Gallagher, M.L., 2010. Os Nutrientes e Seu Metabolismo., in: Gallagher, M. (Ed.), Krause: Alimentos, Nutrição E Dietoterapia. Elsevier, Rio de Janeiro, p. 68.
- He, X., Li, S., Li, Y., Gu, W., Sun, Y., Sun, X., 2015. Evaluation of reduced toxicity of zearalenone as measured by the Hep G2 cell assay on degradation enzymes. *Food Control* 57, 161–168. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.031

- Hosotani, K., Kitagawa, M., 2003. Improved simultaneous determination method of beta-carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 791, 305–13.
- Institute of Medicine (IOM), 2001. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc : a report of the Panel on Micronutrients. *Nutr. Rev.* 55, 319–326. doi:10.1111/j.1753-4887.1997.tb01621.x
- Karabudak, E., Bas, M., Kiziltan, G., 2008. Food safety in the home consumption of meat in Turkey. *Food Control* 19, 320–327. doi:10.1016/j.foodcont.2007.04.018
- Li, B., Sun, D.W., 2002. Novel methods for rapid freezing and thawing of foods - A review. *J. Food Eng.* 54, 175–182. doi:10.1016/S0260-8774(01)00209-6
- Lim, T.-P., Chye, F.Y., Sulaiman, M.R., Suki, N.M., Lee, J.-S., 2016. A structural modeling on food safety knowledge, attitude, and behaviour among Bum Bum Island community of Semporna, Sabah. *Food Control* 60, 241–246. doi:10.1016/j.foodcont.2015.07.042
- Luning, P.A., Chinchilla, A.C., Jacxsens, L., Kirezieva, K., Rovira, J., 2013. Performance of safety management systems in Spanish food service establishments in view of their context characteristics. *Food Control* 30, 331–340. doi:10.1016/j.foodcont.2012.06.040
- Luterotti, S., Bicanic, D., Marković, K., Franko, M., 2015. Carotenes in processed tomato after thermal treatment. *Food Control* 48, 67–74. doi:10.1016/j.foodcont.2014.06.004
- Monte, A.L. de S., Selaive-Villaruel, A.B., Oliveira, A.N. de, Perez, J.R.O., Fuentes Zapata, J.F., Ramos, R.E., 2007. Rendimento das vísceras de cabritos mestiços anglo x SRD e Boer x SRD. *Ciência e Agrotecnologia* 31, 223–227. doi:10.1590/S1413-70542007000100033
- Morais, G.Q., Burgos, M.G.P. de A., 2007. Impacto dos nutrientes na saúde óssea: novas tendências. *Rev. Bras. Ortop.* 42. doi:10.1590/S0102-

36162007000700002

- Ordóñez Pereda, J.A., Rodríguez, M.I.C., Álvares, L.F., Sanz, M.L.G., Minguillón, G.D.G. de F., Perales, L. de la H., Cortecero, M.D.S., 2005a. Conservação pelo frio., in: Tecnologia de Alimentos: Componentes Dos Alimentos E Processos. Vol. 1. ARTMED, Porto Alegre/RS, pp. 155–196.
- Ordóñez Pereda, J.A., Rodríguez, M.I.C., Álvares, L.F., Sanz, M.L.G., Minguillón, G.D.G. de F., Perales, L. de la H., Cortecero, M.D.S., 2005b. Utilização de radiações eletromagnéticas na indústria alimentícia. Irradiação de alimentos., in: Tecnologia de Alimentos: Componentes Dos Alimentos E Processos. Vol. 1. ARTMED, Porto Alegre/RS, pp. 125 – 154.
- Penniston, K., Tanumihardjo, S., 2006. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 191–201.
- Pereira, M., 1999. β -Carotene content of Brazilian fortified pasta. *Food Control* 10, 81–85. doi:10.1016/S0956-7135(98)00160-1
- Philippi, S.T., 2008. Alimentação Saudável e a pirâmide dos alimentos., in: Philippi, S.T. (Ed.), Pirâmide Dos Alimentos: Fundamentos Básicos Da Nutrição. Manole, Barueri, pp. 3–29.
- Pinto, G.M.F., Jardim, I.C.S., 2000. Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. *J. Chromatogr. A* 869, 463–469. doi:10.1016/S0021-9673(99)01242-X
- Ribeiro, K.D.S., Melo, I.L.P., Pristo, A.Z.O., Dimenstein, R., 2005. Efeito do processamento do leite humano sobre os níveis de retinol. *J. Pediatr. (Rio J)*. 81, 61–64.
- Rodrigues, C.M. a., Della Lucia, C.M., Azeredo, R.M.C., Cota, a. M., Santana, a. M.C., Pinheiro-Sant’Ana, H.M., 2010. Control of vitamin C losses in vegetables prepared at a food service. *Food Control* 21, 264–271. doi:10.1016/j.foodcont.2009.05.020
- Rothman, K.J., Moore, L.L., Singer, M.R., Nguyen, U.-S.D.T., Mannino, S., Milunsky, A., 1995. Teratogenicity of High Vitamin A Intake. *N. Engl. J.*

- Med. 333, 1369–1373. doi:10.1056/NEJM199511233332101
- Ryley, J., Kajda, P., 1994. Vitamins in thermal processing. *Food Chem.* 49, 119–129. doi:10.1016/0308-8146(94)90148-1
- Santos, P.C.P. dos, Nespolo, C.R., Oliveira, F.A. de, Veríssimo, C. De, Marco, Vivan, B.D., 2009. Composição centesimal e valor energético de pratos tradicionais do Rio Grande do Sul. *Braz. J. Food Technol.* 57–64.
- Santos, V.V.A. dos, Costa, A.P.M. da, Soares, N.K.M., Pires, J.F., Ramalho, H.M.M., Dimenstein, R., 2009. Effect of storage on retinol concentration of Cobb and Ross strain chicken livers. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 60 Suppl 1, 220–231.
- Shinbaum, S., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., 2016. Evaluating your obligations for employee training according to the Food Safety Modernization Act. *Food Control* 60, 12–17. doi:10.1016/j.foodcont.2015.07.014
- Sieber, R., Eberhard, P., Gallmann, P.U., 1996. Heat treatment of milk in domestic microwave ovens. *Int. Dairy J.* 6, 231–246. doi:10.1016/0958-6946(95)00009-7
- Solomons, N.W., 2012. Vitamin A, in: Jr., J.W.E., Macdonald, I.A., Zeisel, S.H. (Eds.), *Present Knowledge in Nutrition*. International Life Sciences Institute (ILSI), pp. 149–185.
- Sommer, A., Davidson, F.R., 2002. Assessment and control of vitamin A deficiency: the Anecy Accords. *J. Nutr.* 132, 2845S–2850S.
- Souza, N.A. de, Oliveira, J.F. de, Holanda, J.S. de, Chagas, M.C.M. das, Filho, J.A., 2010. *Sistema de Produção de Aves Caipira*.
- StatSoft, I., 2004. Programa computacional *Statistica 7.0*.
- Surai, P.F., Kuklenko, T. V., 2000. Effects of Vitamin A on the Antioxidant Systems of the Growing Chicken. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 13, 1290–1295. doi:10.5713/ajas.2000.1290
- Torres, A.P., 1979. *Alimentos e nutrição das aves domésticas*, 2nd ed. Nobel, São Paulo.

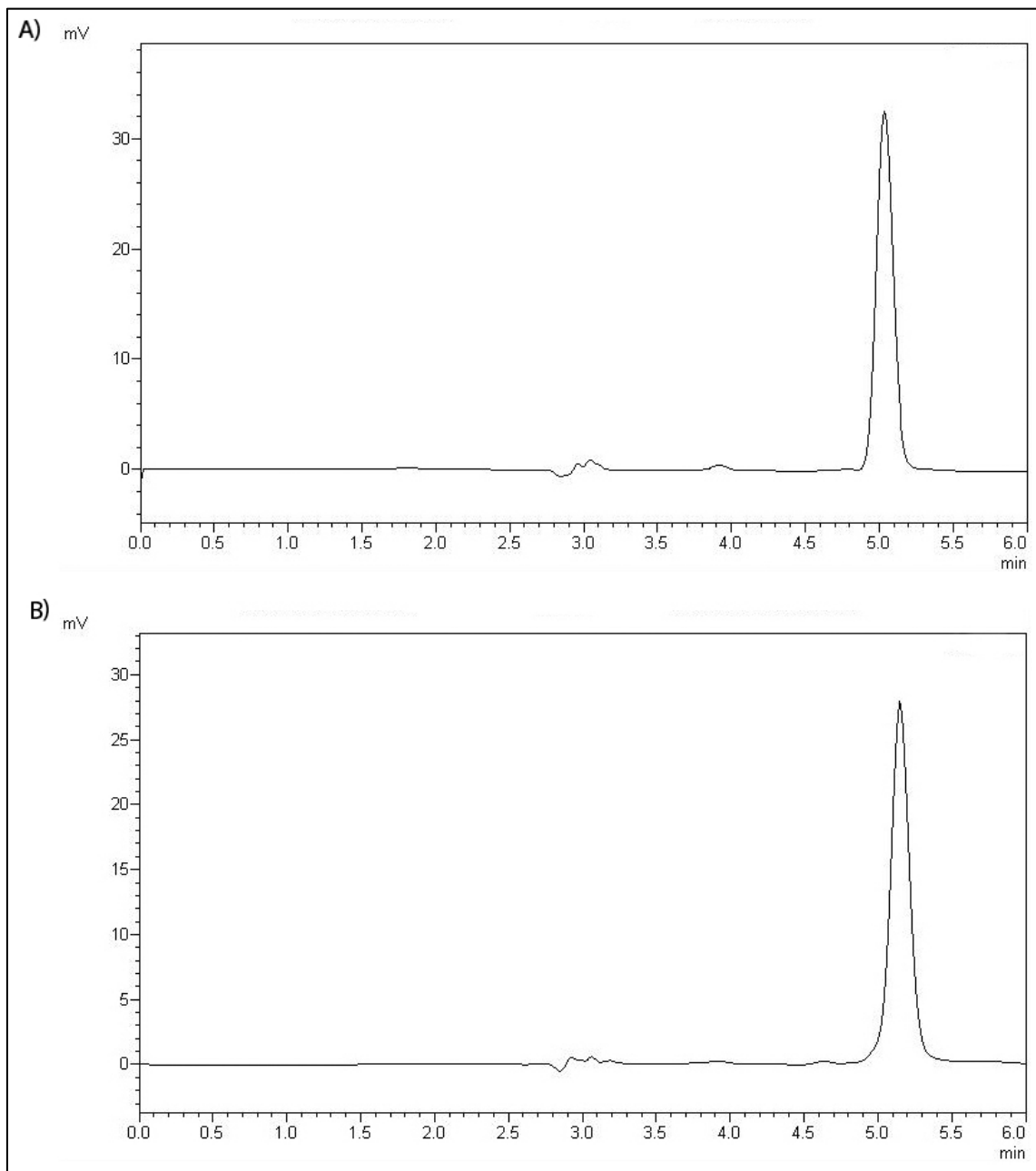


Figure 1. Retinol elution profile in HPLC. A) Chromatogram of all-trans retinol of 24.35 ng/20 μ L; B) Chromatogram of chicken liver sample.

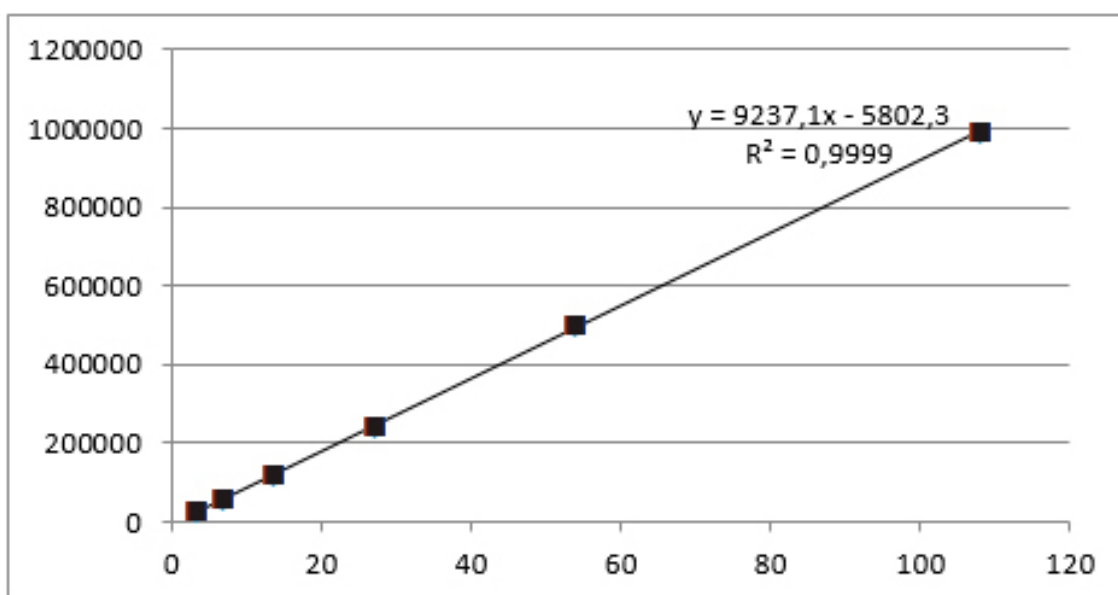


Figure 2. Gauging curve and straight-line equation obtained through application in the HPLC, at different concentrations of retinol standard.

Mean retinol concentration in $\mu\text{g}/100 \text{ g} \pm \text{SD}$	
Brand A	$9152.9 \pm 719^{\text{a}}$
Brand B	$4673.1 \pm 389^{\text{b}}$
Brand C	$5943.6 \pm 614^{\text{c}}$
Organic	$3401,33 \pm 597,12^{\text{b}}$
Poultry	$30\ 094,79 \pm 4628,75^{\text{d}}$

Table 1. Mean concentration of retinol \pm SD. Means followed by different letters in the same column differ from each other by the Tukey test with $P < 0.001$. SD: Standard Deviation.

Reference	Location	Vitamin A concentration ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
Majchrzak et al. (2006)	Austria	5600
Howells and Livesey (1998)	United Kingdom	9700
Torres et al. (1998)	Brazil	10 455
Schindler et al. (1987)	Germany	13 220
Jaśkiewicz et al. (2014)	Poland	10 389 to 16 218
KANG et al. (2006)	Canada	18 760

Table 2. Different studies showing respective retinol concentrations obtained, in $\mu\text{g}/100\text{ g}$, in chicken liver.

Food composition tables	Retinol ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) of chicken liver
TACO (2011)	3863
Tucunduva (2002)	11 325
USDA (2008)	3296
IBGE (2008-2009)	3978
Franco (1998)	4000

Table 3. Retinol ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) of chicken liver in the Food composition tables.

Cooking Methods	Retinol ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	% loss
Roasted at 200 °C, 35 min	6,915.8 \pm 818.2*	39.9
Cooked at (26 to 100) °C, 40 min	10,802.9 \pm 881.2	6.1
Fried at 180 °C, 5 min	10,424.1 \pm 863.0	9.4
Raw at 3 °C	11,510.6 \pm 245.7	

Table 4. Retinol concentration in chicken liver of brand B, subjected to different cooking methods and their losses.

Each line value corresponds to the average \pm standard deviation of triplicate. * means differs significantly ($P < 0.05$) from the Raw.

Defrost	Retinol ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	% loss
Fridge 3 °C, 8h	4,663.9 \pm 347.0	7.9
Bench 23 °C, 2h	5,133.2 \pm 410.7	
Submersion in water 25 °C, 35 min	4,424.2 \pm 75.9	12.6
Microwave for 1 min	3,733.6 \pm 241.2*	26.2
Raw 3 °C	5,062.2 \pm 481.9	

Table 5. Retinol concentration in chicken liver of brand A, subjected to different defrost methods and their losses.

Each line value corresponds to the average \pm standard deviation of triplicate. * means differs significantly ($P < 0.01$) from the Raw.

6.2 ARTIGO 2

O artigo intitulado “*Validation of an analytical method based on high-performance liquid chromatography for the determination of retinol in chicken liver*” foi submetido para publicação no periódico “*Food Research International*”, que possui fator de impacto 3.182 e Qualis A2 da CAPES para área de Nutrição.

Validation of an analytical method based on high-performance liquid chromatography for the determination of retinol in chicken liver

Rodrigo Albert Baracho Rüegg¹ (rodrigoruegg@gmail.com)

Roberto Dimenstein¹ (rdimenstein@gmail.com)

¹: Postgraduate in Nutrition, Federal University of Rio Grande do Norte, Av. Senador Salgado Filho, 3000, Bairro Lagoa Nova, 59072-970 Natal, RN, Brazil.

Abstract

Retinol is an unsaturated fat-soluble isoprenoid alcohol. It is essential for the normal functioning of cells, human growth, and development, and it is found in animal sources in the form of palmitate ester. Chicken liver is an excellent source of retinol and is widely used in the diet of people in developing countries to combat Vitamin A deficiency. Several methods for the quantification of retinol in chicken liver have been reported in the literature. Most of them use more than one solvent for the determination and quantification of this micronutrient. A new method was developed based on a reverse phase system and using isocratic elution in a C18 column (5 mm, 250 × 4.6 mm) coupled to a SPD-20A UV-VIS detector at a wavelength of 325 nm with a single mobile phase, methanol. The method is simple and inexpensive, allowing the rapid extraction, determination, and quantification of retinol in chicken liver samples, with an average retention time of 5.2 min at 23 °C, yielding good linearity results ($R^2 = 0.9999$), standard stock and freeze-thaw process stabilities of 93.2% and 97.5%,

respectively, precision with coefficients of variation below 15%, and recovery coefficients ranging between 93% and 101.2%.

1. Introduction

Vitamin A is a fat-soluble micronutrient that comprises a series of compounds displaying the biological activity of retinol (Figure 1), which exists either as preformed vitamin A (retinol, retinal, retinoic acid, and retinyl esters) or as pro-vitamin A (alpha-carotene, beta-carotene, and beta-cryptoxanthin) (Yuyama, Marinho, Alencar, Yonekura, & Cozzolino, 2012).

Retinol's function is associated with visual, reproductive, and immunological processes. It is also essential for cell differentiation and fetal development. Vitamin A deficiency (VAD) is still considered a global disease, particularly in emerging countries where its diagnosis is closely related to a low socioeconomic status. VAD affects the vision of the patient, initially with night blindness, and leading to possible xerophthalmia and keratomalacia symptoms. When untreated, these symptoms become irreversible, resulting in vision loss (Brasil & Ministério da Saúde, 2009; Gallagher, 2010; Saunders, Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, & Básica, 2009; Yuyama et al., 2012).

Brazil presents a large number of cases of VAD in the Northeast region and in some regions of the Southeast, where the populations' diet is poor in both quality and quantity as a result of unsatisfactory living conditions. Micronutrient deficiencies are known as hidden hunger. Children, pregnant women, and nursing mothers present a higher risk of vitamin A deficiency (Brasil & Ministério da Saúde, 2009).

The main animal food sources of retinol are liver, fish oils, eggs, milk, and dairy products (Almeida-Muradian & Pentead, 2003). Several studies have shown that liver, and especially chicken liver, is an excellent source of vitamin A. Santos *et al.* (2009) evaluated the concentration of retinol in the liver of two different strains of chicken, Cobb and Ross, subjected to the same breeding process, which presented retinol values of 6678.0 µg/100 g and 8324.1 µg/100 g, respectively. Rüegg and Dimenstein (2016, unpublished worked) evaluated three batches of chicken liver from three brands sold in the supermarket, and found mean values of 9152.9 µg/100 g, 4673.1 µg/100 g, and 5943.6 µg/100 g. The Dietary

Reference Intakes (DRI) is a commonly used reference for daily nutritional recommendations. The daily recommendation of vitamin A is 700 µg for women over 14 years of age and 900 µg for men over 14 years of age (Institute of Medicine (IOM), 2001).

Thus, in addition to its low cost, chicken liver has great potential to combat VAD (Howells & Livesey, 1998; Jaśkiewicz, Sagan, & Puzio, 2014; KANG, CHERIAN, & SIM, 2006; Majchrzak, Fabian, & Elmadfa, 2006; Schindler, Scholz, & Feldheim, 1987; Surai & Kuklenko, 2000; Torres, Okani, Roviello, Guariero, & Campos, 1998).

Several studies have been conducted for the detection of retinol and retinyl esters in animal food sources using liquid chromatography in reverse phase and UV absorption detection (Furr, Cooper, & Olson, 1986; Kane, Folias, & Napoli, 2008; Karadas, Surai, Sparks, & Grammenidis, 2005; Kim & Quadro, 2010; Satomura, Kimura, & Itokawa, 1992; Shintaku, Murata, Yamaguchi, & Makita, 1998; Tatum & Chow, 2005). However, most of these methods involve the use of more than one solvent under gradient conditions, which increases the cost of analysis. None of these tests used a 100% methanol mobile phase in an isocratic elution process.

Our study aimed to develop and validate a rapid and cheap method to extract and detect retinol in chicken liver using high-performance liquid chromatography (HPLC).

2. Material and Methods

2.1. Reagents and Chemicals

The all-*trans* retinol standard was acquired from Sigma-Aldrich, with $\geq 95\%$ purity. The standard was stored according to the label instructions.

HPLC grade methanol was purchased from J. T. Baker. Other reagents including absolute ethanol (99.8%) and ethanol (95%) were acquired from Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro/RJ), and hexane was obtained from Merck S.A. (Cotia/SP).

2.2. Instrumentation

The HPLC instrument consisted of an LC-20 AT pump coupled to an SPD-20A UV-VIS detector and a Rheodyne injection valve with a 20 μL loop. A Hamilton syringe for manual injection with 100 mL capacity and a computer with the *LCsolution* software for data acquisition and processing were used.

2.3. Chromatographic conditions

The chromatographic separation was performed with a reversed phase column (Luna 5u C18 (2) 100A Phenomenex®, 250 mm \times 4.6 mm) kept at a temperature of 23 °C. The UV-VIS detector was set to monitor the retinol absorbance at 325 nm.

The mobile phase used for the analysis of retinol in the samples was methanol (100%) in an isocratic system with a flow of 1 mL/min for retinol.

Before use, the equipment was maintained under initial conditions with a flow rate of 1 mL/min of methanol (100%) for 30 min.

2.4. Stock and working solution preparation

The retinol solution standard was prepared by weighing 1.0 mg of retinol (Sigma) in an Eppendorf tube, followed by dilution in 1.0 mL of absolute ethanol and stirring for 1 min. Then, two further dilutions were carried out to reach an approximate concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2). A spectrophotometer (U-2000 model from Hitachi) and quartz cuvettes were used for absorbance measurement.

The concentration of the standard was confirmed by the specific extinction coefficient of retinol in absolute ethanol (ϵ 1%, 1 cm in ethanol = 1780 at 325 nm) (Milne & Botnen, 1986; Solomons, 2012).

After confirmation of the real concentration of the standard, a new dilution was performed from the reading standard in absolute ethanol (Figure 3), resulting in an approximate concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 ng/1 μL) for use in HPLC.

2.5. Sample Preparation

For the analysis of retinol in frozen chicken liver, 1 kg of fresh chicken liver was purchased at a supermarket in Natal, Brazil. The chicken liver was placed in a blender (Arno model) together with one liter of brine solution (NaCl, 0.9%), forming a homogenate at 50%. Falcon tubes were filled with 1 g of the homogenate and stored on a freezer at -18 °C for 0, 1, 15, and 30 days.

2.5.1. Extraction of retinol from chicken liver

The extraction of retinol in chicken liver was performed according to Hosotani and Kitagawa (2003) and described below.

One milliliter of ethanol (95%) was added to each Falcon tube containing 1 g of the homogenate in order to precipitate the proteins present in the sample.

Before lipid extraction, saponification was achieved by adding 1 mL of potassium hydroxide (KOH, 50%) and the samples were placed in a water bath at 60 °C for 1 hour under stirring in order to hydrolyze the retinyl esters present in the samples.

For lipid extraction, the samples were washed with 2 mL of hexane and stirred for 1 min, and then were left standing for 5 min. The supernatant was then placed in a new tube, and this process was repeated twice, resulting in a final volume of approximately 6 mL of hexane. An aliquot of 250 µL of hexane was taken, placed in another 5 mL-polypropylene tube and evaporated to dryness in a water bath at 37 °C under nitrogen atmosphere (*White Martins*®). The samples were then stored at -18 °C under nitrogen atmosphere, and protected from light. Before HPLC processing, the samples were redissolved in 1 mL of absolute ethanol, and 20 µL of the samples was then used for HPLC. The measurements were carried out in duplicate and the average was calculated over the two obtained areas.

2.5.2. Retinol identification

The identification and quantification of retinol in the samples was evaluated by comparison of the areas in the chromatographic profile with the areas of the all-*trans* retinol pattern.

2.5.3. Validation

The validation of the method was performed according to the current FDA guidelines, i.e., the Guidelines on Bioanalytical Method Validation (FDA - Food and Drug Administration, 2013).

2.5.4. Linearity

The linearity of the method is the instrumental response of the linear calibration relationship (obtained area) with the concentration of the standard, being satisfactory when the correlation coefficient is close to 1 (Brito, Amarante Jr, Polese, & Ribeiro, 2003).

Six different dilutions of the retinol standard were used for application in HPLC. Next, the plot of the linear equation was built from their respective areas, and a straight line equation was obtained through linear regression (peak area *versus* concentration of the standard).

2.5.5. Stability

The stability of the retinol stock standard was determined in triplicate with aliquots that were stored in a freezer at -18 °C and evaluated in cycles of 1, 15, and 30 days.

In order to evaluate the stability of retinol in the chicken liver samples, the latter were stored in a freezer at -18 °C and assessed in thawing cycles at room temperature (24 °C) for 8 hours after 1, 15, and 30 days.

2.5.6. Precision

The precision of the method was analyzed through a repeatability test. For the assessment of the intra-precision, five replicates at three different retinol concentrations in the range of 2.0–5.0 µg/mL were prepared and analyzed in the same day.

For the assessment of the inter-precision, the intra-precision measurement was repeated for five consecutive days. The coefficient of variation (CV) was calculated from the standard deviation of the mean and expressed as a percentage.

2.5.7. Accuracy

The accuracy of the method was evaluated by a recovery test. Known amounts of the retinol standard solution were added in triplicate at three different concentrations (4036, 8072, and 12108 ng/mL) to the chicken liver samples. These samples were subjected to the same retinol extraction method and analyzed by HPLC. The recovery was calculated by the ratio of the sample peak area and the standard solution peak area added 100 times, and expressed as a percentage.

2.5.8. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

In order to determine the LOD and LOQ, several injections were performed at decreasing concentrations. The lowest detectable, but not quantifiable concentration is the LOD. This in turn was detected by a visual method using a matrix after addition of known concentrations so that the analytical signal was distinguished from the noise for the lowest detectable concentration (Ribani, Bottoli, Collins, Jardim, & Melo, 2004).

The lowest concentration that can be quantified with acceptable precision and accuracy is the LOQ. This was detected when the analytical signal was identified in the lowest equivalent dilution (Ribani et al., 2004).

3. Results and discussion

The use of HPLC has become a common method for the quantification of vitamins and minerals because of its sensitivity and accuracy. The development of methods based on HPLC presents many advantages such as speed, resolution power, the reduction of the amount of sample and solvent used, and low cost; thus encompassing several environmental benefits (Chen & Kord, 2009).

3.1. Linearity

Six different dilutions of the retinol standard (3.37 ng/20 μ L, 6.75 ng/20 μ L, 13.49 ng/20 μ L, 26.98 ng/20 μ L, 53.96 ng/20 μ L, and 107.92 ng/20 μ L) were applied for HPLC.

The linear plot was built from their respective areas (26.426, 55.687, 119.135, 238.471, 498.955, and 989.117). The equation of the straight line obtained by linear regression, with $R^2 = 0.9999$, is shown in Figure 4, illustrating the linear relationship of peak area *versus* concentration of the standard.

3.2. Stability

The retinol stock solution standard was stable for at least 30 days. The area of the standard peak was compared to the value of the area of the peak in the chromatogram measured on a particular day, yielding a stable average value of 93.2%.

The stability of retinol in the freeze–thawing process of chicken liver samples was determined to be at least 30 days, yielding a stable average value of 97.5%.

3.3. Precision

The intra- and inter-precision data for the method are shown in Table 1. Values below 15% are considered acceptable (FDA - Food and Drug Administration, 2013). As it can be seen, the precision values of the present method were all found to be below 15%.

3.4. Accuracy

The accuracy of the method was assessed through the recovery of the standard added to chicken liver samples at three different concentrations. The results are summarized in Table 2.

The average recovery ranged between 93% and 101.2%, while the coefficient of variation for the recovery ranged between 0.36 and 0.98. The results indicate that the method is precise for the determination of retinol in chicken liver.

3.5. LOD and LOQ

The limit of detection and limit of quantification are shown in Table 3. The values of sensitivity are satisfactory for the precise determination of retinol in chicken liver.

3.6. Applicability of the method

The applicability of the method was verified using liver samples subjected to retinol extraction. A stock standard solution of retinol (with a concentration of 1217 ng/mL) was added to one of the samples (what is called 'spiking') to assess the suitability of the method and peak separation. Figures 5 and 6 show the resulting chromatograms, where the successful separation of the analytes can be observed.

4. Conclusions

It was possible to identify and quantify the amount of retinol in chicken liver samples using reverse phase HPLC coupled with UV-VIS detection of its absorbance at 325 nm using an isocratic method with a single mobile phase (methanol 100%), resulting in an average retention time of 5.2 minutes.

The analytical method developed in this study is consistent with its function and with the current legislation policy, being economical, quick, easy, and suitable for its proposal.

Acknowledgements

The authors thank FAPERN, CAPES and PPG/UFRN for financial support.

References

- Almeida-Muradian, L. B. de, & Penteado, M. de V. C. (2003). Vitamina A. In *Vitaminas. Aspectos Nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. (1st ed., pp. 55 – 74). Barueri/SP: Manole.
- Brasil, & Ministério da Saúde. (2009). *Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher. PNDS - 2006: Dimensões do Processo Reprodutivo e da Saúde da Criança*. Centro Brasileiro de Análise e Planejamento. Série G. Estatística e Informação em Saúde. Retrieved from http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf
- Brito, N. M., Amarante Jr, O. P., Polese, L., & Ribeiro, M. L. (2003). Validação De Métodos Analíticos : Estratégia E Discussão. *Revista de Ecotoxicologia E Meio Ambiente*, 13,

129–146.

- Chen, S., & Kord, A. (2009). Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra-high-performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, *1216*(34), 6204–9. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.084>
- FDA - Food and Drug Administration. (2013). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. *U.S. Department of Health and Human Services*, 22. <http://doi.org/http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf>
- Furr, H. C., Cooper, D. A., & Olson, J. A. (1986). Separation of retinyl esters by non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, *378*(1), 45–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3733982>
- Gallagher, M. L. (2010). Os Nutrientes e Seu Metabolismo. In M. Gallagher (Ed.), *Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia*. (p. 68). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Hosotani, K., & Kitagawa, M. (2003). Improved simultaneous determination method of beta-carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *791*(1-2), 305–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798190>
- Howells, L. C., & Livesey, C. T. (1998). A survey of vitamin A concentrations in the liver of food ~~Food Additives and Contaminants~~ *Food Additives and Contaminants*, *15*(1), 10–18. <http://doi.org/10.1080/02652039809374595>
- Institute of Medicine (IOM). (2001). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc : a report of the Panel on Micronutrients. *Nutrition Reviews*, *55*(9), 319–326. <http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1997.tb01621.x>
- Jaśkiewicz, T., Sagan, A., & Puzio, I. (2014). Effect of the *Camelina sativa* oil on the performance, essential fatty acid level in tissues and fat-soluble vitamins content in the livers of broiler chickens. *Livestock Science*, *165*, 74–79. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.003>
- Kane, M. A., Folias, A. E., & Napoli, J. L. (2008). HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Analytical Biochemistry*, *378*(1), 71–79. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2008.03.038>
- KANG, K. R., CHERIAN, G., & SIM, J. S. (2006). Tocopherols, Retinol and Carotenes in Chicken Egg and Tissues as Influenced by Dietary Palm Oil. *Journal of Food Science*, *63*(4), 592–596. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15792.x>
- Karadas, F., Surai, P. F., Sparks, N. H. C., & Grammenidis, E. (2005). Effects of maternal dietary supplementation with three sources of carotenoids on the retinyl esters of egg yolk and developing quail liver. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *140*(4), 430–435. <http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.02.005>
- Kim, Y.-K., & Quadro, L. (2010). Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Retinol and Retinyl Esters in Mouse Serum and Tissues (pp. 263–

- 275). http://doi.org/10.1007/978-1-60327-325-1_15
- Majchrzak, D., Fabian, E., & Elmadfa, I. (2006). Vitamin A content (retinol and retinyl esters) in livers of different animals. *Food Chemistry*, 98(4), 704–710. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.035>
- Milne, D. B., & Botnen, J. (1986). Retinol, alpha-tocopherol, lycopene, and alpha- and beta-carotene simultaneously determined in plasma by isocratic liquid chromatography. *Clinical Chemistry*, 32(5), 874–876.
- Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., & Melo, L. F. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771–780. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- Satomura, Y., Kimura, M., & Itokawa, Y. (1992). Short Communication Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 625, 372–376.
- Saunders, C., Saúde, M. da, Secretaria de Atenção à Saúde, & Básica, D. de A. (2009). Boletim carências nutricionais: deficiência de vitamina A - DVA, (2), 8.
- Schindler, R., Scholz, M., & Feldheim, W. (1987). Quantitative determination of vitamin A in liver and liverwurst using high pressure liquid chromatography (HPLC). *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 185(3), 208–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3439346>
- Shintaku, T., Murata, T., Yamaguchi, K., & Makita, T. (1998). Detection of retinyl palmitate and retinol in the liver of mice injected with excessive amounts of retinyl acetate. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 60(4), 471–7. <http://doi.org/10.1292/jvms.60.471>
- Solomons, N. W. (2012). Vitamin A. In J. W. E. Jr., I. A. Macdonald, & S. H. Zeisel (Eds.), *Present Knowledge in Nutrition* (10th ed., pp. 149–185). International Life Sciences Institute (ILSI).
- Surai, P. F., & Kuklenko, T. V. (2000). Effects of Vitamin A on the Antioxidant Systems of the Growing Chicken. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 13(9), 1290–1295. <http://doi.org/10.5713/ajas.2000.1290>
- Tatum, V., & Chow, C. K. (2005). Rapid Measurement of Retinol , Retinal , 13-Cis-Retinoic Acid and All-Trans-Retinoic Acid by High Performance, 13(3), 256–259.
- Torres, E. A. F. S., Okani, E. T., Roviello, A., Guariero, E. H., & Campos, N. C. (1998). Teor em vitamina A, de alguns alimentos distribuidos na cidade de São Paulo. *Higiene Alimentar*, 12(54), 58–61.
- Yuyama, L. K. O., Marinho, H. A., Alencar, F. H., Yonekura, L., & Cozzolino, S. M. F. (2012). Vitamina A (Retinol) e Carotenóides. In *Biodisponibilidade de nutrientes*. (4th ed., pp. 297 – 342). Barueri/SP: Manole.

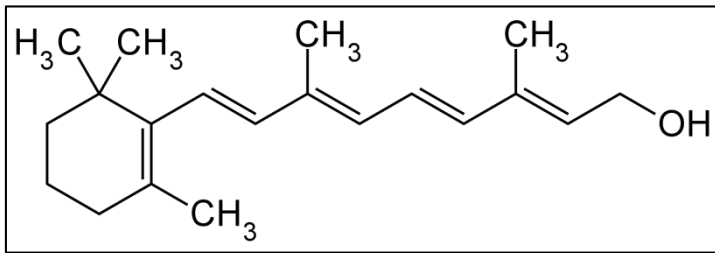


Figure 1. Chemical structure of retinol.

Stock standard	→	1.0 mg of retinol + 1 mL of absolute ethanol (1000 µg/mL)
Work standard 1	→	0.1 mL of stock standard + 0.9 mL of absolute ethanol (100 µg/mL)
Reading standard	→	
Spectrophotometer reading	→	Blank → absolute ethanol
		Reading → ~1 mL of the reading standard
		0.1 mL of work standard 1 + 0.9 mL of absolute ethanol (10 µg/mL)

Figure 2. Methodology for the preparation of the reading standard.

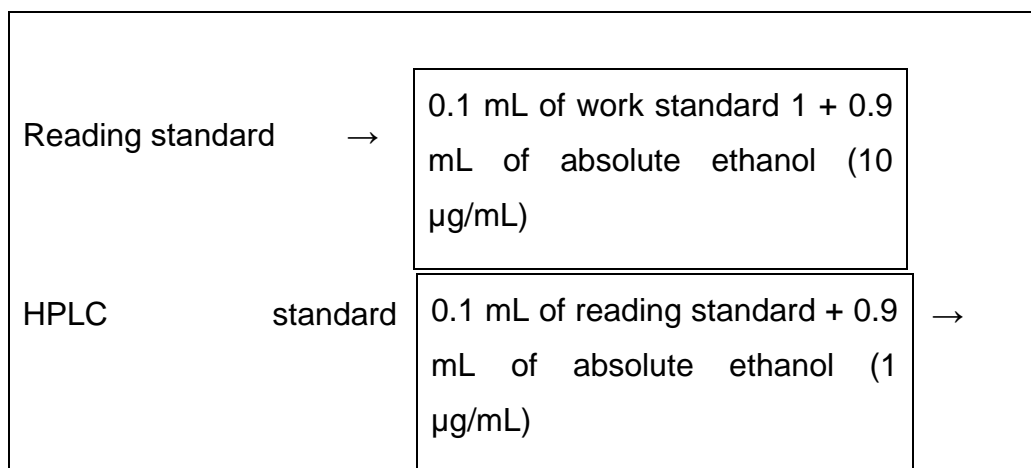


Figure 3. Methodology for the preparation of the HPLC standard.

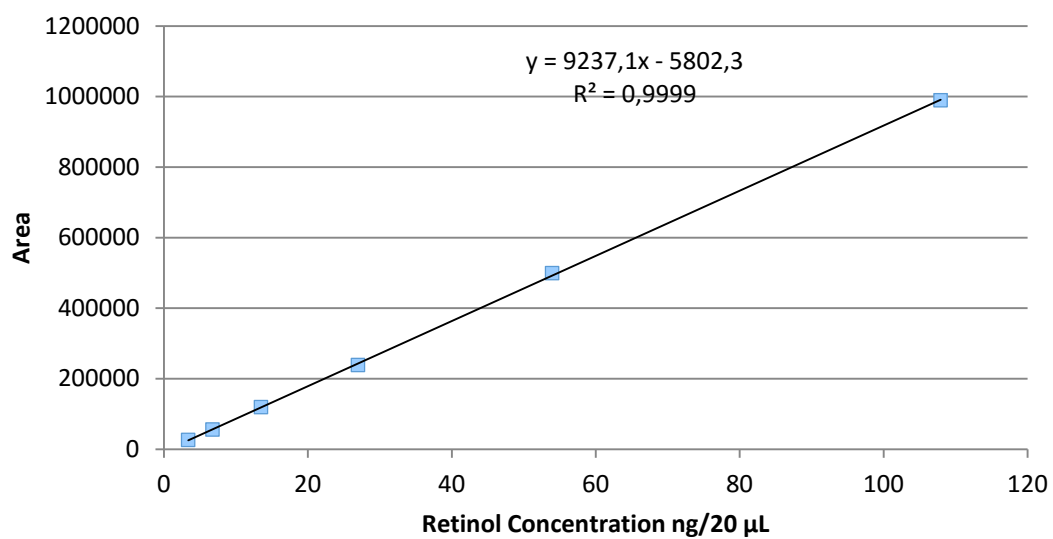


Figure 4. Calibration curve and linear equation obtained by analyzing different concentrations of the retinol standard with HPLC.

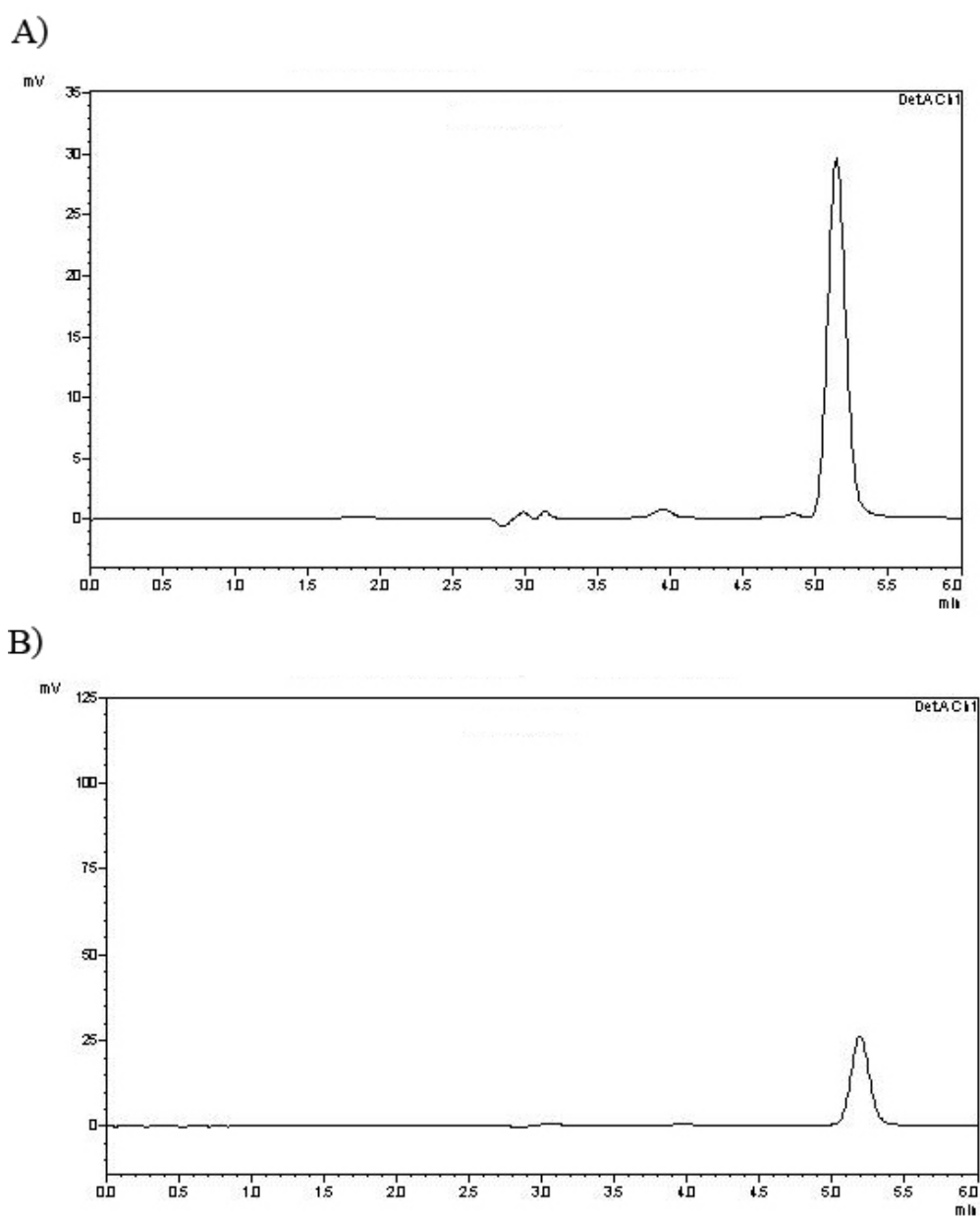


Figure 5. HPLC elution profile of retinol. A) All-*trans* retinol chromatogram of a 24.35 ng/20 μ L sample. B) Chromatogram of a chicken liver sample subjected to retinol extraction.

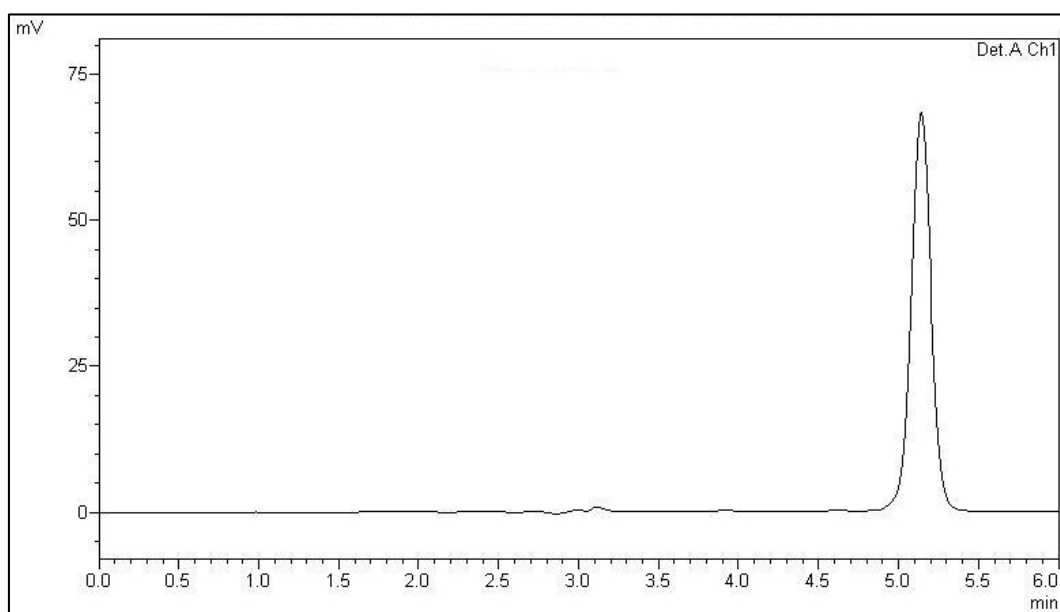


Figure 6. Chromatogram of a spiked sample of chicken liver with an all-*trans* retinol standard (1217 ng/mL).

Analyte	Intra-precision		Inter-precision	
	$\mu\text{g/mL}$	CV (%)	$\mu\text{g/mL}$	CV (%)
Retinol	2.0	3.0	2.0	9.7
	4.0	2.3	4.0	14.2
	5.0	7.8	5.0	12.2

Table 1. Intra- and inter-precision of the method for the determination of retinol (CV: coefficient of variation)

Concentration of the standard added (ng/mL)	Recovery (%)	CV (%)
4036	93	0.98
8072	98.5	0.36
12 108	101.2	0.91

Table 2. Recovery values of the method for the determination of retinol

Parameter	Concentration (ng/mL)
LOD	9.1
LOQ	18.26

Table 3. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of retinol

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Valores de retinol variaram, significativamente, entre as três marcas de fígados de galinhas de granja analisadas e nos valores de fígados de galinhas caipiras. Os valores de retinol em fígados de granja nas tabelas de composição de alimento como a TACO (2011), USDA (2008), IBGE (2008-2009) e Franco (1998) foram menores do que visto neste estudo, com exceção da Tucunduva (2002).

Perdas significativas foram observados em processos de cocção utilizando forno por 35 minutos a 200 °C, assim como em processo de micro-ondas na função descongelamento por 1 minuto.

Os resultados encontrados nesse estudo mostram que o fígado de galinha pode ser utilizado em programas de saúde pública, como o combate a DVA, dado que é um alimento de baixo custo, fácil aquisição e que apesar da perda significativa de vitamina A em processos de cocção e descongelamento, o consumo de uma única porção usual de 88g de fígado de galinha assado ainda pode contribuir de 6 até 20 vezes as necessidades diárias de vitamina A. Sendo mais expressivo ainda quando o consumo é de fígado de galinha caipira, quando o valor de contribuição atinge 29 até 88 vezes as necessidades diárias de vitamina A. Ressalta-se assim a importância de se discriminar o tipo (raça/espécie/criação) de fígado de galinha nas tabelas de composição de alimentos, assim como informações relacionando o processamento térmico com possíveis perdas nutricionais.

A modificação sugerida para o método de análise de retinol em fígado de galinha foi validada e originou um método mais simples, com menor custo, seguro, sendo preciso e exato para a análise de retinol nesse tipo de alimento.

Cabe ressaltar que intentou-se ao longo do desenvolvimento deste projeto a busca pela informação do modo de criação e do tipo da alimentação do frango/galinha juntamente com sua composição química de modo que se tentasse explicar as diferenças significativas entre os diferentes lotes de cada marca. Entretanto, nenhuma das empresas informaram algo a esse respeito em seu Serviço de Atendimento ao Cliente.

Espera-se, como perspectivas futuras, a busca dos dados que superem as limitações deste estudo, como a busca de informações sobre a dieta do frango, sua raça e seu modo de criação, para que assim seja elucidado informações importantes sobre a composição química deste tipo de alimento.

O presente projeto possibilitou a redação de dois artigos originais e perspectivas para publicações em congressos científicos, além de ter possibilitado a inserção de dois alunos na Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

1. Crawford RD. Poultry Breeding and Genetics: Developments in Animal and Veterinary Sciences. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1990.
2. Fumihito A, Miyake T, Takada M, Shingu R, Endo T, Gojobori T, et al. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. [Internet]. 1996 Jun 25 [cited 2015 Aug 7];93(13):6792–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39106&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Underhill AP. Current Issues in Chinese Neolithic Archaeology. J. World Prehistory. 1997;11:103–160.
4. Lana GRQ. Avicultura. 1st ed. Campinas: Livaria e Editora Rural LTDA.; 2000.
5. Moreng RE, Avens JS. Ciência e Produção de Aves. São Paulo: Roca; 1990.
6. Pereira JCC. Melhoramento Genético Aplicado À Produção Animal. Belo Horizonte: Fep Mvz Editora; 2001.
7. Albino LFT, Silva J, Vargas Júnior J. Criação de Frango e Galinha Caipira: Avicultura alternativa. Viçosa: Aprenda Fácil; 2005.
8. Albino LFT, Moreira P. Criação de frango e galinha caipira. Viçosa: Centro de Produções Técnicas – CPT; 2006.
9. Central de Inteligência de Aves e Suínos (CIAS). A avicultura no Brasil [Internet]. 2010. Available from: http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?view=article&catid=5%3Aaves-publico&id=13%3Aorigem-dos-frangos&format=pdf&option=com_content&Itemid=15
10. Filho PH. Efeito de fatores genéticos e do sistema de criação sobre o desempenho e o rendimento de carcaça de frangos tipo caipira. 2002;
11. National Development Bank (BNDES). Relato setorial avicultura [Internet].

1995. Available from:

http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/relato/rsfrango.pdf

12. United States Department of Agriculture (USDA). Production, supply and distribution. Broiler Meat Selected Countries Summary . [Internet]. 2015. Available from:
<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Broiler+Meat+Selected+Countries+Summary&hidReportRetrievalID=942&hidReportRetrievalTemplateID=7>
13. Ordóñez Pereda JA, Rodríguez MIC, Álvares LF, Sanz MLG, Minguillón GDG de F, Perales L de la H, et al. Conservação pelo frio. In: Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos. Vol. 1. Porto Alegre/RS: ARTMED; 2005. p. 155–196.
14. Akase T, Yamashina S, Akase T, Onodera S, Okuda H, Tashiro S. Effects of liver-supplemented food on the development of embryos in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2003;26(4):553–556.
15. Monte AL de S, Selaive-Villaruel AB, Oliveira AN de, Perez JRO, Fuentes Zapata JF, Ramos RE. Rendimento das vísceras de cabritos mestiços anglo x SRD e Boer x SRD. *Ciência e Agrotecnologia* [Internet]. 2007 Feb;31(1):223–227. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000100033&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
16. McCOLLUM E V., DAVIS M. THE NECESSITY OF CERTAIN LIPINS IN THE DIET DURING GROWTH. *Nutr. Rev.* [Internet]. 2009 Apr 27;31(9):280–281. Available from: <http://nutritionreviews.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1753-4887.1973.tb07065.x>
17. Osborne TB, Mendel LB. The Relation of The Rate of Growth to Diet I. *J. Biol. Chem.* 1926;(69):661–673.
18. Chagas MH de C, Flores H, Campos F de AC e S, Santana RA de, Lins ECB.

- Teratogenia da vitamina A. Rev. Bras. Saúde Matern. Infant. [Internet]. 2003 Sep;3(3):247–252. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292003000300003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
19. Gallagher ML. Os Nutrientes e Seu Metabolismo. In: Gallagher M, editor. Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 68.
 20. Gomes MM, Saunders C, Accioly E. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. Rev. Bras. Saúde Matern. Infant. [Internet]. 2005 Sep;5(3):275–282. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292005000300003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 21. Institute of Medicine (IOM). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc : a report of the Panel on Micronutrients. Nutr. Rev. [Internet]. 2001 Apr 27;55(9):319–326. Available from:
<http://nutritionreviews.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1753-4887.1997.tb01621.x>
 22. Ramalho A. Vitamina A. In: Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes. São Paulo: ILSI - International Life Sciences Institute do Brasil; 2010.
 23. World Health Organization (WHO). Indicators for assessing Vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes [Internet]. Geneva World Heal. Organ. 1996;66. Available from:
http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/vitamin_a_deficiency/WHONUT96.10.pdf?ua=1
 24. Saunders C, Saúde M da, Secretaria de Atenção à Saúde, Básica D de A. Boletim carências nutricionais: deficiência de vitamina A - DVA. 2009;(2):8.
 25. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO). Human Vitamin and Mineral Requirements. Rome: 2001.

26. Sommer A, Davidson FR. Assessment and control of vitamin A deficiency: the Annecy Accords. *J. Nutr.* 2002;132(9 Suppl):2845S–2850S.
27. Martins MC, Oliveira YP de, Coitinho DC, Santos LMP. Panorama das ações de controle da deficiência de vitamina A no Brasil. *Rev. Nutr.* [Internet]. 2007 Feb;20(1):5–18. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732007000100001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
28. Santos EN dos, Velarde LGC, Ferreira VA. Associação entre deficiência de vitamina A e variáveis socioeconômicas, nutricionais e obstétricas de gestantes. *Cien. Saude Colet.* [Internet]. 2010 Jun;15:1021–1030. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232010000700008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
29. Mason JB, Lotfi M, Dalmiya N, Sethuraman K, Deitchler M. The Micronutrient Report. Current Progress and Trends in the Control of Vitamin A, Iodine, and Iron Deficiencies [Internet]. Ottawa, Canada: 2001. Available from: www.micronutrient.org
30. Lorch A. Vitamin A deficiency: diverse causes, diverse solutions. 2005.
31. World Health Organization (WHO). Micronutrient deficiencies. Vitamin A deficiency. [Internet]. [cited 2015 Jul 7]; Available from: <http://www.who.int/nutrition/topics/vad/en/>
32. Brasil, Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher. PNDS - 2006: Dimensões do Processo Reprodutivo e da Saúde da Criança. [Internet]. 2009. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf
33. McLaren DS, Frigg M. Manual de ver y vivir sobre los trastornos por deficiencia de vitamina A (VADD). *Organ. Panam. la Salud - OPS.* 1999;144.
34. TORRES EAF., CAMPOS NC, DUARTE M, GARBELOTTI ML, PHILIPPI ST, MINAZZI-RODRIGUES RS. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. *Ciência e Tecnol. Aliment.* [Internet]. 2000

- Aug;20(2):145–150. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612000000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
35. Taco. Tabela brasileira de composição de alimentos. NEPA - Unicamp. 2011;161.
 36. Majchrzak D, Fabian E, Elmadfa I. Vitamin A content (retinol and retinyl esters) in livers of different animals. *Food Chem.* [Internet]. 2006 Jan;98(4):704–710. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605005728>
 37. Howells LC, Livesey CT. A survey of vitamin A concentrations in the liver of food-producing animals. *Food Addit. Contam.* [Internet]. 1998 Jan;15(1):10–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9534868>
 38. Torres EAFS, Okani ET, Roviello A, Guariero EH, Campos NC. Teor em vitamina A, de alguns alimentos distribuidos na cidade de São Paulo. *Hig. Aliment.* 1998;12(54):58–61.
 39. Schindler R, Scholz M, Feldheim W. Quantitative determination of vitamin A in liver and liverwurst using high pressure liquid chromatography (HPLC). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* [Internet]. 1987 Sep;185(3):208–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3439346>
 40. Jaśkiewicz T, Sagan A, Puzio I. Effect of the Camelina sativa oil on the performance, essential fatty acid level in tissues and fat-soluble vitamins content in the livers of broiler chickens. *Livest. Sci.* [Internet]. 2014 Jul;165:74–79. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871141314001838>
 41. KANG KR, CHERIAN G, SIM JS. Tocopherols, Retinol and Carotenes in Chicken Egg and Tissues as Influenced by Dietary Palm Oil. *J. Food Sci.* [Internet]. 2006 Jul 20;63(4):592–596. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15792.x>
 42. Philippi ST. Tabela de Composição de Alimentos: suporte para decisão nutricional. 2nd ed. São Paulo: Coronário; 2002.

43. Alves NEG, Paula LR de, Cunha AC da, Amaral CAA, Freitas MT de. Efeito dos diferentes métodos de cocção sobre os teores de nutrientes em brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(4):507–513.
44. McCollum E, Davis M. The necessity of certain lipins in the diet during growth. *J Biol Chem*. 1913;15:167.
45. Chagas MHC, Flores H, Campos FACS, Santana RA, Lins ECB. Teratogenia da vitamina A. *Rev. Bras. Saúde Mater. Infant*. 2003;3(3):247–252.
46. Solomons NW. Vitamin A. In: Jr. JWE, Macdonald IA, Zeisel SH, editors. *Present Knowledge in Nutrition*. International Life Sciences Institute (ILSI); 2012. p. 149–185.
47. Moreno FS, Horst MA. Carotenoides. In: *Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes*. São Paulo: ILSI - International Life Sciences Institute do Brasil; 2009. p. 36.
48. Kurahashi N, Inoue M, Iwasaki M, Tanaka Y, Mizokami M, Tsugane S. Vegetable, fruit and antioxidant nutrient consumption and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study in Japan. *Br. J. Cancer*. 2009;100(1):181–184.
49. XU X, CLARK J, MO J, CHOINIERE J, FORSTER C, ERICKSON G, et al. *Biodisponibilidade de Nutrientes*. São Paulo: Manole; 2009.
50. Alaluf S, Heinrich U, Stahl W, Tronnier H, Wiseman S. Dietary carotenoids contribute to normal human skin color and UV photosensitivity. *J. Nutr*. 2002;132(3):399–403.
51. Machlin LJ. *Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical, and Clinical Aspects*. *J. Nutr*. 1987;117(2):397.
52. Azais-braesco V, Pascal G. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:1325–1333.
53. Rivlin RS, Shils ME, Sherlock P. Nutrition and cancer. *Am. J. Med.* [Internet]. 1983 Nov;75(5):843–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6416066>

54. Guillard JC, Lequeu B. As Vitaminas: do Nutriente ao Medicamento. São Paulo: Santos; 1995.
55. Furr HC, Green MH, Haskell M, Mokhtar N, Nestel P, Newton S, et al. Stable isotope dilution techniques for assessing vitamin A status and bioefficacy of provitamin A carotenoids in humans. *Public Health Nutr.* 2005;8(6):596–607.
56. Campos FM, Rosado GP. Novos fatores de conversão de carotenóides provitamínicos A. *Ciência e Tecnol. Aliment.* [Internet]. 2005 Sep;25(3):571–578. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000300029&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
57. Haskell MJ. The challenge to reach nutritional adequacy for vitamin A: beta-carotene bioavailability and conversion - Evidence in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012;96(5).
58. BLANER CO, OLSON JA. Retinol and retinoic acid metabolism. In: SPORN MB, ROBERTS AB, GOODMAN DS, editors. *The retinoids: biology, chemistry and medicine.* New York: Raven; 1994. p. 229–255.
59. Vliet T van, Boelsma E, Vries AJ de, Berg H van den. Retinoic acid metabolites in plasma are higher after intake of liver paste compared with a vitamin A supplement in women. *J. Nutr.* [Internet]. 2001 Dec;131(12):3197–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739865>
60. Organização Mundial de Saúde. Vitamina A na gestação e na lactação: recomendações e relatório de uma consultoria. A Organ. *Série Micronutr.* [Internet]. 2001;42. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vitaminaa_gestacao_lactacao_relatorio_consultoria.pdf
61. MOUNOUD R, KLEIN D, WEBER F. A propos d'un cas de syndrome de Goldenhar: intoxication aigue a la vitamine A chez la mere opendant la grossesse. *J. Genet. Hum.* 1975;23:135–154.
62. AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS.

- Committee Opinion: committee on obstetrics-maternal and fetal medicine. 1993.
63. Dutch Health Council/Nutrition Council Committee. Vitamin A and teratogenicity. Netherland: 1994.
 64. BAUERNFEIND JC. The safe use of vitamin A. A report of the International Vitamina A Consultative Group (IVACG). Nutrition Foundation. Washington, D. C.: 1980.
 65. Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen U-SDT, Mannino S, Milunsky A. Teratogenicity of High Vitamin A Intake. *N. Engl. J. Med.* [Internet]. 1995 Nov 23;333(21):1369–1373. Available from:
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199511233332101>
 66. ARMSTRONG RB. General and reproductive toxicology of retinoids. In: SPORN MB., ROBERTS AB, GOODMAN D., editors. *The retinoids: biology, chemistry, and medicine.* New York: Raven; 1994.
 67. Blomhoff R. Vitamin A and carotenoid toxicity. *Food Nutr. Bull.* 2001;22(3):320–334.
 68. Padovani RM, Amaya-Farfán J, Colugnati FAB, Domene SMÁ. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. *Rev. Nutr.* [Internet]. 2006 Dec;19(6). Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732006000600010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 69. Geraldo RRC, Paiva SAR, Pitas AMC da S, Godoy I, Campana ÁO. Distribuição da hipovitaminose A no Brasil nas últimas quatro décadas: ingestão alimentar, sinais clínicos e dados bioquímicos. *Rev. Nutr.* [Internet]. 2003 Dec;16(4). Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732003000400008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 70. West KP. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. *J. Nutr.* 2002;132(9 Suppl):2857S–2866S.

71. Silva PT da, Lopes MLM, Valente-Mesquita VL. Efeito de diferentes processamentos sobre o teor de ácido ascórbico em suco de laranja utilizado na elaboração de bolo, pudim e geléia. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 2006 Sep;26(3):678–682.
72. Sáiz-Abajo M-J, González-Ferrero C, Moreno-Ruiz A, Romo-Hualde A, González-Navarro CJ. Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. *Food Chem.* 2013 Jun;138(2-3):1581–7.
73. Colla LM, Prentice-hernández C. Congelamento e Descongelamento - Sua Influência sobre os Alimentos. *Vetor.* 2003;13:53–66.
74. Correia LFM, Faraoni AS, Sant’ana HMP. Efeitos do processamento industrial de alimentos na estabilidade de vitaminas. *Alim. Nutr.* 2008;19(1):83–95.
75. BRASIL. LEI No 10.831, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2003. 2003;
76. Korin. Frango Orgânico [Internet]. Produtos. 2016;Available from: <http://www.korin.com.br/produtos/frango/frango-organico/>
77. EMBRAPA. Galinha Caipira - Validação do Sistema Alternativo de Criação de Galinha Caipira [Internet]. *Agric. Fam.* 2002;Available from: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/AgriculturaFamiliar/RegiaoMeioNorteBrasil/GalinhaCaipira/index.htm>
78. Souza NA de, Oliveira JF de, Holanda JS de, Chagas MCM das, Filho JA. Sistema de Produção de Aves Caipira. 2010.
79. Bolton DJ, Meally a., Blair IS, McDowell D a., Cowan C. Food safety knowledge of head chefs and catering managers in Ireland. *Food Control* [Internet]. 2008;19(3):291–300. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507000771>
80. Karabudak E, Bas M, Kiziltan G. Food safety in the home consumption of meat in Turkey. *Food Control* [Internet]. 2008;19(3):320–327. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507000977>
81. Hosotani K, Kitagawa M. Improved simultaneous determination method of

- beta-carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* [Internet]. 2003 Jul 5;791(1-2):305–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798190>
82. Milne DB, Botnen J. Retinol, alpha-tocopherol, lycopene, and alpha- and beta-carotene simultaneously determined in plasma by isocratic liquid chromatography. *Clin. Chem.* 1986;32(5):874–876.
83. FDA - Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. 2013;22.
84. Abranches MV, Lucia CM Della, Sartori MA, Pinheiro-Sant'ana HM. Perdas de vitaminas em leite e produtos lácteos e possíveis medidas de controle. *Aliment. e Nutr. Araraquara.* 2009;19(2):207–217.

APÊNDICES

APÊNDICE 1- Resultados complementares

Vitamina A em diferentes estágios da vida

A porcentagem de cobertura da vitamina A para as 3 diferentes marcas estão apresentadas na Tabela 2.

A Dietary Reference Intakes (DRI) é uma referência usualmente utilizada para as recomendações nutricionais diárias. Essas recomendações representam as quantidades de certos nutrientes que se acredita serem suficientes para satisfazer as necessidades conhecidas para praticamente todas as pessoas saudáveis americanas²¹.

Idade (anos)	Recomendação diária (µg)	Porcentagem de cobertura (%)*		
		Marca A	Marca B	Marca C
1 – 3	300	2684.8	1370.8	1743.5
4 – 8	400	2013.3	1028.1	1307.6
Mulheres > 14	700	1150.7	587.5	747.2
Homens > 14	900	894.9	456.9	581.2

*Considerando a ingestão da porção usual (2 unidades – 88 g de fígado de galinha).

Tabela 2. Porcentagem de cobertura da vitamina A do fígado de galinha de granja de diferentes marcas.

Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstraram uma contribuição de quase 9 vezes para homens acima de 14 anos, 11 vezes para mulheres acima de 14 anos, 20 vezes para crianças de 4 a 8 anos e de até quase 27 vezes para crianças de 1 a 3 anos, com a ingestão usual de uma única porção do fígado de galinha de

granja, da marca A, no dia.

Sendo o assamento o único processo de cocção no qual houve perda significativa, a Tabela 3 mostra a contribuição do fígado de galinha submetido ao processo de assamento sobre as necessidades diárias de vitamina A. O consumo de uma porção usual de 88g de fígado de galinha assado pode contribuir em até 6 vezes as necessidades diárias de vitamina A de um homem acima de 14 anos, e de até 20 vezes as necessidades diárias de crianças de 1 a 3 anos.

Idade (anos)	Recomendação diária (μg)	Porcentagem de cobertura (%)*
		Assado
1 – 3	300	2028,6
4 – 8	400	1521,5
Mulheres > 14	700	869,4
Homens > 14	900	676,2

*Considerando a ingestão da porção usual (2 unidades – 88 g de fígado de galinha).

Tabela 3. Contribuição do fígado de galinha assado nas necessidades diárias de vitamina A.

Os resultados são mais expressivos quando há o consumo de fígado de galinha caipira, sendo esse suprimento diário nas necessidades de vitamina A na ordem de 29 a 88 vezes (Tabela 4).

Idade (anos)	Recomendação diária (μg)	Porcentagem de cobertura (%)*
		Caipira
1 – 3	300	8827,8
4 – 8	400	6620,9
Mulheres > 14	700	3783,3
Homens > 14	900	2942,6

*Considerando a ingestão da porção usual (2 unidades – 88 g de fígado de galinha caipira).

Tabela 4. Contribuição do fígado de galinha caipira nas necessidades diárias de vitamina A.

Concentração de retinol em período de armazenamento

O valor médio de retinol encontrado nas amostras de fígado de galinha refrigerado foi de $6829,65 \pm 1216,82 \mu\text{g}/100\text{g}$ no tempo de armazenamento 0, referente ao dia de aquisição das amostras. Após um período de 15 dias ainda sob condições de refrigeração, o valor médio atingiu $5584,03 \pm 991,30 \mu\text{g}/100\text{g}$, já quando submetido há 30 dias sob temperatura de congelamento o valor médio atingiu $5481,47 \pm 885,56$, não demonstrando uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), embora representem uma redução de 19%, no método de resfriamento, compreendido entre 0 (T0) e 15 dias (T10) e 20% quando aplicado ao congelamento por 30 dias (T30). As concentrações de retinol nos fígados de galinha resfriado e congelado são mostradas na Tabela 4.

São escassas as informações sobre o efeito da refrigeração e do congelamento sobre o conteúdo de retinol no fígado de galinha, um desses poucos

estudos realizado por Santos *et al.* (2009) observou as concentrações de retinol em fígados de galinhas com diferentes linhagens e variados tempos de armazenamento, em seus resultados foram encontrados reduções significativas na linhagem Ross após 30 dias de armazenamento em temperatura de congelamento, quanto que a linhagem Cobb apresentou reduções mais significativas a partir dos 60 dias de estocagem.

A vitamina A está presente em diversos produtos alimentícios, suas perdas em alimentos envolvem diversos fatores, pesquisas realizadas em leite relatam que tais perdas poderiam estar associadas ao processo térmico e a estocagem a qual eles são submetidos, ainda assim poucos estudos se destinam a investigar a resistência das vitaminas frente às condições de coleta, transporte, processamento e estocagem do leite. Luz, temperatura, pH, presença de catalisadores encabeçam os inúmeros fatores associados a perdas vitamínicas⁸⁴

Tratamento	Período de estocagem (dias)					
	0		15		30	
	Retinol ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Perda (%)	Retinol ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Perda (%)	Retinol ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Perda (%)
Refrigerado	6829,65 \pm 1216,82	-	5584,03 \pm 991,30*	19	-	-
Congelado	-	-	-	-	5481,47 \pm 885,56*	20

Tabela 4. Concentração de retinol conforme período de armazenamento

O valor de cada linha corresponde à média \pm desvio padrão da triplicata. * significa que não diferem significativamente ($p > 0,05$) ao fígado resfriado no dia 0.