



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**



## **Determinação simultânea das vitaminas do complexo B em carne de bovino, por HPLC**

**Bárbara Daniela Tavares Neiva Vieira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutora Luísa Cristina Pereira Roseiro

Co-orientador: Doutor João Augusto Marques de Almeida

Co-orientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

### **Júri:**

Presidente: – Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: – Doutor Raul Filipe Xisto Bruno de Sousa, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

– Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

– Doutora Luísa Cristina Pereira Roseiro, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.

Lisboa, 2011

*“O carinho que dedicamos ao estudo prepara-nos para o futuro”*  
(Anónimo)

***Aos meus pais e irmãs***

## Agradecimentos

A realização do presente trabalho só foi possível graças ao contributo de várias entidades e de várias individualidades, sem as quais não conseguiria alcançar esta última etapa, nesta longa jornada académica. Pelo apoio particularmente relevante justifica-se um agradecimento especial:

Em primeiro lugar, os meus sinceros agradecimentos ao meu querido Instituto Superior de Agronomia, o qual permitiu a minha formação superior;

Igualmente importante, pois não seria possível a realização do trabalho, ao Instituto Nacional de Recursos Biológicos o meu muito obrigada pela disponibilidade do laboratório e as facilidades concedidas para a realização da parte experimental da presente dissertação de mestrado.

À Doutora Engenheira Cristina Roseiro, responsável pela Unidade de Indústrias Cárneas, minha orientadora, agradeço de um modo muito especial, pela sua inteira disponibilidade na realização dos ensaios experimentais e análise de resultados. Agradeço ainda o seu grande profissionalismo, conhecimentos científicos que me transmitiu, dedicação, incentivo, disponibilidade, amizade e paciência que sempre demonstrou.

Ao Engenheiro João Almeida, do INRB, meu co-orientador, obrigada pelo auxílio na análise de resultados e pelos esclarecimentos prestados.

Ao Professor Miguel Mourato, do ISA, meu co-orientador, pela amizade, disponibilidade e paciência sempre demonstrada ao longo deste trabalho. Obrigado pela leitura atenta da dissertação e por todos os conhecimentos científicos que me transmitiu desde o tempo em que fui sua aluna.

À Professora Luísa Louro, do ISA, pela amizade, paciência e por todos os conhecimentos que me transmitiu desde o primeiro ano, em que tive o prazer de ser sua aluna.

A todo o pessoal de laboratório do INRB, em particular à Engenheira Helena Gonçalves e à Engenheira Ana Gomes, pelas importantes “dicas laboratoriais”, opiniões e conselhos, pela simpatia e boa disposição expressa durante este trabalho.

À minha colega e amiga Mariana Duarte, o meu muito obrigada nem por isto nem por aquilo... Por tudo! Obrigado pela força demonstrada nestes últimos cinco anos e por teres partilhado comigo mais uma etapa da minha vida. Obrigado pelas palavras amigas, as maluquices partilhadas e por me teres sempre ouvido, até os meus devaneios.

Não menos importante, pelo contrário, um agradecimento muito especial aos meus queridos pais. Obrigada por tudo o que fizeram por mim, pelo incessante apoio, carinho,

força e incentivo demonstrado nos momentos mais difíceis e que foram imprescindíveis e fundamentais na motivação para a realização e conclusão do presente trabalho. Um obrigado também às minhas irmãs, pelas palavras amigas e toda a força transmitida.

À Ana Patrícia Santos, minha amiga não de sempre mas para sempre, o meu obrigado pela amizade e pelas palavras amigas e sábias, nos momentos em que pensava que não conseguia.

A todos os meus amigos, em particular...todos! Obrigado pela amizade, boa disposição, simpatia, disponibilidade e apoio sempre demonstrado ao longo dos anos. Obrigado pelas noites fantásticas e pelas palavras de incentivo.

... e a todos os que estão no meu coração!

## Resumo

O presente trabalho centrou-se na determinação simultânea das vitaminas B1, B2, B3, B5, B6, B9 e B12, em carne de bovino, com recurso a um simples e rápido método cromatográfico por HPLC.

Foram realizados vários ensaios a fim de se otimizar a técnica de extracção mais adequada e as melhores condições cromatográficas, para uma eficaz determinação das vitaminas.

Após a optimização da técnica de extracção e separação/quantificação procurou-se estabelecer relações entre o teor de vitamina presente na carne e as características dos animais em estudo.

Os resultados demonstram que o método de extracção é eficaz para as vitaminas B1, B2 e B6, uma vez que apresentaram taxas de recuperação dentro dos limites (61%; 55,5%; 76,4%, respectivamente). Em relação à linearidade, os coeficientes de correlação obtidos para todos os casos demonstram que o método possui uma correlação elevada.

O estudo mostrou ainda, que os teores médios das vitaminas são influenciados por vários factores.

Através deste estudo, pode-se concluir que é possível a determinação simultânea das vitaminas do complexo B, de modo rápido e simples.

Palavras – chave: RP – HPLC, Vitaminas hidrossolúveis, Carne, Extracção, Influência

## **Abstract**

The main objective of this study was the simultaneous determination of vitamins B1, B2, B3, B5, B6, B9 and B12 in beef, using a simple and rapid HPLC method. Several tests were conducted in order to optimize the extraction technique and the chromatographic conditions for an effective determination of those vitamins.

After the optimization of the extraction and separation/quantification procedures it was necessary to establish a relation between the content of the vitamin that exists in the meat and the characteristics of the animal in study.

The results show that the extraction method is effective for vitamins B1, B2 and B6, as the obtained recovery rates fall within the established limits (61.3%, 55,5%, and 76,4%, respectively). Regarding linearity, the correlation coefficients obtained for all cases show that the method has a high correlation.

The study also showed that the average levels of vitamins are influenced by several factors.

Through this study, we can conclude that the simultaneous determination of vitamins of the B complex is possible, using a fast and simple HPLC method.

Keywords: RP-HPLC, Water soluble vitamins, meat, extraction, influence

## Extended Abstract

Meat is one of the most appreciated food sources by the consumers, lying on the top of the food hierarchy. Having in mind that meat, essentially bovine, is a source of vitamin B, it becomes essential to determine its contribution to the food diet.

Vitamins are organic compounds that have diverse composition. Although they are necessary in just small amounts, they play a wide range of functions in our organism. The fact that most of them are not synthesized by the organism makes it necessary its ingestion through food, in order to prevent diseases resulting from the lack of this compound.

The traditional methods of determination require an individual analysis of vitamins, leading to a longer time of study. The present work focuses in the simultaneous determination of complex B vitamins in bovine meat, using a fast and simple HPLC method. In meat, the most adequate method for the analysis of vitamins is the reverse-phase chromatography (RP-HPLC). It was also necessary to optimize the technique and the chromatography conditions more appropriated to the extraction and determination of the vitamins.

The first stage of the optimization was the determination of the better extraction method for the meat vitamins. After several trials, with different enzymes and applied quantities, it was considered that the best extraction was made with the enzyme takadiastase. The methodology of analysis of vitamins from complex B was based on the procedures describe by Albalá-Hurtado et. al (1997), even though some changes were made in the composition of the mobile phase and in the running time. Several experiments were performed in order to be a mobile phase of 0,1% TFA in water and ACN in 100%, a flux of 0,3 and 0,5 ml/min, a volume of injection of 100 µl and a total running time of 25 minutes. the analysis by RP-HPLC was performed with a system of HPLC equipped with a silica reverse phase C18 column and photodiode detector.

After the optimization step, the separation/quantification of the vitamins in study was performed. For that purpose, samples from muscle Longissimus Dorsi (Ld) and Gluteus Medius (Gm) from twenty female animals, with dry and lactations, were collected. These factors allow determining the existence of a direct relation with the content of vitamins that exist in meat.

The results show that the method of extraction is effective concerning the vitamins B1, B2, B5 and B6, as they present recovery rates within acceptable limits (61%; 55,5%; 83,4%; 76,4%, respectively). The vitamins B9 and B12 presented very low recovery rates

because not all vitamins were adequately extracted from the samples. In future studies, it will be necessary to review the method of extraction, especially concerning those vitamins, taking into account their properties and sensitivities. Vitamin B3 presents a recovery rate superior to what was established (140,8%) possibly due to the existence of interferences.

Regarding the possibility of influence of many factors on vitamins contents present in the meat, it was found that were changes in values. The levels of vitamin B1 are influenced by the type of muscle, the number of lactations affects vitamin B2, B3 and B9, and the levels of B6 vary with the condition of production.

We can conclude that the main objective of this work, the simultaneous determination of vitamins B, was accomplished, since five of the vitamins were determined and showed a good linearity, limits of detection and quantification, and recovery rates. By making appropriate changes to the extraction, it is expected that all vitamins of the B complex can be determined.

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Extended Abstract .....	v
Índice .....	vii
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas .....	xi
Lista de Abreviaturas .....	xii
Enquadramento e Objectivos .....	xiv
I. Revisão Bibliográfica .....	1
1. Carne e o seu papel na alimentação .....	2
2. Qualidade da carne .....	4
3. Consumo de carne em Portugal .....	6
4. Sistemas de Produção .....	8
5. Carne dos Açores: “Fruto da pastagem” .....	10
5.1. O arquipélago do Açores .....	10
5.2. Características da carne dos Açores .....	12
6. A carne como fonte de vitaminas B .....	14
6.1. Extracção das vitaminas do complexo B .....	25
6.2. Determinação das vitaminas do complexo B .....	28
II. Material e Métodos .....	30
1. Caracterização dos animais usados para o estudo .....	31
2. Preparação da amostra .....	31
3. Procedimentos analíticos .....	31
4. Determinação simultânea das vitaminas do complexo B .....	31
4.1. Equipamentos .....	31

4.2. Reagentes .....	32
4.3. Procedimento técnico .....	32
5. Validação do método cromatográfico .....	33
6. Cálculos .....	35
7. Análise dos resultados .....	36
III. Resultados e Discussão .....	37
1. Determinação simultânea das vitaminas do complexo B, por HPLC .....	38
1.1. Escolha do método de extracção das vitaminas e das condições cromatográficas .....	38
1.2. Identificação das vitaminas em estudo .....	46
1.3. Validação do método de análise para as vitaminas .....	47
1.4. Teores de vitaminas obtidos na carne de bovino .....	50
2. Estudo da influência de vários factores no teor de vitaminas .....	53
2.1. Influência do tipo de músculo no teor de vitaminas .....	53
2.2. Influência das condições de produção no teor de vitaminas .....	55
2.3. Influência do n.º de lactações no teor de vitaminas .....	56
2.4. Influência das interacções de vários factores no teor de vitaminas .....	58
Conclusão .....	64
Bibliografia .....	65
Anexos .....	75

## Lista de Figuras

Figura 1 – Carne de Bovino

Figura 2 – Consumo *per capita* do total de carnes, na UE em 2002

Figura 3 – Consumo humano de carne *per capita* (kg), entre 1994 e 2009

Figura 4 – Repartição das quantidades de carne comercializada através de regimes de diferenciação e de qualidade certificada

Figura 5 – Sistema de produção intensivo

Figura 6 – Sistema de produção extensivo

Figura 7 – Pastagens dos Açores

Figura 8 – Localização das Explorações

Figura 9 – Indicação Geográfica Protegida

Figura 10 – Raça Holstein Frísia

Figura 11 – Carne dos Açores

Figura 12 – Estrutura química da Tiamina e do Difosfato de Tiamina (TDP)

Figura 13 – Estrutura química da Riboflavina, FMN e FAD

Figura 14 - Estrutura química do ácido Nicotínico e da Nicotinamida

Figura 15 - Estrutura química do ácido Pantoténico

Figura 16 - Estrutura química da Piridoxina (PN), Piridoxal (PL) e Piridoxamina (PM)

Figura 17 – Estrutura química do ácido Fólico, TMF e DHF

Figura 18 - Estrutura química da vitamina B12

Figura 19 – Representação esquemática de um HPLC

Figura 20 – Cromatogramas obtidos no 1º Dia

Figura 21 – Cromatograma característico do Gradiente 1

Figura 22 – Cromatograma característico do Gradiente 2

Figura 23 – Cromatogramas obtidos no 2º Dia

Figura 24 – Cromatogramas obtidos no 3º Dia

Figura 25 – Cromatograma 4º Dia

Figura 26 – Cromatograma característico dos padrões de vitaminas

Figura 27 – Cromatograma característico de uma amostra

Figura 28 – Influência do tipo de músculo no teor de vitaminas

Figura 29 - Influência da condição de produção no teor de vitaminas

Figura 30 – Influência do n.º de lactações no teor de vitaminas

Figura 31 – Influência do músculo x n.º lactações no teor de vitaminas

Figura 32 – Influência do músculo x condição de produção no teor de vitaminas

Figura 33 – Influência da condição de produção x n.º lactações no teor de vitaminas

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características do gradiente 1

Tabela 2 – Características do gradiente 2

Tabela 3 – Tempos de retenção e comprimentos de onda

Tabela 4 – Curvas de calibração e respectivos coeficientes de correlação

Tabela 5 – Limites de detecção e quantificação

Tabela 6 – Taxas de recuperação (%)

Tabela 7 – Resultados característicos de uma amostra

Tabela 8 – Teores de vitaminas obtidos nas amostras em estudo

Tabela 9 – Teores de tiamina encontrados em carne de bovino

Tabela 10 – Teores de riboflavina encontrados em carne de bovino

Tabela 11 – Teores de niacina encontrados em carne de bovino

Tabela 12 – Teores de ácido pantoténico e piridoxina encontrados em carne de bovino

Tabela 13 – Teores de folato encontrados em carne de bovino

Tabela 14 – Análise estatística da influência do tipo de músculo no teor de vitaminas

Tabela 15 – Análise estatística da influência da condição de produção no teor de vitaminas

Tabela 16 – Análise estatística da influência do n.º lactações no teor de vitaminas

Tabela 17 – Análise estatística da influência do músculo x n.º lactações no teor de vitaminas

Tabela 18 – Análise estatística da influência do músculo x condição de produção no teor de vitaminas

Tabela 19 – Análise estatística da condição de produção x n.º lactações no teor de vitaminas

## Lista de Abreviaturas

AB – Agricultura Biológica

ACN – Acetonitrilo

BSE - Bovine Spongiform Encephalopathy

CD - Claradiastase

CLA – Ácido Linoléico Conjugado

CoA – Coenzima A

DDR – Dose Diária Recomendada

DOP – Denominação de Origem Protegida

EF – Equivalente de Folato

EN – Equivalentes de Niacina

ETG – Especialidade Tradicional Garantida

FAD – Flavina dinucleotídeo

FMN – Flavina mononucleotídeo

Gm – Gluteus Medius

HCL – Ácido clorídrico

HPLC – High performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

IA – Ingestão adequada

IGP – Indicação Geográfica Protegida

Ld – Longissimus Dorsi

NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleótido

NADP<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PL – Piridoxal

PM – Piridoxamina

PMP – Piridoxamina fosfato

PN – Piridoxina

PNP – Piridoxal fosfato

PteGlu – Ácido pteroilmonoglutâmico

TCA – Solução ácido tricloroacético

TDP – Tiamina difosfato

TFA - ácido trifluoracético

THF - Tetrahidrofolato

TMP – Tiamina monofosfato

TTP – Tiamina trifosfato

TK - Takadiastase

UE – União Europeia

## Enquadramento e Objectivos

A constante mudança nos valores da sociedade tem conduzido a uma variação dos gostos e das preferências dos consumidores. Neste sentido, os alimentos deixaram de ser vistos apenas como o sustentáculo à sobrevivência, para passarem a ser apreciados (Pearson, 1999).

A carne, objecto de análise neste estudo, é, de todas as fontes alimentares, a que tem acompanhado o Homem durante a sua evolução (Holm, 2000). Devido às suas apelativas características sensoriais (Pearson, 1999), elevado valor nutricional, fonte de proteína animal, minerais e vitaminas (Leonhardt, 1997; Valsta *et al.*, 2005; Williams, 2007), a carne torna-se um dos componentes essenciais das dietas. Contudo, pode apresentar características com efeitos prejudiciais à saúde, como o colesterol (Pratiwi *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2003). Um consumo moderado de carne pode beneficiar o valor nutritivo da refeição, contribuindo para a saúde no curto e longo prazo (Miller, 2002).

Em Portugal, o consumo anual de carne *per capita* tem vindo a aumentar (Rodrigues, 2005), tendo-se registado, em 2002, um consumo de 105,6 kg (INE, 2004). Embora a carne de suíno ocupe uma posição de destaque, com uma quota de 42%, seguida da carne de animais de capoeira, com 31%, o consumo da carne de bovino tem vindo a crescer registando-se, nos últimos 10 anos, um aumento de 16% (INE, 2010). Este crescimento traduz-se no aumento da confiança dos consumidores no consumo de carne de bovino, confiança esta que foi afectada com o aparecimento da BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy), em 1995 (Rodrigues, 2005).

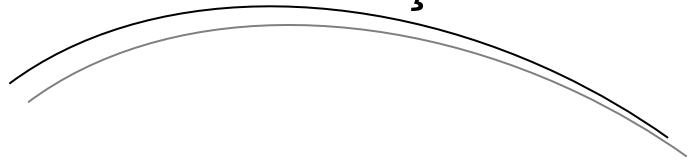
No sentido de voltar a ganhar a confiança dos consumidores, tem-se verificando uma nova aposta na produção de carne, com base num sistema extensivo, que assenta no consumo de pastagens (Rodrigues, 1997). O facto da alimentação ser à base de pastagens, pode contribuir para o aumento da confiança dos consumidores. Para além de assegurar um consumo seguro, estes sistemas têm como objectivo a obtenção de carcaças mais magras, de cor escura e com um *flavour* relacionado com as espécies vegetais ingeridas (Miller, 2002).

Sendo a carne de bovino uma importante fonte de vitaminas do complexo B, é importante conhecer os seus teores relativos, assim como estes podem estar relacionados com determinados factores de produção animal.

Este estudo tem como principal objectivo a determinação simultânea de sete vitaminas do complexo B na carne de bovino, por HPLC. Após a optimização das técnicas

de extracção e separação/quantificação, procurou-se estabelecer relações com as características dos animais em estudo.

# I. INTRODUÇÃO



## 1. Carne e o seu papel na alimentação

A alimentação e a nutrição sempre foram vistas como importantes para a satisfação das necessidades do organismo. Nos últimos anos, esta ideia tem vindo a sofrer alterações tendo sido dada uma maior atenção à alimentação e à sua relação com a saúde (Golan, 2008). Os consumidores estão cada vez mais preocupados em ter uma dieta equilibrada, pois são vários os benefícios (Ferreira et al., 2000).

Desde sempre, a carne é dos alimentos mais consumidos e privilegiados pelos consumidores, encontrando-se no topo hierárquico dos alimentos (Holm, 2000).

Tal como muitos outros, o consumo de carne não tem como único objectivo saciar a fome e proporcionar momentos agradáveis à mesa dos consumidores, apresenta igualmente elevada importância na dieta, uma vez que fornece muitos nutrientes necessários à saúde e bem-estar (Pearson, 1999). Este alimento é visto como um componente básico na alimentação em países desenvolvidos, apresentando-se como importante fonte de proteínas de elevado valor biológico. É também responsável pelo fornecimento de aminoácidos essenciais, vitaminas lipossolúveis e do complexo B, excelente fonte de lípidos essenciais e de ferro e zinco numa forma altamente assimilável pelo organismo (Leonhardt, 1997; Valsta et al., 2005; Williams, 2007).

Apesar de a carne ser um alimento indispensável ao Homem do ponto de vista nutricional, deve ser consumida com moderação, uma vez que pode apresentar um elevado nível de gordura e colesterol, assim como um certo desequilíbrio na composição de ácidos gordos. Estas características são consideradas nocivas para a saúde, encontrando-se associadas ao desenvolvimento de doenças (Wood et al., 2003), como obesidade e certos tipos de cancro (Biesalski, 2005).

São muitas as contestações no que diz respeito à ingestão de carne vermelha na alimentação humana, como é o caso da carne de bovino (Figura 1), com restrições principalmente focadas no seu teor em gordura saturada e colesterol (McAfee et al. 2010; Pratiwi et al. 2006). Dessa forma, o consumo de carnes brancas, tais como o frango e o peixe, acabam por ser incentivados. Quando comparada com a carne vermelha, as carnes brancas apresentam menores quantidades de gordura saturada e colesterol, contudo o seu teor médio em ferro é inferior (Pratiwi et al. 2006).



**Fig.1** – Carne de bovino.

**Fonte:** Anónimo, 2010

Independentemente do tipo de carne escolhida, o consumidor final procura, normalmente, carne com boa aparência e palatabilidade. Os consumidores estão hoje mais cientes de outras questões, como a segurança alimentar, não descurando aspectos relacionados com a salubridade e o bem-estar animal (Sarcinelli *et al.*, 2007).

Embora a carne seja um alimento essencial nas dietas, o seu consumo pode ser afectado devido a questões relacionadas com a segurança alimentar: o uso de hormonas na produção de carne bovina, a presença de resíduos de medicamentos e pesticidas, e o aparecimento de casos de BSE (Cunha, 2008). De modo a diminuir o receio do consumidor, tem havido uma crescente oferta de produtos com denominação de origem protegida.

## 2. Qualidade da carne

O conceito qualidade de um produto alimentar, tem sofrido alterações ao longo dos tempos. Segundo *Peri* (2006), qualidade traduz-se na “*aptidão para o uso*” de um produto. De acordo com a definição da ISO 9001 a qualidade é “*o conjunto das propriedades ou características de um produto ou serviço que lhe conferem capacidades para satisfazer os requisitos implícitos ou explícitos do consumidor*”. No contexto da carne, este termo engloba várias propriedades que a tornam, depois de cozinhada, num produto não apenas comestível, mas também apelativo e apetecível, para além das propriedades nutritivas e funcionais, cada vez mais exigidas por parte dos consumidores (Matos, 2010).

Os atributos sensoriais dos alimentos são os componentes da qualidade que exercem maior influência na aceitabilidade revelada pelos consumidores (Love, 1999). No entanto, no momento da compra, os consumidores baseiam as suas escolhas não só em aspectos como a cor, a tenrura, a suculência e o *flavour*, mas também o preço, a marca e o tipo de produção (Bernués *et al.*, 2003; Mancini, 2005; Xiong, 1999).

De entre estes factores, a tenrura é o atributo que mais influencia a opinião do consumidor, estando este disposto a pagar preços superiores por carne tenra (Huffman *et al.*, 1997; Schonfeldt, 2011). Esta é influenciada pela qualidade do colagénio presente na carne, que diminui com a idade do animal (Matos, 2010). Contudo, a tenrura está também relacionada com a raça, o sexo e a idade do animal, e o grau de maturação da carne (Raça e genótipo) (Schonfeld, 2011; Matos, 2010).

No momento da escolha, o consumidor faz a avaliação da carne através da cor que esta apresenta (Sarriés, 2006), sendo a mioglobina a principal proteína responsável por essa cor (Mancini, 2005). A variação da cor da carne está dependente de factores intrínsecos (raça, sexo, pH da carne) e extrínsecos (temperatura, disponibilidade de oxigénio, embalagem, entre outros) (Bekhit, 2005).

A uniformidade da cor da carne é um atributo importante. Na carne de bovino, a cor é percebida, pelo consumidor, como um indicador de frescura e salubridade; se esta apresentar uma cor acastanhada, pode ser associada a uma matéria-prima retardada ou com deficiente qualidade higiénica, sendo rejeitada (Morrissey *et al.*, 1994; Ouali *et al.*, 2006). A cor da carne também pode sofrer alterações devido ao marmoreio (acumulação de gordura intramuscular na carne bovina) e, uma grande acumulação de gordura conduz a uma modificação da cor da carne (Fiems *et al.*, 2000).

Outro dos atributos que é valorizado na carne é a sua suculência, que depende da quantidade de água retida no produto e da gordura acumulada (Bertram *et al.* 2007; Pearson, 1999; Schonfeldt, 2011), a qual aumenta com a idade e o acabamento do animal (Schonfeldt, 2011). Este atributo é fundamental na carne, pois facilita o processo de mastigação e realça o sabor quando em contacto com as papilas gustativas (Aaslyng *et al.*, 2003).

O *flavour* é outro dos atributos apreciados pelos consumidores, podendo apenas ser avaliado na altura do consumo. Existem centenas de compostos que contribuem para o sabor e o odor, sendo muitos deles alterados através do armazenamento e confecção da carne (Calkins, 2007).

### 3. Consumo de carne em Portugal

Em 2002, na União Europeia e num conjunto de 14 países, Portugal encontrava-se na 6ª posição (Figura 2) com um consumo anual *per capita* de 105,6 kg, sendo o principal país consumidor a Espanha, com 135,9 kg (INE, 2004).

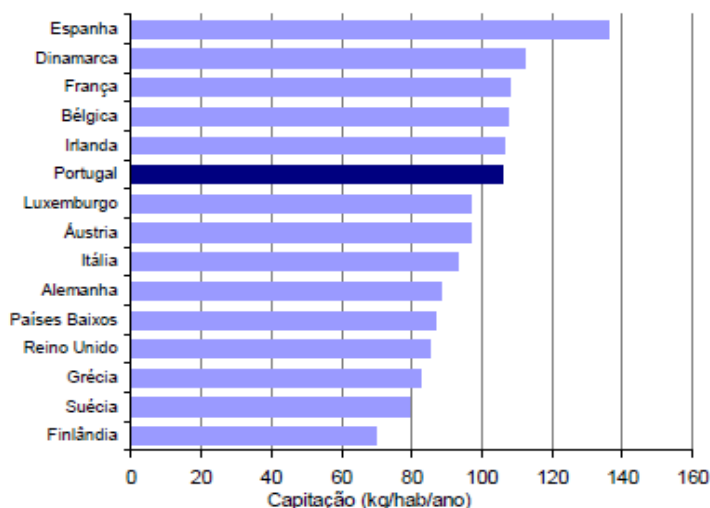


Fig. 2 – Consumo *per capita* do total de carnes, na UE em 2002. Fonte: INE, 2004

Em Portugal, o consumo de carne por habitante/ano tem vindo a aumentar (Rodrigues, 2005). Em 2009 o consumo total de carne era de 113 kg/hab., sendo que 42% era de carne de suíno, seguida da carne de animais de capoeira, com 31%, e da carne de bovino, com um consumo de 16,9%, como se pode ver pela Figura 3 (INE, 2010).

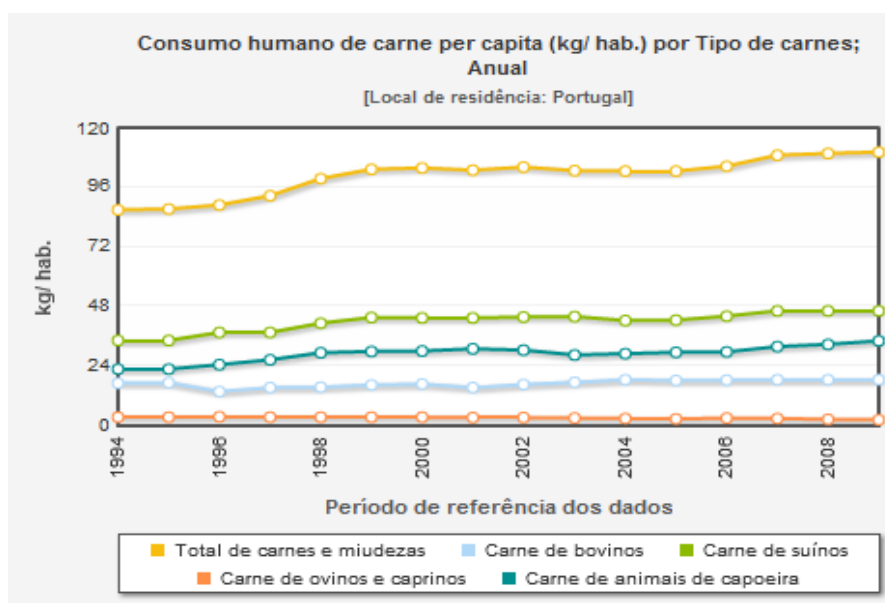


Fig. 3: Consumo humano de carne *per capita* (kg), entre 1994 e 2009. Fonte: INE, 2010.

Relativamente à evolução entre 1994 e 2009, a carne de aves apresentou maior consumo *per capita*, +33,04%, seguida da carne de suíno, +2,5% (INE, 2010). O consumo de carne de bovino diminuiu, em 1996, devido ao aparecimento da BSE. Como se pode verificar, pela análise da Figura 3, o consumo de bovino diminuiu devido à falta de confiança que o consumidor começou a demonstrar levando à preferência de outras carnes. Actualmente os consumos encontram-se semelhantes aos registados em 1994 (Rodrigues, 2005), pois tem-se verificado um aumento da confiança, por parte dos consumidores, no consumo de carne de bovino.

Outro dos factores que influencia o baixo consumo de carne bovina, quando comparada com outras carnes, é o preço de comercialização. Enquanto que o preço da carne de frango ronda os 2,57 euros/kg, sendo a carne mais consumida, a carne de bovino é comercializada a cerca de 7 euros/kg (MADRP, 2007).

Em relação às carnes com denominações protegidas (DOP e IGP), estas aumentaram a sua produção em 12% em 2001. Este é um valor baixo, apresentando apenas 1,9% da produção total do país (Rodrigues, 2005). Em 2003 (Figura 4), a produção total de carne de bovino foi de 105.772.000 kg, em que 4,1% representa carne certificada (MADRP, 2007).

Ano: 2003	Produção Total	Total produções diferenciadas		DOP		IGP		ETG		AB		Rotulagem Facultativa	
Espécie	kg carcaça	kg carcaça	%	kg carcaça	%	kg carcaça	%	kg carcaça	%	kg carcaça	%	kg carcaça	%
Bovina	105.772.000	4.387.578	4,1	1.968.814	44,9	33.000	0,8	112.375	2,6	18.329	0,42	2.255.060	51,4
Ovina	22.428.000	354.278	1,6	3.970	1,12	287.282	81,09	0	0,00	63.026	17,79	0	0,00
Caprina	1.730.000	26.125	1,5	6.854	26,24	16.930	64,80	0	0,00	2.341	8,96	0	0,00
Suína	354.875.000	417.207	0,1	413.700	99,16	0	0,00	0	0,00	3.507	0,84	0*	0,00
Aves	271.441.000	4.031.841	1,5	0	0,00	0	0,00	0	0,00	12.164	0,30	4.019.677	99,70
Totais	756.246.000	9.217.029	1,2	2.393.338	25,97	337.212	3,66	112.375	0,01	99.367	1,08	6.274.737	68,08

\* não disponível

**Fig.4** – Repartição das quantidades de carne comercializada através de regimes de diferenciação e de qualidade certificada. **Fonte:** MADRP, 2007

O aumento verificado, assim como a crescente procura por parte dos consumidores, parecem indicar boas perspectivas para o futuro das carnes com nomes protegidos (Rodrigues, 2005). As estatísticas apontam que em 2015 o consumo de carne certificada aumente 21%, sendo que 13% será de carne de bovino. Este aumento é uma oportunidade para os Açores, “que têm condições naturais para produzir carne de excelência, num longo caminho a fazer desde o prado para o prato” (Alberto, 2000).

## 4. Sistema de Produção

### - Sistema Intensivo

Um sistema de produção intensivo, utiliza uma forma de exploração cujo objectivo é a obtenção de elevados rendimentos produtivos no menor espaço de tempo, tirando partido do seu potencial máximo de crescimento (Ferreira, 2008). É o sistema ideal para engordar os animais provenientes de explorações leiteiras ou provenientes de cruzamentos de raças autóctones com raças pesadas (Rodrigues, 1997).

Os animais utilizados geneticamente trabalhados nas suas características, apresentam ritmos produtivos elevados, rápido crescimento, tamanho corporal grande e índices de mortalidade e morbidade baixos, mas uma vida útil mais reduzida (Ferreira, 2008).

Nestes sistemas de produção, os animais encontram-se fechados (Figura 5) com o máximo de densidade animal e mobilidade restrita. A alimentação baseia-se em planos alimentares cuidados, utilizando-se alimentos concentrados de boa qualidade e suplementos de vitaminas e minerais (Ferreira, 2008). Os benefícios da aplicação dos sistemas intensivos baseiam-se, na eficiência na produção, alto rendimento, baixo risco e elevado lucro (Hanekom, 2010).



**Fig. 5** – Sistema de produção intensivo. **Fonte:** Sobreira, s.d.

Os produtos resultantes de animais criados num sistema de produção intensivo representam a massificação de produção animal, com preços mais acessíveis, mas com uma composição nutricional menos favorável à saúde dos consumidores (Ramos, 2008).

### **- Sistema Extensivo**

Este é um sistema de produção mais associado à produção de raças autóctones, que estão adaptadas ao habitat (Dias, 2008). O crescimento dos animais é mais lento (Rodrigues, 1997), pois estão mais dependentes do meio ambiente do que da acção do Homem (Dias, 2008), proporcionando carne mais magra e de cor mais escura (Miller, 2002).

As instalações existentes são, normalmente, rudimentares ou temporárias. Os animais devem estar adaptados às condições edafo-climáticas da zona e tendem a não ser geneticamente muito seleccionados (Reis, 2010).

A alimentação é constituída, principalmente, por pastagens naturais ou semeadas (Figura 6) e por forragens que são usadas como suplemento em épocas de escassez de pastagens (Rodrigues, 1997).



**Fig. 6** – Sistema de produção extensivo. **Fonte:** Camargo, 2006.

Os produtos DOP e IGP, como é o caso da Carne dos Açores, são resultantes de animais criados em sistemas de produção extensivo, oferecendo ao consumidor características organolépticas únicas, a carne apresenta um *flavour* relacionado com as espécies vegetais ingeridas, e com uma composição nutricional mais favorável à saúde do consumidor (Miller, 2002; Ramos, 2008).

Este sistema de produção permite, ainda, conferir elevados padrões de bem-estar animal, dado que proporciona aos animais expressarem o seu repertório comportamental, e por outro a existência de um equilíbrio ambiental dado o baixo nível de *inputs* (Pereira, 2008).

## 5. Carne dos Açores: “Fruto da pastagem”

Actualmente, os Açores tem comercializado carne de bovino cujos animais são produzidos em pastagens, o que confere não só a produção de carne sem recursos a produtos químicos e prejudiciais à saúde, como também uma carne com valores nutricionais superiores a outras carnes comercializadas (Pereira, 2008).

### 5.1. O arquipélago dos Açores

Os Açores situa-se no Oceano Atlântico, entre a Europa e a América do Norte, apresentando uma área de 2,332 km<sup>2</sup> dividida em nove ilhas. O clima é temperado húmido, com uma temperatura média a rondar os 17,5 °C e elevada precipitação. Estas condições edafo-climáticas proporcionam abundantes pastagens que permitem o apascentamento dos bovinos em meio natural durante todo o ano (Carne dos Açores, s.d.; Caderno de especificações, s.d.).



**Fig.7** – Pastagens dos Açores  
**Fonte:** Carne dos Açores, s.d.

As pastagens (figura 7) e prados são tão importantes, que a sua ocupação é de 94% da superfície agrícola útil (Carne dos Açores, s.d.).

Actualmente existem 448 explorações (figura 8) aprovadas para a produção de bovinos, em todas as ilhas à excepção do Corvo. A área média de exploração situa-se nos 30 hectares, com uma média de efectivos de 50 animais, dos quais 23,5 são vacas aleitantes (vaca destinada à criação de vitelos para produção de carne) (Carne dos Açores, s.d.).



**Fig.8** – Localização das Explorações. **Fonte:** FAA, s.d.

No sentido de diferenciar um produto com qualidade distinta, e servir os consumidores mais exigentes, desenvolveu-se o conceito de carne certificada. A mais-valia desta carne, encontra justificação na crescente tendência que os consumidores têm para procurar produtos com qualidade, nomeadamente carne produzida em regimes extensivos cuja alimentação se baseia na utilização de pastagens (Pinto de Andrade *et al.*, 1999).

A Carne dos Açores – Indicação Geográfica Protegida (IGP), surgiu na sequência de proteger a qualidade distinta do seu produto e em amplifica-la aos seus consumidores. Em 2000, a carne foi reconhecida a Indicação Geográfica e no ano de 2003 a Protecção pela Comissão Europeia, fazendo assim da Carne dos Açores – IGP, parte da lista de produtos de carne fresca de qualidade onde se encontra também a Carne Mirandesa (Carne dos Açores, s.d.).

Para obter uma classificação de IGP (Figura 9), a carne tem que cumprir certas especificações. Designa-se como Carne dos Açores – IGP, a carne obtida de bovinos nascidos, criados e abatidos na Região Autónoma dos Açores, com características da carne segundo a classe etária e os moldes tradicionais de produção (Caderno de especificações, s.d.).



**Fig.9** – Indicação Geográfica Protegida. **Fonte:** Anónimo, s.d.

A carne dos Açores provem de crias alimentadas com leite materno, pelo menos até aos 3 meses. A partir desta idade é fornecida uma alimentação tradicional, constituída por erva das pastagens naturais ou melhoradas. Até serem abatidos, os animais são alimentados com pastagens, sendo muitas vezes complementada a sua alimentação com silagens e fenos obtidos nas próprias pastagens e com concentrados energéticos e proteicos (Governo dos Açores, s.d.).

Para a produção de Carne dos Açores, as raças mais utilizadas são a Charolesa, a Limousine e a Simmental Fleckvieh (Carne dos Açores, s.d.). Contudo, as amostras para este estudo provêm da raça Holstein Frísia (Figura 10), igualmente usada nos Açores. Esta raça, também conhecida como taurina, é uma raça de elevada estatura, facilmente identificada pelo padrão malhado que estes animais apresentam (APCRF, 2008).



**Fig.10** – Raça Holstein Frísia  
**Fonte:** AgroPortal, 2003

Os bovinos de raça Frísia são animais de temperamento calmo, sem prejuízo de grande vivacidade (Agroquisa, s.d.). São animais precoces de grande corpulência, podendo atingir 1,54m de altura e pesar 600 a 700 kg (APCRF, 2008). A boa capacidade corporal, o esqueleto apto a suportar, o tórax amplo e um abdómen volumoso proporcionam aos

animais desta raça uma nítida aptidão leiteira, mas também uma óptima qualidade da carne (Agroquisa, s.d.; APCRF, 2008).

## 5.2. Características da Carne dos Açores

As características desta carne estão intimamente ligadas, por um lado, às condições edafo-climáticas dos Açores, propícias à criação de gado em pastagens naturais e, por outro, aos métodos ancestrais de alimentação e condução do gado seguido pelas populações da região (Governo dos Açores, s.d.).

Trata-se de uma carne tenra, de cor rosada, com ligeira infiltração de gordura a nível intramuscular, grande suculência, textura macia, detentora de um aroma e sabor característicos, próprios e inerente ao modo de produção tradicional, nomeadamente à forma de pastoreio e ao tipo de alimentação (Figura 11) (Carne dos Açores, s.d.; Governo dos Açores, s.d.).



**Fig.11** – Carne dos Açores  
**Fonte:** Carne dos Açores, s.d.

Os animais, cuja produção é feita à base de pastagens, apresentam um valor nutricional/dietético superior a outras carnes, e um sabor diferenciado quando comparado com animais produzidos em regimes cerealíferos (Carne dos Açores, s.d.).

Têm sido realizados estudos, que demonstram que carne criada em pastagens contém elevadas concentrações de  $\beta$ -caroteno (provitamina A),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), baixo teor de gordura, elevados níveis de ácidos gordos  $\omega$ -3, melhor relação entre os ácidos gordos  $\omega$ -3:  $\omega$ -6 e elevados níveis de ácidos gordos polinsaturados, mais propriamente em ácido linoléico conjugado (CLA). Todas estas substâncias apresentam efeitos biológicos benéficos para a saúde humana (Carne dos Açores, s.d; Costa *et al.*, 2008)

O  $\beta$ -Caroteno (provitamina A) é o carotenóide predominante nas carnes e produtos variados (Prates *et al.*, 2006). Como um supressor de espécies reactivas de oxigénio (como o singleto de oxigénio), protege os ácidos gordos insaturados e os lípidos de sofrerem oxidação (Muramoto *et al.*, 2003), o que pode afectar a estabilidade da qualidade da carne. Devido à sua acção antioxidante, pode ter influência no controlo de doenças como o cancro e a aterosclerose (Prates *et al.*, 2006).

Em relação ao  $\alpha$ -tocoferol, é uma vitamina lipossolúvel com uma forte acção antioxidante, protegendo as células contra os efeitos dos radicais livres (Ball, 2004). Estudos realizados a carne de pasto, concluem que esta pode apresentar níveis de vitamina E superiores em relação a outras carnes (Mutetikka, 1993).

Quanto aos ácidos gordos  $\omega$ -3, estes são essenciais à saúde e são obtidos através da alimentação, contribuindo para a diminuição dos níveis de colesterol e triglicéridos (Tsang, 2005). Um equilíbrio inadequado entre o  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 contribui para o desenvolvimento de doenças como hipertensão, diabetes, artrite, osteoporose, doenças inflamatórias e cancro (Simopoulos, 2008). Animais produzidos em pasto apresentam maiores quantidades de  $\omega$ -3, como o ácido eicosapentaenóico e o ácido docosahexaenóico, favoráveis à saúde humana (Wood *et al.*, 2003).

As pastagens são ricas em CLA e, portanto, os animais de pasto podem apresentar teores superiores quando comparado com os animais alimentados através de rações (Caviedes, 2011). O CLA tem sido indicado na protecção contra o cancro, combate ao colesterol, controle da diabetes e doenças cardiovasculares (Schmid, 2006).

Segundo Jerónimo Pinto “quando estas informações são colocadas no rótulo, as pessoas passam a olhar para a carne de forma completamente diferente, e nada melhor do que publicar todos os benefícios que a carne dos Açores tem, porque isto só traz vantagens” (Pinto,2010).

A qualidade da Carne dos Açores pode ser considerada um autêntico “fruto da pastagem”!

## 6. A carne como fonte de vitamina B

Até ao início do século XX, permaneceu a ideia de que o valor nutritivo da carne estava relacionado com o seu conteúdo em sais minerais, hidratos de carbono, lípidos e proteínas. A partir de então, foi reconhecido que a presença de pequenas quantidades de substâncias orgânicas específicas era necessária ao organismo, levando a sua falta a doenças como o escorbuto, o raquitismo, a pelagra e o beribéri (Ball, 2004).

As vitaminas são compostos orgânicos de natureza e composição variada, que embora sejam necessárias em pequenas quantidades, desempenham uma ampla gama de funções no organismo (Diéguez, 1997). São necessárias para a síntese de co-factores essenciais e para um grande número de reacções metabólicas controladas por enzimas e co-enzimas (Ball, 2006).

A maioria das vitaminas, com excepção da niacina e vitamina D, não são sintetizadas pelo organismo humano sendo fornecidas apenas pela dieta. Qdo estas dietas são desequilibradas e inadequadas, podem surgir várias doenças associadas à falta de certas vitaminas (Ball, 2004).

São reconhecidas treze vitaminas, na nutrição humana, sendo estas divididas em dois grupos de acordo com a sua solubilidade: as hidrossolúveis e as lipossolúveis (Ball, 2004; Chatzimichalakis et al., 2004). As vitaminas lipossolúveis são representadas pelas vitaminas A, D, E e K. As vitaminas hidrossolúveis incluem a vitamina C e as vitaminas do complexo B (Ball, 2004). Esta simples classificação reflecte a biodisponibilidade das vitaminas, e como a solubilidade influencia a absorção intestinal e pelos tecidos (Ball, 2006).

Neste trabalho serão abordadas as vitaminas hidrossolúveis, vitaminas do complexo B, nomeadamente: vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6 (piridoxina), vitamina B9 (folato) e vitamina B12 (cobalamina).

Tal como acontece com outros produtos de origem animal, a carne de bovino é uma excelente fonte de vitamina B12, fornecendo mais de dois terços das necessidades diárias (Williams, 2007). Contudo, a presença das vitaminas pode diminuir, ou até desaparecer, durante o cozimento (Lombardi-Boccia *et al.*, 2005).

Por serem hidrossolúveis, as vitaminas do complexo B, não são armazenadas no organismo de forma considerável, são eliminadas pela urina, sendo necessário um suplemento diário através da alimentação (Anderson, 2008).

### - Vitamina B1 (Tiamina)

A tiamina, também conhecida como vitamina B1, foi a primeira das vitaminas hidrossolúveis a ser descoberta no início do século XX. A sua deficiência no organismo é responsável pelo aparecimento do beribéri (desordens do sistema nervoso), o que levou, em 1885, a Marinha Japonesa a aumentar o consumo de carne e vegetais na dieta da tripulação, uma vez que a doença era prevalente no século XIX (Ball, 2004).

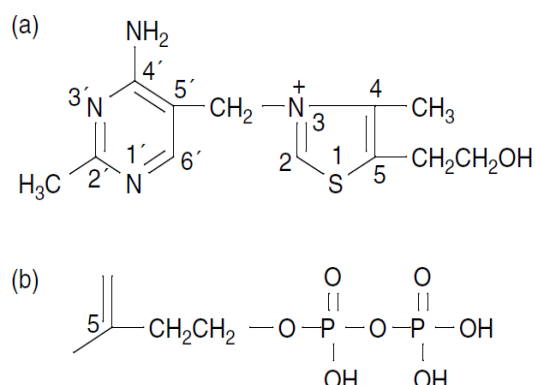
A tiamina é constituída por um anel de pirimidina e outro de tiazol, ligados por uma ponte de metileno (figura 12) (Ball, 2006; Diéguez, 1997). É uma amina quaternária, apresentando-se como catião monovalente ou bivalente dependendo do pH da solução (Ball, 2004). É comercializada na forma de hidrocloreto de tiamina, um pó cristalino branco, facilmente solúvel em água, pouco solúvel em álcool e insolúvel em gordura (Ball, 2006).

A B1 é uma das vitaminas do complexo B mais sensíveis à temperatura, levando a grandes perdas durante o processamento térmico dos alimentos (Ball, 2006). Esta vitamina é igualmente instável em soluções neutras e à exposição ao ar (Diéguez, 1997).

Nos tecidos de origem animal, mais de 90% da tiamina está presente na forma fosforilada, com predominância da tiamina difosfato (TDP). Em menores quantidades, estão presentes a tiamina monofosfato (TMP) e a tiamina trifosfato (TTP). Nos produtos de origem vegetal, a vitamina ocorre predominantemente na forma não fosforilada (Ball, 2004, Ball, 2006).

A TDP funciona como co-enzima na descarboxilação oxidativa do piruvato e do  $\alpha$ -cetoglutarato, no ciclo de Krebs. Actua como transportador intermediário do grupo aldeído na descarboxilação do piruvato e nas reacções das transcetolases na via das pentoses (Ball, 2004; Diéguez, 1997; Insel *et al.*, 2007). A descarboxilação oxidativa do piruvato e do  $\alpha$ -cetoglutarato desempenham um papel fundamental no metabolismo energético da maioria das células, desempenhando um papel essencial no tecido nervoso (Ball, 2004). Os principais órgãos, onde a vitamina se deposita, são o cérebro, os rins, o coração e o músculo (Ball, 2006).

Todos os tecidos de origem animal e vegetal contêm vitamina B1, podendo-se encontrar em todos os alimentos naturais, não transformados. Contudo, as melhores fontes incluem leveduras e extractos de leveduras, trigo, aveia, cereais integrais, nozes, coração,



**Fig. 12** – Estrutura química da Tiamina (a) e da TDP (b). **Fonte:** Ball, 2006.

rins, fígado e carnes magras. Alimentos como hortaliças, frutas, ovos, carne de frango, carneiro e de vaca, constituem fontes intermédias desta vitamina (Ball, 2004).

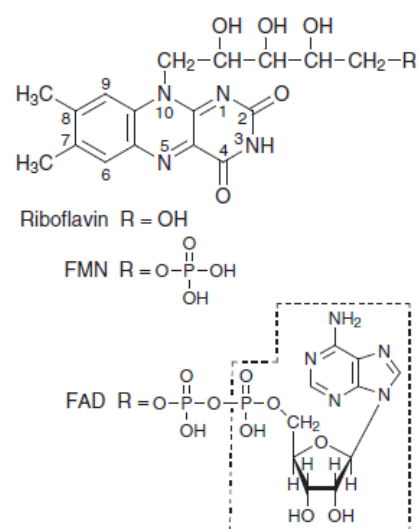
A vitamina B1 é apenas obtida através da alimentação, pois o Homem não consegue sintetizá-la (Ball, 2004), e uma vez que não é armazenada no corpo deve ser fornecida diariamente (Kirschmann, 2006). A deficiência de vitamina B1 afecta o sistema nervoso e cardiovascular; e ocorre devido ao consumo insuficiente de tiamina através da dieta e/ou pelo aumento no requerimento durante a gravidez, lactação, entre outros (Diéguez, 1997; Ball, 2004). Os sintomas demonstrados pela falta desta vitamina são: anorexia, distúrbios gastrointestinais, neuropatia, fraqueza muscular. Em casos mais graves pode causar confusão mental e até mesmo beribéri (Ball, 2004).

A dose diária recomendada (DDR) de tiamina varia para o homem e para a mulher, em resultado das suas diferenças de tamanho e uso de energia. Para um homem a partir dos 19 anos, a DDR é de 1,2 mg/dia; para uma mulher, com a mesma idade, a DDR será de 1,1 mg/dia. A gravidez e lactação aumentam os requerimentos de energia, devendo a ingestão de tiamina ser superior nestas fases. A recomendação de tiamina durante a gravidez é de 1,4 mg/dia, enquanto que durante a lactação a DDR é de 1,5 mg/dia (Gropper *et al.*, 2009; Insel *et al.*, 2007).

### **- Vitamina B2 (Riboflavina)**

A riboflavina, ou vitamina B2, foi descoberta em 1920 em extractos de leveduras, apresentando uma capacidade de evitar a pelagra (Ball, 2004). Esta vitamina (figura 13) é composta por uma molécula de isoaloxazina com cadeia lateral de ribitol (Ball, 2004; Gropper *et al.*, 2009) e apresenta-se como precursor da flavina mononucleotídeo (FMN) e da flavina dinucleotídeo (FAD) (Kohlmeier, 2006), cujas características físico-químicas são semelhantes à riboflavina (Ball, 2004).

A riboflavina apresenta-se na forma de pó cristalino de cor amarelo – alaranjado, moderadamente solúvel em água e insolúvel em acetona e éter (Ball, 2006). Ao contrário da tiamina, a riboflavina é mais estável ao calor e à oxidação, contudo, apresenta sensibilidade à luz (Insel *et al.*, 2007).



**Fig. 13** – Estrutura química da Riboflavina, FMN e FAD. **Fonte:** Ball, 2004

Quando proveniente dos alimentos, a riboflavina encontra-se maioritariamente sob a forma da co-enzima FAD e em menor quantidade sob a forma de FMN ligadas a proteínas (Powers, 2003); no entanto, quando o bolo alimentar chega ao estômago, o meio ácido propicia a libertação das co-enzimas.

As co-enzimas FMN e FAD participam em numerosas vias metabólicas, como o ciclo de Krebs e a via da  $\beta$ -oxidação (Insel *et al.*, 2007). Estas co-enzimas actuam como transportadores de electrões e hidrogénio, dando origem a FMNH<sub>2</sub> e FADH<sub>2</sub>, participando numa série de reacções de oxidação-redução fundamentais no metabolismo energético (Insel *et al.*, 2007; Powers, 2003).

As deficiências da riboflavina são raras, uma vez que estão relacionadas com o metabolismo de outras vitaminas, verificando-se uma deficiência conjunta de diferentes vitaminas. Os sinais que demonstram a falta da riboflavina incluem feridas no canto da boca e no nariz, a língua fica brilhante, lisa e inflamada e problemas de visão (Ball, 2004; Delgadillo, 2009). Actualmente, tem-se verificado um especial interesse pela riboflavina, pois têm sido realizados estudos que demonstram que poderá ter um papel de protecção contra alguns tipos de cancro e doenças cardiovasculares (Powers, 2003).

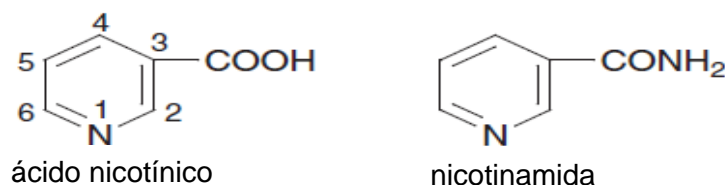
De modo a evitar as deficiências, o fornecimento da vitamina B2 é feito através da alimentação, uma vez que o Homem não a consegue sintetizar (Ball, 2004). Extractos de levedura são a melhor fonte natural de riboflavina, sendo a carne, o leite, os ovos e o queijo outras fontes adequadas desta vitamina. Os cereais, os vegetais e os legumes, embora sejam uma fonte de riboflavina, apresentam teores mais baixos (Ball, 2004; Kohlmeier, 2006).

Tal como acontece na tiamina, a DDR para o homem é superior à da mulher, sendo de 1,3 mg/dia e 1,1 mg/dia, respectivamente. Durante a gravidez e a lactação, as necessidades de energia aumentam, de modo a que a DDR sobe para 1,4 mg/dia durante a gravidez e 1,6 mg/dia durante a lactação (Insel *et al.*, 2007; Kohlmeier, 2006).

### **- Vitamina B3 (Niacina ou PP)**

Em 1867, cientistas produziram uma substância, a qual designaram por ácido nicotínico, através da oxidação da nicotina do tabaco. Setenta anos depois, Conrad Elvehjem demonstrou que o ácido nicotínico curava os cães de uma doença semelhante à dos Humanos, a pelagra. No início dos anos 1940, a vitamina foi re-baptizada com o nome de niacina, de modo a não ser confundida com a nicotina (Insel *et al.*, 2007).

A vitamina B3 pode surgir sob a forma de nicotinamida ou niacinamida e ácido nicotínico ou niacina (figura 14) (Denu, 2005; Rose-Sallin *et al.*, 2001). A nicotinamida é um derivado do ácido nicotínico, constituída por uma amida que substitui o grupo carboxilo. Quando desaminada, no organismo, é nutricionalmente equivalente ao ácido nicotínico (Ball, 2004). Tal como as outras vitaminas B, a niacina participa em cerca de 200 vias metabólicas (Insel *et al.*, 2007).



**Fig. 14** – Estrutura química do ácido Nicotínico e da Nicotinamida. **Fonte:** Ball, 2004.

O ácido nicotínico é moderadamente solúvel em água e etanol, apresentando insolubilidade em éter e acetona. A nicotinamida é facilmente solúvel em água e etanol, apresentando também solubilidade em acetona e éter (Ball, 2006).

Tanto a nicotinamida como o ácido nicotínico, no estado seco e em soluções neutras, resistem ao oxigénio, à luz e ao calor. As co-enzimas oxidadas (NAD<sup>+</sup> e NADP<sup>+</sup>) são lábeis em meio alcalino e as reduzidas (NADH e NADPH) são lábeis em meio ácido (Ball, 2006).

A nicotinamida é a componente de duas co-enzimas relacionadas: a NAD<sup>+</sup> e a NADP<sup>+</sup>, que desempenham um papel chave nas reacções de oxidação-redução do metabolismo (Insel *et al.*, 2007). Estas co-enzimas actuam como transportadores de electrões e hidrogénio em várias reacções metabólicas, como a síntese de ácidos gordos e a síntese final de ATP durante a fosforilação oxidativa mitocondrial (Denu, 2005).

No sentido exacto da palavra, a niacina não é uma vitamina (composto essencial que precisa de ser incorporado na dieta), pois a vitamina B3 é uma das poucas vitaminas que pode ser sintetizada no organismo (Ball, 2004). A sua síntese é realizada a partir do aminoácido essencial L- triptofano que é absorvido no intestino após digestão de proteínas. Para se obter 1 mg de niacina são necessárias 60 mg de triptofano (Ball, 2004).

Devido à contribuição do triptofano, os alimentos que contêm proteínas são importantes para o fornecimento de niacina (Ball, 2006). As melhores fontes são a carne vermelha, aves, fígado e leguminosas, pois contêm elevados níveis de niacina e triptofano. Outras fontes são os amendoins, os cereais, o pão e o café. Os queijos e os ovos são fontes relativamente pobres em niacina, contudo contêm elevadas quantidades de triptofano (Ball, 2004).

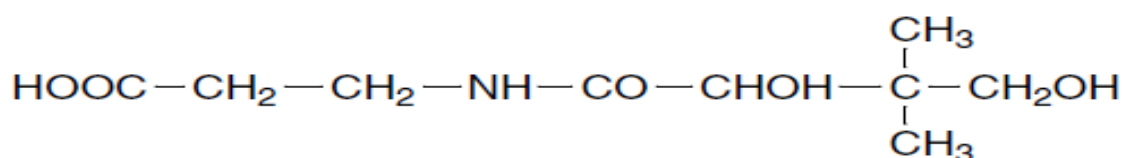
A deficiência desta vitamina pode resultar no desenvolvimento da pelagra, cujos sintomas incluem fadiga, cefaleia, depressão, falta de memória, erupção cutânea após exposição ao sol e vômitos (Ball, 2004; Kohlmeier, 2006). Estudos recentes demonstram que os benefícios da vitamina B3, para a saúde, vão para além de prevenir esta doença. Vários relatórios indicam que a niacina ajuda a combater a diabetes, a aterosclerose e o colesterol, contribuindo, ainda, na recuperação de queimaduras e na prevenção de cataratas e cancro de pele (Denu, 2005).

De modo a evitar a deficiência da vitamina B3, devem ser consumidas quantidades de niacina de acordo com os valores estabelecidos, em que as recomendações de ingestão são expressas em equivalente de niacina (EN), uma vez que o termo é designado para referir 1 mg de niacina ou 60 mg de triptofano. A DDR para homens adultos é de 16 mg de EN por dia e para as mulheres adultas é de 14 mg de EN por dia. Para as mulheres, estes valores aumentam para 18 mg de EN por dia durante a gravidez e para 17 mg de EN por dia durante a lactação (Insel *et al.*, 2007).

#### **- Vitamina B5 (ácido pantoténico)**

Em 1930, Roger J. Williams descobriu que as leveduras necessitavam de um determinado nutriente para crescer, a que lhe chamou de ácido pantoténico, sendo isolada, pela primeira vez, em 1938 (Ball, 2004; Insel *et al.*, 2007).

O ácido pantoténico (figura 15) compreende um derivado do ácido butírico (ácido pantóico) ligado por uma ligação peptídica ao aminoácido  $\beta$ -alanina (Ball, 2004).



**Fig. 15** – Estrutura química do ácido pantoténico. **Fonte:** Ball, 2004

A vitamina B5 é facilmente solúvel em acetato de etilo e água, mas pouco solúvel em éter etílico. A sua estabilidade é altamente dependente do pH. Ao contrário de outras vitaminas do complexo B, a B5 torna-se mais estável quando o pH da solução aumenta, apresentando-se estável a pH entre 5 e 7. Abaixo e acima destes valores, as soluções de ácido pantoténico são termolábeis. Embora apresente boa estabilidade na maioria dos alimentos durante o processamento, apresenta-se susceptível à lixiviação (Ball, 2006).

O ácido pantoténico ocorre, em alimentos, na forma livre e ligada. Cerca de 85% do ácido pantoténico ocorre ligado à coenzima A (CoA) (Gropner *et al.*, 2009). A actividade

biológica da vitamina B5 é atribuível à sua incorporação na estrutura molecular da CoA e na proteína transportadora de acilo. Como componente da CoA, o ácido pantoténico é essencial para numerosas reacções envolvidas na libertação de energia dos aminoácidos, gordura e açúcares (Ball, 2006).

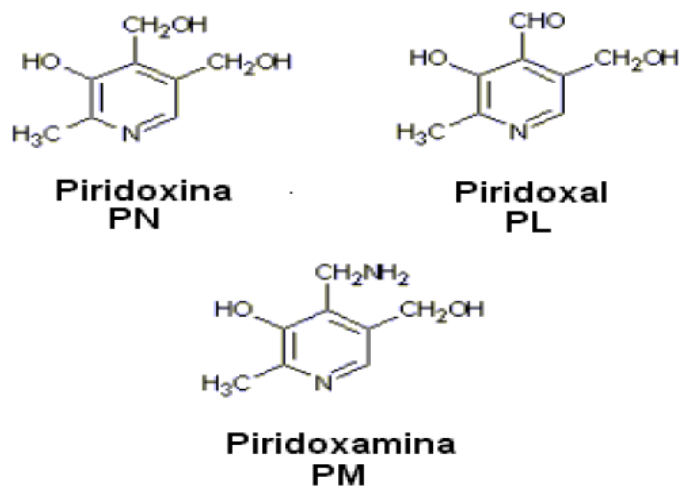
O Homem não consegue sintetizar o ácido pantoténico, dependendo das fontes alimentares para adquirir esta vitamina. A vitamina B5 é particularmente abundante nos órgãos animais (fígado, rim, coração) e também na gema de ovo, amendoins e favas. A carne magra, o leite, a batata e hortaliças verdes contêm menor quantidade desta vitamina, mas serão importantes fontes se consumidas em quantidades suficientes (Ball, 2004).

Numa dieta pobre em ácido pantoténico, os sintomas observados são a fadiga, dores de cabeça, sensação de fraqueza, dormência e a síndrome de “pés queimados” (Ball, 2006). De modo a evitar a deficiência de vitamina B5, a ingestão diária (IA) para adultos, homens e mulheres, é de 5 mg/dia. Estes valores aumentam para as mulheres se estas estiverem grávidas ou a amamentar, sendo 6 mg/dia e 7 mg/dia, respectivamente (Gropper *et al.*, 2009; Insel *et al.*, 2007).

### **- Vitamina B6 (Piridoxina)**

A vitamina B6 foi descoberta quase como um produto secundário dos estudos sobre a pelagra, adquirindo uma maior importância com a descoberta do seu papel fundamental na nutrição humana e animal, na década de 40 (Bayer, 2008).

O termo de vitamina B6 é a descrição genérica dos derivados do 3-hidroxi-2-metilpiridina (Ball, 2006), apresentando a mesma actividade biológica que a piridoxina (Ball, 2004). A vitamina B6 engloba 3 compostos: piridoxina (PN), piridoxal (PL) e piridoxamina (PM), que possuem, respectivamente, álcool, grupo aldeído e amina na posição 4 (figura 16); e os seus respectivos ésteres 5'- fosfato designados por piridoxol fosfato (PNP), piridoxal fosfato (PLP) e piridoxamina fosfato (PMP) (Ball, 2006).



**Fig. 16** – Estrutura química da PN, PL e PM. **Fonte:** Arruda, 2009.

A vitamina B6 é facilmente solúvel em água e pouco solúvel em etanol. Apresenta instabilidade durante o tratamento térmico prolongado e não é sensível ao ar. A estabilidade da vitamina B6 em alimentos processados e armazenados está dependente do derivado presente no alimento, pois o PN é mais estável ao calor do que o PL ou o PM (Ball, 2006).

Esta vitamina é essencial ao organismo, devido à sua participação em mais de 100 reacções enzimáticas, incluindo o metabolismo das proteínas, hidratos de carbono e lípidos; está envolvida na conversão do triptofano em niacina, no metabolismo do ácido fólico e na síntese e regulação de hormonas (Kannan, 2003).

A deficiência da vitamina B6 é rara uma vez que está presente, em quantidades consideráveis, em vários alimentos. Os sintomas mais evidentes caracterizam-se por distúrbios gastrointestinais e mudanças epiteliais (Ball, 2004). Segundo Cho (2005), as deficiências da vitamina B6 podem influenciar a taxa de deterioração funcional mental e física, pois níveis insuficientes podem estar associados a doenças cardiovasculares e podem contribuir para distúrbios neurológicos.

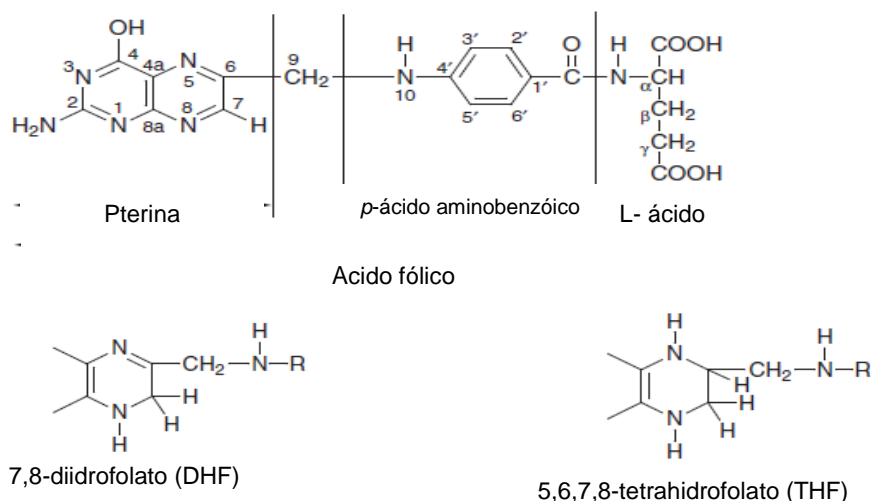
O Homem não consegue sintetizar a vitamina B6, sendo esta obtida através da alimentação, encontrando-se principalmente como PN, PLP e PMP (Ball, 2004). A piridoxina ocorre principalmente nas plantas, enquanto que o piridoxal e a piridoxamina encontram-se em produtos cárneos (Mansur, 2009). Extractos de levedura e fígado contêm altas concentrações de vitamina, bem como os cereais integrais, as nozes, os legumes, a carne magra, o peixe e a batata. Em quantidades mais baixas encontra-se no leite, ovos e fruta (Ball, 2004).

No sentido de se evitar a ocorrência de doenças associadas à deficiência de vitamina B6, foram estabelecidas DDR. Para homens e mulheres, com idade superior a 19 anos, a

DDR estabelecida é de 1,3 mg/dia. Para mulheres grávidas ou que se encontrem durante o período de lactação, estes valores aumentam para 1,9 mg/dia e 2,0 mg/dia, respectivamente (Otten *et al.*, 2006).

### - **Vitamina B9 (Ácido Fólico, Folato)**

Os termos folato e ácido fólico são normalmente usados como sinónimos da vitamina B9. O folato é um termo genérico para indicar os componentes que ocorrem naturalmente nos alimentos, apresentando uma actividade semelhante ao ácido fólico, que é um produto sintético (Ruggeri *et al.*, 1999). O termo “ácido fólico” (figura 16) refere-se especificamente ao ácido pteroilmonoglutâmico (PteGlu). Nos alimentos, o anel pterina é reduzido para dar origem ao 7,8 – diidrofolato (DHF) ou 5,6,7,8 – tetrahidrofolato (THF) (Ball, 2006).



**Fig. 17** – Estrutura química do ácido Fólico, THF e DHF. **Fonte:** Ball, 2006

A forma biológica do folato não é o ácido fólico, mas sim o seu metabólito reduzido THF. O THF actua como portador de unidades de carbono em reacções bioquímicas que levam à síntese das purinas (adenina e guanina) e à timina, que são a base do ADN (Ball, 2006).

O ácido fólico é um pó cristalino amarelo – laranja, praticamente insolúvel em água fria e pouco solúvel em água quente. Apresenta uma ligeira solubilidade em metanol e nenhuma solubilidade em acetona, éter ou benzeno (Ball, 2006). Em relação à estabilidade, é extremamente vulnerável ao calor, luz ultravioleta e oxigénio (Insel *et al.*, 2007). Pode perder-se por lixiviação durante a cozedura dos alimentos, uma vez que apresenta solubilidade em água quente (Ball, 2006).

O Homem não consegue sintetizar a vitamina B9, tal como acontece com várias vitaminas deste complexo. Através de alimentos como os feijões secos, ovos, verduras,

laranja, ervilhas, cereais, sementes de girassol e amendoins, obtêm-se boas fontes de folato. Estes produtos além de baratos, encontram-se disponíveis durante todo o ano. A carne e o peixe são pobres fontes desta vitamina, em comparação com os vegetais (Ball, 2006; Insel *et al.*, 2007).

Uma vez que a vitamina B9 é essencial para a síntese de ADN e divisão celular, metabolismo de aminoácidos e maturação dos glóbulos vermelhos, o consumo insuficiente pode ter várias consequências (Insel *et al.*, 2007). Em grávidas o consumo insuficiente de folato pode afectar o feto, conduzindo a defeitos no tubo neural em consequência das malformações que ocorrem na fase inicial do desenvolvimento fetal (Gjergja *et al.*, 2006). De modo a evitar problemas durante a gestação, as grávidas devem ter acompanhamento pré-natal e tomar suplementos de ácido fólico (Insel *et al.*, 2007). A deficiência de folato pode também provocar doenças vasculares, anemia megaloblástica, diminuição dos glóbulos brancos e plaquetas e pode estar associado ao aparecimento de cancro (Bailey, 1999).

O organismo absorve cerca de 100% de ácido fólico dos suplementos e alimentos fortificados, mas apenas dois terços de folato presente naturalmente em alimentos. Para dar conta desta diferença, o valor de DDR é expresso em equivalentes de folato (EF). De modo a evitar deficiências de vitamina B9, foram estabelecidas doses diárias. A DDR para homens e mulheres, maiores de 19 anos, é de 400 µg de EF por dia. Para mulheres grávidas ou lactantes, as doses aumentam significativamente passando a ser 600 µg de EF por dia para grávidas e 500 µg de EF por dia durante a lactação (Insel *et al.*, 2007).

### **- Vitamina B12 (Cobalamina)**

No início de 1920, Minot e Murphy demonstraram poder curar a anemia perniciosa, através da ingestão de fígado. Em 1945, um princípio activo foi concentrado a partir de tecido hepático, sendo em 1947 cristalizado por Lester Smith e Folkers, o qual foi designado de vitamina B12 (Paniz *et al.*, 2005).

A vitamina B12 é um termo genérico para o grupo de compostos, colectivamente conhecidos como cobalamina, que exibem actividade anti anemia perniciosa (Ball, 2006). A cobalamina é a maior e mais complexa de todas as vitaminas, estando presente em, praticamente, todas as células humanas (Esperanca, 2011).

A vitamina B12 (figura 18) comporta uma estrutura plana com um núcleo tetrapirrólico, albergando no seu centro um átomo de cobalto ligado a 4 átomos de azoto. O cobalto pode estar unido a um grupo hidroxilo, cianeto ou nitrito e em consequência a vitamina é conhecida por hidrox-, ciano- ou nitritocobalamina (Santos, 2003).

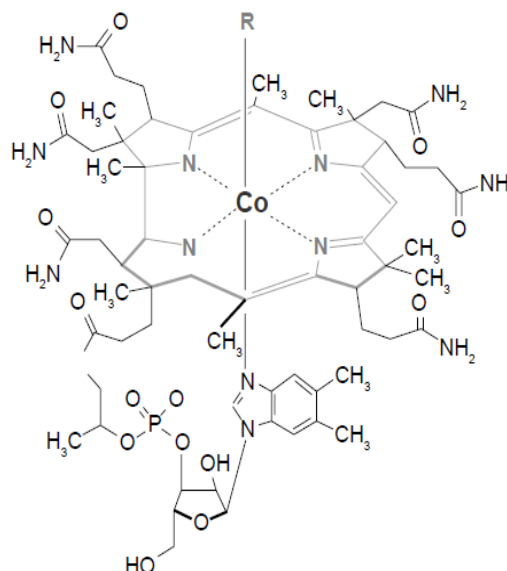
Esta vitamina apresenta-se na forma cristalina e de cor vermelha, devido à presença do cobalto. Apresenta elevada solubilidade em água e menor em álcoois, fenóis e etileno. Em acetona, éter e na maioria dos solventes orgânicos apresenta-se insolúvel (Ball, 2006). Quando em solução, a vitamina B12 é termoestável, mas sofre decomposição pela acção da luz, do ar, da humidade e dos alcalis (Esperanca, 2011).

A cobalamina desempenha um papel importante no metabolismo das proteínas, gorduras e açúcares, inclusive na absorção e conversão do ácido fólico na sua forma activa. A vitamina B12 é um estimulante do sistema imunitário, parecendo apresentar uma acção antioxidante e é responsável pelo metabolismo normal do tecido nervoso (Esperanca, 2011; Kirschmann, 2006). As co-enzimas mais activas são: a metilcobalamina e a 5-desoxiadenosil-cobalamina. A metilcobalamina é importante para a conversão da homocisteína em metionina, com a transformação do 5-metil-THF em THF. A 5-desoxiadenosil-cobalamina participa na conversão do metil-manonil CoA em succinil CoA (Esperanca, 2011; Santos, 2003).

A vitamina B12 é um produto do metabolismo bacteriano. A proteína animal é a única fonte de vitamina B12 em quantidades significativas (Kirschmann, 2006). Esta vitamina não se forma nas plantas, embora possam apresentar traços da sua presença devido a contaminações bacterianas ou vestígios de insectos. O fígado é uma excelente fonte de vitamina B12, bem como os rins e o coração. Carnes musculares, peixes, ovos, queijo e o leite são outras fontes igualmente importantes (Santos, 2003).

Ao contrário de outras vitaminas hidrossolúveis, a B12 é armazenada em vários tecidos do corpo, sendo as maiores concentrações encontradas no fígado, rins, coração, cérebro, sangue e medula óssea (Kirschmann, 2006). A excreção da vitamina é feita através da urina (Stargrove *et al.*, 2008).

O risco de deficiência de vitamina B12 está associado a desordens gástricas, a anemia perniciosa, desordens intestinais e insuficiência dietética. As manifestações clínicas



**Fig. 18** – Estrutura química da Cobalamina.  
**Fonte:** Paniz et al., 2005.

de deficiência de vitamina B12 incluem a anemia, perda de peso, degeneração das fibras nervosas e irreversíveis danos neurológicos (Barrios et al., 1999; Stargrove *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007).

De forma a evitar as deficiências de vitamina B12, foram estabelecidas DDR. Para homens e mulheres, de idade superior a 19 anos, a DDR é 2,0 µg/dia. Durante a gravidez e a lactação as mulheres necessitam de DDR superiores passando a ser necessária a ingestão de 2,5 µg/dia (Barrios et al., 1999).

### **6.1. Extracção das vitaminas do Complexo B**

Para a determinação das vitaminas do complexo B em carne, é necessária uma extracção prévia a fim de facilitar a sua análise. O método adequado de extracção depende dos seguintes critérios: a informação analítica necessária, a análise de informações exigidas, a natureza da matriz dos alimentos, a forma como a vitamina ocorre naturalmente ou é adicionada (diferentes formas de vitaminas são frequentemente encontradas em carnes, vegetais e produtos lácteos), a natureza e relativas quantidades de substâncias potencialmente interferentes, a estabilidade da vitamina ao calor e pH e a selectividade e especificidade do método analítico utilizado (Ball, 2006).

O procedimento de extracção para as vitaminas solúveis em água inclui uma hidrólise química da amostra, através da aplicação de ácido clorídrico (HCl) ou ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), uma hidrólise enzimática e uma desproteínização com ácido tricloroacético (TCA) (Ball, 2006).

#### *- Vitamina B1 (Tiamina)*

O procedimento de extracção, geralmente utilizado para a determinação do teor de vitamina B1, envolve uma hidrólise química, a quente, com a finalidade de desnaturar as proteínas e libertar as vitaminas da matriz, seguida por uma hidrólise enzimática que permite a ocorrência da desfosforilação da vitamina, completando a sua libertação (Ball, 2006).

Sendo a amostra utilizada carne de bovino, pode ser autoclavada a 121 °C, durante 30 minutos, com HCl 0,1 M uma vez que as formas fosforiladas da tiamina não são degradadas, nestas condições (Ball, 2006; Ndaw *et al.*, 2000). Por ser uma amostra proteica, pode ser necessária a adição de uma enzima proteolítica a fim de se dissolver as proteínas desnaturadas durante a hidrólise anterior (Ball, 2006).

Segundo van den Berg *et al.* (1996), num procedimento de extracção “ideal” após a hidrólise ácida segue-se uma hidrólise enzimática, em que a amostra é incubada a 37 – 45 °C durante 4h com a enzima takadiastase.

- *Vitamina B2 (Riboflavina)*

Durante a extracção da riboflavina, é necessário libertar a vitamina da matriz e converter totalmente a FAD para a forma FMN. Ambos os requisitos são facilmente realizados, através de uma autoclavagem das amostras a 121 °C, durante 30 minutos, com HCl 0,1 M (Watts *et al.*, 1947). Durante a hidrólise química, parte da coenzima FMN é hidrolisada a riboflavina. A conversão completa só pode ser alcançada por hidrólise enzimática, pelo uso da enzima takadiastase ou claradiastase (Ball, 2006). Para van den Berg *et al.* (1996), a hidrólise enzimática ocorre pela acção da enzima Takadiastase, durante a incubação da amostra a 37 – 45 °C durante 18h.

- *Vitamina B3 (Niacina)*

O método de extracção da niacina, em amostras de carne, difere segundo vários autores, resumindo-se, em todos, numa extensa hidrólise ácida.

Segundo Windahl *et al.* (1998), o procedimento recomendado para a extracção de niacina passa por uma autoclavagem das amostras na presença de 0,8 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por 2h a 121 °C ou através de um banho de água durante 5h. Durante a autoclavagem a nicotinamida é libertada da co-enzima e, simultaneamente, hidrolisada em ácido nicotínico.

Lahély, S. *et al.* (1999), procedeu à extracção num banho de água na presença de HCl (0,1 M), a 100 °C durante 1h. Uma parte do filtrado diluído e digerido foi então autoclavado a 120 °C, num meio de NaOH 0,8 M, durante 8h. Esta etapa apresenta como objectivo a total conversão da nicotinamida em ácido nicotínico, de forma a que só este possa ser determinado (Ball, 2006).

- *Vitamina B5 (Ácido pantoténico)*

Antes da determinação do ácido pantoténico é necessária a sua libertação principalmente da CoA. Uma vez que esta vitamina é sensível à hidrólise ácida e alcalina, a única alternativa é a extracção através de uma hidrólise enzimática. (Ball, 2006; Gonthier *et al.*, 1998). Para esta extracção podem ser usadas várias enzimas (Takadiastase, papaína, Claradiastase), sendo aplicadas sozinhas ou associadas (Gonthier *et al.*, 1998).

- *Vitamina B6 (Piridoxina)*

Para a determinação da vitamina B6 em produtos de origem animal, procede-se à autoclavagem das amostras com 0,055 M HCl, durante 5 h, a 121 °C (Ball, 2006).

A optimização da extracção tem mostrado que a utilização de uma hidrólise ácida mineral, a 121 °C durante 30 minutos, seguida de uma hidrólise enzimática combinada de fosfatase ácida e  $\beta$ -glicosidade favorece a libertação das principais formas da vitamina B6 (Kall, 2003), sendo determinados maiores valores desta vitamina (Ball, 2006).

- *Vitamina B9 (Folato)*

De modo a extrair uma maior quantidade possível de ácido fólico das amostras, durante a hidrólise enzimática devem ser adicionadas três enzimas (conjugases,  $\alpha$  – amílase, proteases) (Ball, 2006; Ruggeri *et al.*, 1999).

- *Vitamina B12 (Cobalamina)*

Os procedimentos de extracção da vitamina B12 têm, em geral, o duplo objectivo de libertar a vitamina das proteínas e converter as formas lábeis a uma forma mais estável (cianocobalamina ou sulfocobalamina) (Ball, 2006).

O procedimento de extracção implica uma homogeneização e autoclavagem (durante 10 minutos a 121 °C) da amostra com 0,1 M de tampão fosfato-citrato a pH 4,5 contendo  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . O processo térmico desnatura as proteínas, inactiva as enzimas e acelera a hidrólise da cobalamina a sulfocobalamina. Os métodos em que a amostra é aquecida através de banho-maria, em vez de autoclavados, podem não extrair completamente toda a vitamina da matriz da amostra (Ball, 2006).

## **6.2. Determinação das vitaminas do Complexo B**

### **6.2.1. Por HPLC**

A escolha do método cromatográfico depende dos processos de extracção e das vitaminas a serem determinadas. Para as vitaminas solúveis em água, os métodos incluem cromatografia de fase normal e reversa, cromatografia por troca iónica e cromatografia por exclusão (Ball, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (figura 19), é uma técnica de cromatografia em que a fase móvel é líquida e encontra-se sobre pressão, passando através de uma coluna que contém a fase estacionária, sendo um processo bastante eficiente e rápido (Skoog et al., 2006).

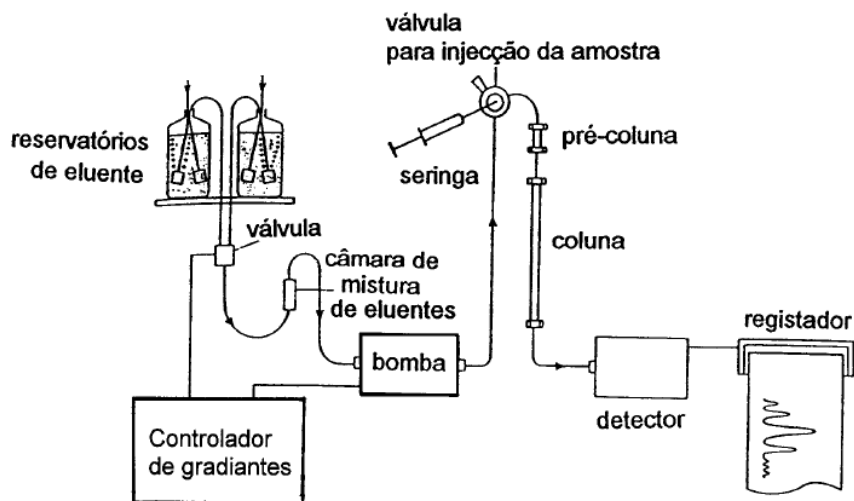


Fig. 19 – Representação esquemática de um HPLC . Fonte: Anónimo, s.d.

Segundo Ball (2004), o método mais adequado para o estudo de vitaminas em carne é por cromatografia de fase reversa.

Através do RP-HPLC é possível separar as moléculas com base nas suas diferenças de hidrofobicidade (Analyticalventura, 2005). Nesta técnica, a fase estacionária é apolar sendo a coluna mais utilizada a C18 (octadecil - sílica), em que a matriz de suporte (sílica) encontra-se ligada um n-alcano com 18 átomos de carbono (Química Analítica II, s.d.). Quando a amostra é injectada no HPLC, esta percorre a fase estacionária ficando retidas, por mais tempo, as moléculas que apresentam maior afinidade com a coluna, através de ligações hidrofóbicas. As moléculas que apresentam menor afinidade atravessam a coluna mais rapidamente. Após atravessarem a coluna os analitos são detectados, por um detector de UV/vis ou Fluorescência, de comprimento de onda variável, e quantificadas. Cada vitamina é identificada através do seu tempo de chegada (retenção), que depende do modo de interacção da vitamina com a fase estacionária (Ball, 2006).

### 6.2.2. Métodos bio - específicos para algumas vitaminas do Complexo B

Em alternativa ao HPLC, a determinação das vitaminas do complexo B pode ser realizada através de métodos bio-específicos. Os métodos bio-específicos recorrem ao uso de anticorpos ou a ocorrência natural da ligação vitamina - proteína, para a determinação das vitaminas B5, B6, B9 e B12 (Finglas, 1994).

Os métodos que utilizam anticorpos são classificados como imunoensaios, e baseiam-se na interacção específica de um anticorpo com o seu antigénio. Estes métodos são representados pelo radioimunoensaio, utilizado por Walsh *et al.* (1980) para a determinação da vitamina B5, e o ensaio imunoenzimático, para a determinação da vitamina B5 e B6 (Ball, 2006).

Os ensaios de ligação às proteínas caracterizam-se por uma ligação natural das vitaminas às proteínas, encontrando-se estas marcadas com radioactividade. Estes ensaios são utilizados para a determinação das vitaminas B9 e B12 (Ball, 2006).

A grande vantagem dos ensaios biológicos, é que podem ser executados em matrizes complexas. As diferentes etapas da análise podem ser automatizadas, recorrendo a equipamentos disponíveis comercialmente, mas o método só pode ser descrito como semi – automático uma vez que é necessário libertar as vitaminas da matriz através de procedimentos de extracção manuais (Ball, 2006).

## II. MATERIAL E MÉTODOS



A realização deste estudo decorreu no laboratório da Unidade Industrial Carne do INETI, no Instituto Nacional de Recursos Biológicos, e teve como principal objectivo a determinação e quantificação das vitaminas, do complexo B, na carne dos Açores.

### **1. Caracterização dos animais usados para o estudo**

Foram seleccionados para o estudo animais da raça Frísia Holstein produzidos nos Açores, recorrendo a um sistema extensivo.

### **2. Preparação da amostra**

Para o estudo em análise adquiriu-se o lombo de 20 animais da raça Frísia Holstein. O lombo com a respectiva estrutura óssea, vértebras lombares, e cobertura adiposa foi adquirido junto da respectiva Associação de Produtores, nos Açores. Do lombo, foi seleccionado o músculo *Longissimus Dorsi* e *Gluteus Medius*, desprovido de tecido adiposo e respectivas fáscias de tecido conjuntivo. O músculo limpo foi de imediato homogeneizado com o auxílio de uma picadora Moulinex, sendo posteriormente dividida em pequenas porções. As amostras foram embaladas a vácuo e mantidas a -80 °C até à execução da análise.

### **3. Procedimentos analíticos**

Para a determinação e quantificação das vitaminas do complexo B, foi necessário realizar vários ajustamentos de forma a obter um procedimento técnico que apresente melhores resultados. Todos os ensaios realizados encontram-se esquematizados no anexo 1, bem como as quantidades utilizadas de cada reagente. Os resultados encontram-se subdivididos pelos ensaios.

### **4. Determinação simultânea das vitaminas do Complexo B**

#### **4.1. Equipamentos**

- Polytron (Kinematica AG, Suíça);
- Autoclave (A.J.COSTA (irmãos Ltd), Portugal);
- Potenciómetro (Metrohm, Suíça);
- Estufa a 37°C (Memmert, Alemanha);

- Filtros GHP ACRODISC 25 mm 0,45 µm/PK (Labor Spirt, Lda).

#### **4.2. Reagentes**

- Ácido Clorídrico 0,1M (Fixanal, Alemanha);
- Acetato de Sódio 2M (Merck, Alemanha);
- Claradiastase (Sigma – Aldrich, USA);
- Takadiastase (Serva, Heidelberg);
- Solução Ácido tricloroacético (TCA) (Sigma – Aldrich, Alemanha) a 50%;
- Ácido Clorídrico 0,01 M (Fixanal, Alemanha);
- TFA

#### **4.3. Procedimento técnico**

##### **- Extracção**

Para todas as técnicas realizadas, pesou-se para um Erlenmeyer de 250 ml de vidro de âmbar 5 g de amostra de músculo homogeneizado, aos quais se adicionou HCl 0,1 M. Após a agitação da amostra, em polytron durante 1 minuto a 9000 rpm, esta foi colocada numa autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Findo este tempo, procedeu-se ao arrefecimento da amostra e ajustou-se o pH a 4.0 com acetato de sódio 2 M.

A amostra foi incubada a 37 °C durante 18 horas com uma suspensão de Claradiastase ou Takadiastase (neste caso o pH foi ajustado a 4.3 – 4.7). Após o período de incubação, e para algumas das técnicas, adicionou-se TCA a 50% e aqueceu-se a amostra em água fervente durante 10 minutos.

Todas as amostras foram arrefecidas e perpez-se o seu volume com HCl 0,01 M. Procederam-se a duas filtrações, uma através de papel de filtro e outra por Acrodisc de nylon 0,45 µm, e injectou-se, cada amostra, num HPLC.

Nota: foi necessário manter as amostras ao abrigo da luz, devido á sensibilidade por parte de várias vitaminas em estudo.

#### 4.3.1. Análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

O método de análise cromatográfico foi baseado no procedimento descrito por Albalá-Hurtado *et al.* (1997). As modificações no método ocorreram na composição da fase móvel e no tempo de corrida.

##### **- Equipamento**

O sistema HPLC usado é da marca Waters: Alliance 2690 Separations Module, composto por uma coluna de sílica de fase reversa (Waters C18 125A; 10 µm/3,9x300 mm e Waters C18: 5 µm/4,6x250 mm), um detector de fotodíodos UV - visível (Waters 996 Photodiode Array Detector) e um termoacumulador da marca Jetstream 2plus. O software utilizado nesta análise foi o Empower Pro.

##### **- Fase Móvel**

- Solvente A: Dissolveu-se TFA (Fluka, Alemanha) em 100 ml de água;
- Solvente B: ACN (Panreac, Espanha) a 100%.

##### **- Procedimento Técnico**

Volume injectado: de 50 a 100 µl.

Fase móvel: constituída por TFA em água e ACN a 100% com um fluxo entre 0,3 e 1ml/min.

Coluna: C18 ajustada a 20 °C

Detector: detector de UV/vis

Tempo de corrida: entre os 20 e os 30 minutos.

## **5. Validação do método cromatográfico**

Após o ajuste da metodologia, foram determinados alguns parâmetros de validação como a linearidade, limites de detecção e quantificação e a taxa de recuperação (exactidão).

### 1. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados directamente proporcionais à concentração do analíto, dentro de uma faixa de trabalho, onde se inserem as respostas das amostras (Ribani *et al.*, 2004). Pode ser representada pela equação da recta  $Y = aX + b$

Onde: Y= resposta medida

a= declive da recta

X= concentração do analíto

b= intersecção com os eixos YY

Para determinar a linearidade do método foram medidos 8 níveis de concentrações diferentes de padrão, em triplicado, para cada vitamina. Construiu-se o gráfico de concentração padrão x resposta, calculou-se a regressão linear utilizando todos os dados obtidos e o resultado foi avaliado. Para cada vitamina, foi também construído um gráfico de concentração padrão x resposta/concentração e verificada a dependência entre eles.

O parâmetro usado para avaliar a correlação da linearidade dos valores foi o coeficiente de correlação ( $R^2$ ). Assim, a linearidade da curva de calibração foi determinado pelo coeficiente de correlação da recta obtida, considerando que (Júnior *et al.*, 2001):

$r = 1$  : correlação perfeita;

$0,91 < r < 0,99$  : correlação fortíssima;

$0,61 < r < 0,91$  : correlação forte;

$0,31 < r < 0,60$  : correlação média;

$0,01 < r < 0,30$  : correlação fraca;

$r = 0$  : correlação nula.

## 2. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da amostra em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada pelo método. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da amostra em estudo que pode ser quantificada, com exactidão e precisão aceitáveis (Ribani *et al.*, 2004).

Os LD e LQ foram calculados utilizando-se o método baseado na relação sinal-ruído. Este método só pode ser aplicado em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, foi feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras com baixas concentrações de padrão adicionado e um branco (amostra sem padrão). Estabeleceu-se uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada (Ribani *et al.*, 2004).

Os critérios de LD podem ser adoptados para LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado a partir do método de relação sinal-ruído.

## 3. Taxa de recuperação (Exactidão)

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor real do analito (Ribani *et al.*, 2004). Para a avaliação da exactidão do método foi adicionado à amostra 10 mg de cada vitamina. A amostra foi sujeita ao mesmo processo de extracção para a determinação das vitaminas.

A taxa de recuperação foi calculada com base na seguinte equação:

$$\text{Taxa de recuperação (\%)} = \frac{\text{Quantidade encontrada do analito adicionado}}{\text{Quantidade de analito adicionado}} \times 100$$

## 6. Cálculos

Os teores de vitamina do complexo B são calculados com base numa técnica de padrão externo, a partir da altura do pico. O teor total para cada vitamina foi expresso em mg/100g de carne.

Foi usada uma curva de calibração para o perfil de cada vitamina estudada, para as alturas dos “picos” a que foi feita a detecção.

## 7. Análise dos resultados

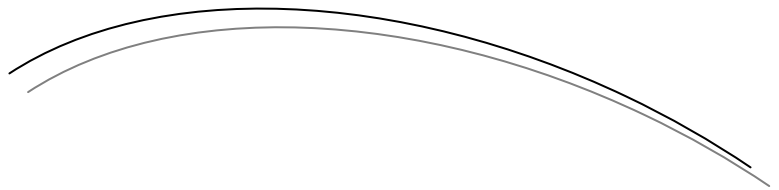
Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância, para um delineamento completamente causalizado.

Na constatação de que foram satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos de comparação das médias, foram realizadas as seguintes análises:

- Influência do tipo de músculo no teor de vitaminas: músculo Gm e Ld;
- Influência do peso no n.º de lactações: animais com 1-2 lactações e animais com 6-7 lactações;
- Influência das condições de produção no teor de vitaminas: fase seca ou fase de produção.

Estas análises foram efectuadas com os procedimentos GLM do SAS v.9.1.3.sp4 (SAS Institute Inc.,2003) e do Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004). Quando foram obtidos efeitos significativos entre os vários níveis dos factores ou das interacções, realizou-se o teste de comparação múltipla das médias, segundo o método de Tukey-Kramer (SAS v.9.1.3.sp4, SAS Institute Inc.,2003), para evidenciar as diferenças entre as médias a um nível de 95% de probabilidade. Os resultados da ANOVA e da comparação das médias encontram-se apresentados no Anexo 4 e 5.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO



Os resultados apresentados neste capítulo referem-se aos diferentes procedimentos técnicos realizados, de modo a ser possível a determinação simultânea das vitaminas, e ao estudo da influência de vários factores no teor de vitaminas. Neste sentido, o capítulo será dividido em dois subcapítulos.

## 1) Determinação simultânea das vitaminas do Complexo B, por HPLC

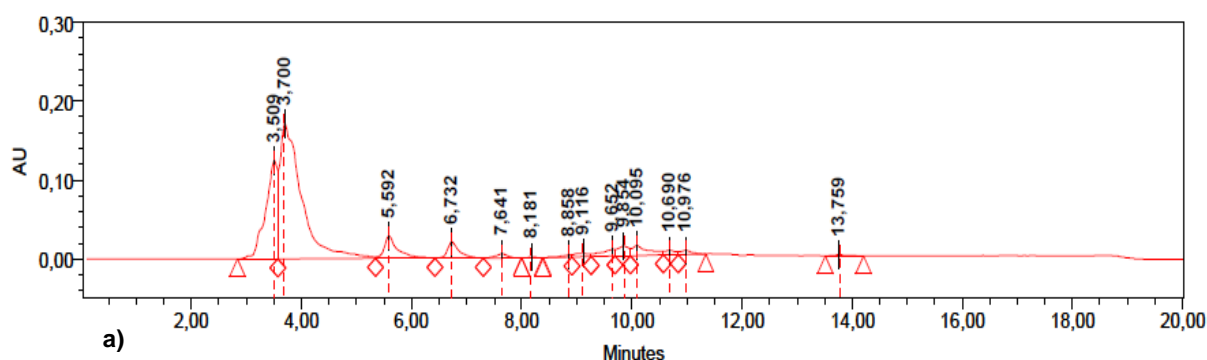
### 1.1. Escolha do método de extracção das vitaminas e das condições cromatográficas

Primeiro, foi necessário proceder à realização de vários procedimentos experimentais a fim de se otimizar a técnica de extracção. As técnicas realizadas ocorreram em ensaios diferentes e com procedimentos também diferentes, que se encontram no anexo 1.

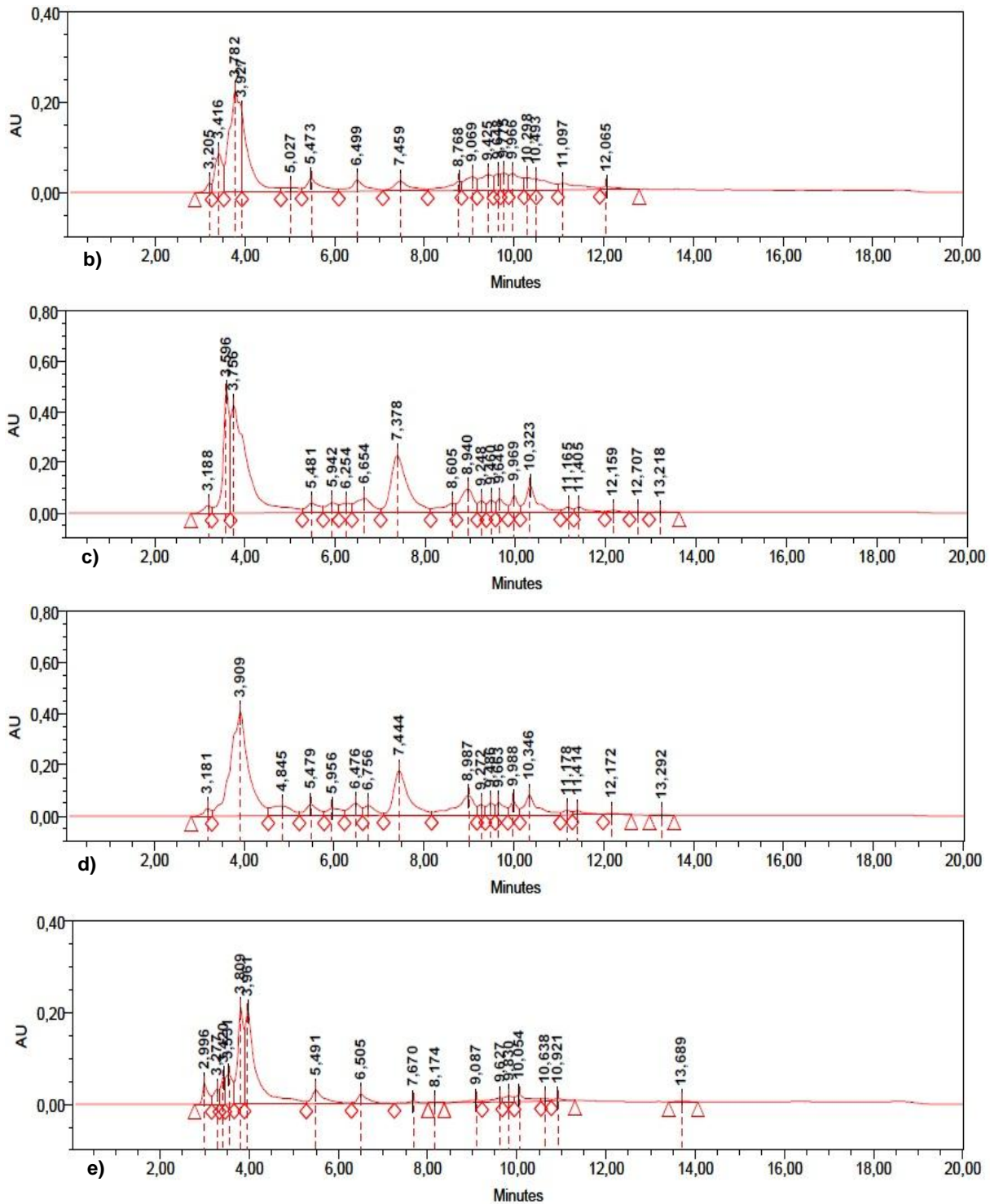
#### a) 1º Ensaio

Os primeiros procedimentos técnicos basearam-se em estudos realizados em trabalhos anteriores. No primeiro dia, realizaram-se cinco procedimentos diferentes para a mesma amostra. As condições cromatográficas aplicadas nestes procedimentos foram de um tempo de corrida de 20 minutos e um volume de injeção de 50 µl. No 1º ensaio foi utilizada uma coluna de sílica de fase reversa Waters C18 125A; 10 µm/3,9x300 mm, e uma fase móvel constituída por 0,3% TFA em água e ACN a 100%, com um fluxo de 1ml/min.

Em baixo, estão apresentados os cromatogramas obtidos em cada técnica (Figura 20):



**Fig.20** – Cromatogramas do 1º Ensaio, obtidos através de diversas técnicas: **a)** Técnica 1 (hidrólise ácida); **b)** Técnica 2 (hidrólise ácida e enzimática: CD); **c)** Técnica 3 (hidrólise ácida e enzimática: TK); **d)** Técnica 4 (hidrólise ácida, enzimática: CD e TCA); **e)** Técnica 5 (hidrólise ácida e TCA)



**Fig.20** – (continuação) Cromatogramas do 1º Ensaio, obtidos através de diversas técnicas: **a)** Técnica 1 (hidrólise ácida); **b)** Técnica 2 (hidrólise ácida e enzimática: CD); **c)** Técnica 3 (hidrólise ácida e enzimática: TK); **d)** Técnica 4 (hidrólise ácida, enzimática: CD e TCA); **e)** Técnica 5 (hidrólise ácida e TCA).

Tanto na técnica 1 como a 5, onde só se optou por uma hidrólise ácida os resultados obtidos foram pouco satisfatórios, como se pode observar pela representação gráfica (Figura 20 a) e e)). Comparando estes dois cromatogramas, com os restantes, verifica-se que após o minuto 4 o número de “picos” obtidos foi menor, sendo que a altura dos que apareceram foi inferior aos “picos” das técnicas em que se efectuou também uma hidrólise enzimática. Este resultado deve-se ao facto de não ter ocorrido a desfosforilação das vitaminas para a sua forma livre, não sendo assim detectadas pelo HPLC.

Os seguintes procedimentos técnicos englobavam a hidrólise ácida e a enzimática. Para a hidrólise enzimática, usou-se Claradiastase (Altangerel *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2006) ou Takadiastase (Esteve *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 2006) (técnica 2 e 3, respectivamente) e os resultados obtidos (Figuras 20 b) e c)) demonstram que a utilização de uma enzima é mais favorável, uma vez que potencia a desfosforilação das vitaminas, conduzindo a uma melhor detecção.

Na técnica 4 (Figura 20 d)), onde se adicionou TCA (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997), obtiveram-se bons resultados. Sendo o TCA um ácido bastante utilizado na precipitação de proteínas, a sua adição mostrou uma elevada eficácia na extracção das vitaminas. Não havendo desta forma interferência com as vitaminas, obteve-se um cromatograma com uma melhor visualização dos “picos”. O aglomerado verificado na figura 20 d) desapareceu, e registou-se uma melhor resolução dos “picos” das vitaminas.

Neste sentido, estipulou-se que em todos os procedimentos técnicos realizados em diante iria proceder-se à adição de TCA.

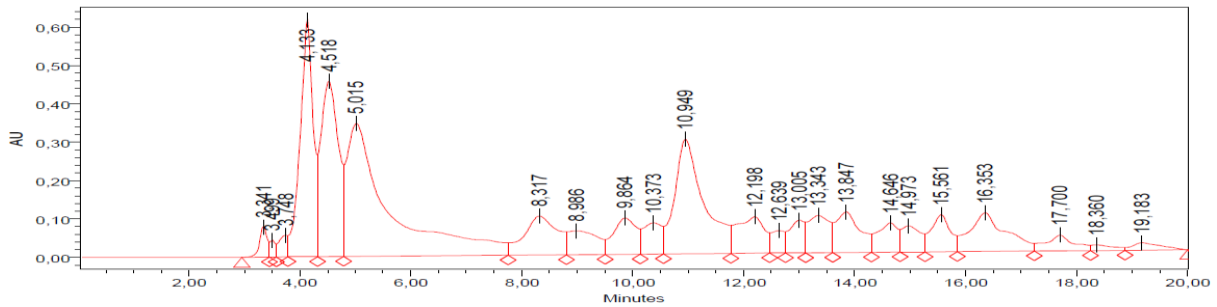
Embora seja possível verificar que vários “picos” encontram-se mais acentuados que outros, não foi ainda possível identificar as vitaminas em estudo.

## **b) 2º Ensaio**

Com o objectivo de obter uma melhor separação dos “picos”, alterou-se o fluxo para 0,3 e 0,5 ml/min relativamente ao gradiente inicial de 1 ml/min. O cromatograma obtido (figura 21) bem como o respectivo gradiente (Tabela 1) encontram-se representados a seguir.

**Tabela 1** – Características do Gradiente 1

Tempo	Fluxo	%A	%B	%C	%D
	1,00	100,0	0,0	0,0	0,0
2,00	1,00	97,0	0,0	3,0	0,0
6,00	0,30	85,0	0,0	15,0	0,0
15,00	0,50	80,0	0,0	20,0	0,0
16,00	0,50	100,0	0,0	0,0	0,0
20,00	0,50	100,0	0,0	0,0	0,0

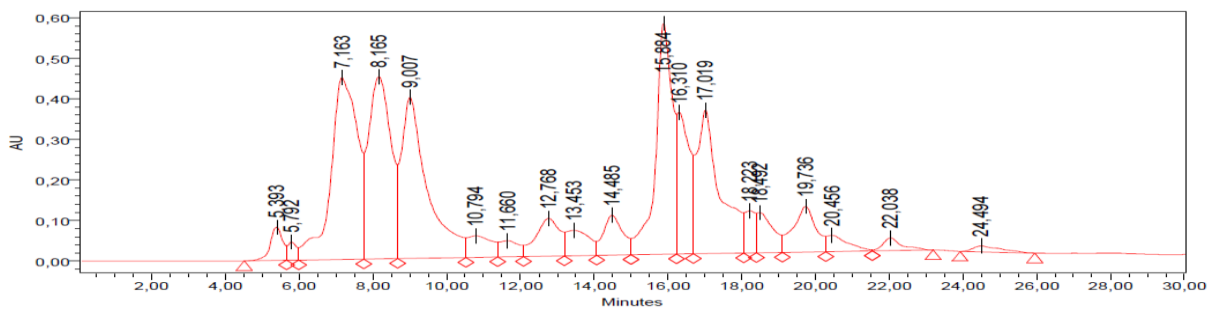


**Fig. 21** – Cromatograma característico do Gradiente 1

De modo a resolver os “picos” que saíram entre os 3 e os 6 minutos, ajustou-se um novo gradiente (Tabela 2).

**Tabela 2** – Características do Gradiente 2

Tempo	Fluxo	%A	%B	%C	%D
	1,00	100,0	0,0	0,0	0,0
2,00	1,00	97,0	0,0	3,0	0,0
2,50	0,30	97,0	0,0	3,0	0,0
3,00	0,30	85,0	0,0	15,0	0,0
25,00	0,30	80,0	0,0	20,0	0,0
26,00	0,30	100,0	0,0	0,0	0,0
30,00	0,30	100,0	0,0	0,0	0,0



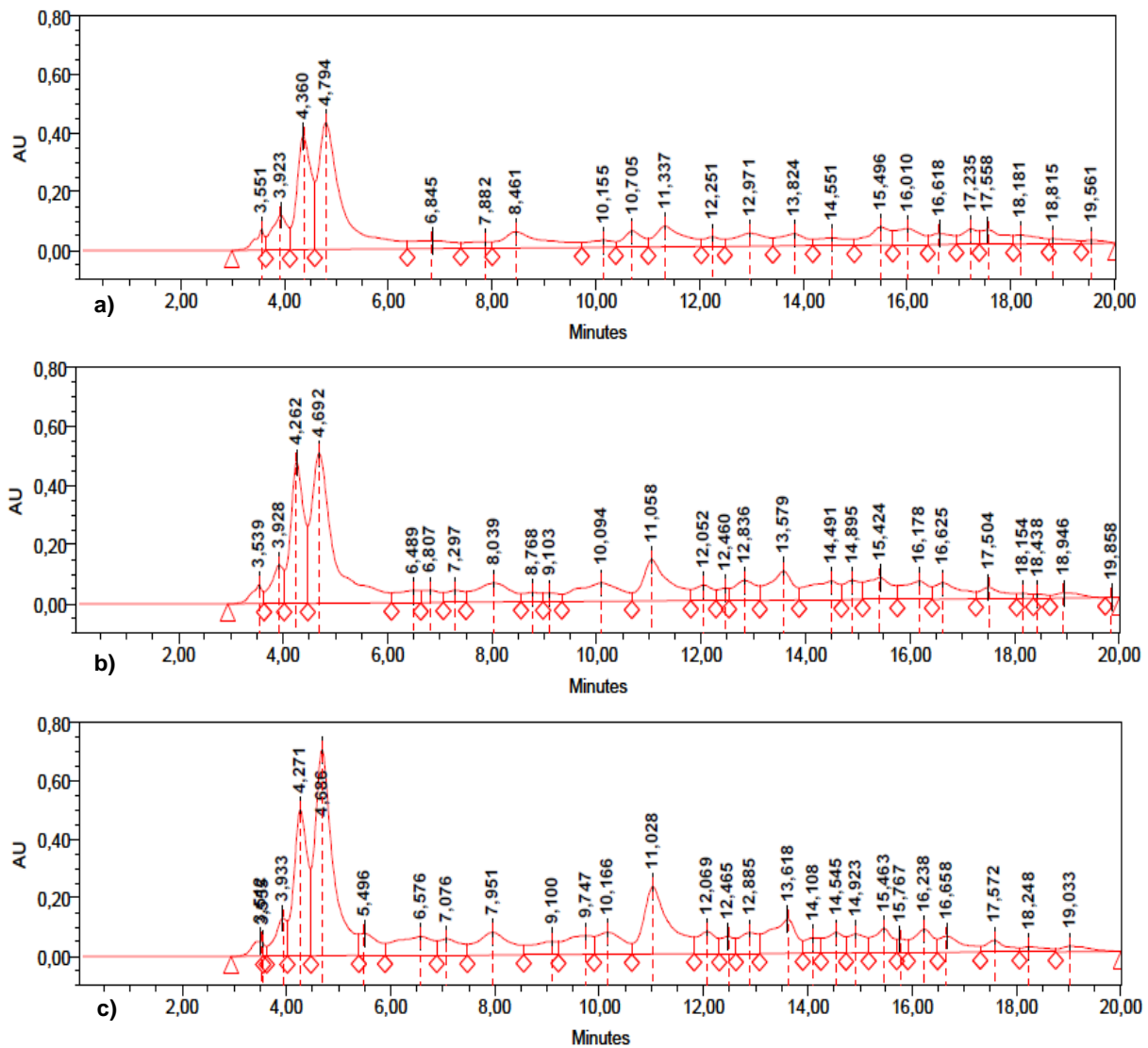
**Fig. 22** – Cromatograma característico do Gradiente 2

Este gradiente não melhorou a resolução, pois os “picos” que saíam entre os 11 e os 15 minutos passaram a sair aglomerados entre os 15 e os 19 minutos. Deste modo, manteve-se o gradiente 1.

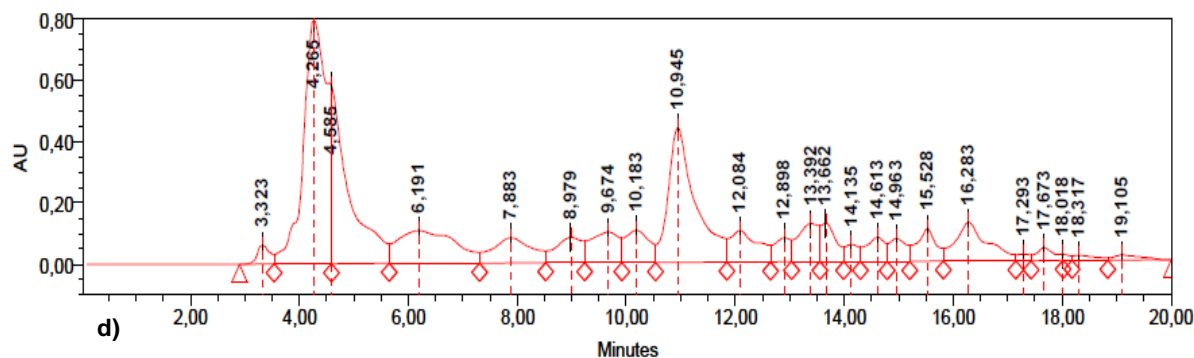
O facto de se diminuir o fluxo, permitiu que o volume de amostra injectado atravessasse a coluna do HPLC mais lentamente, havendo deste modo uma melhor separação dos “picos” ao longo do tempo de corrida, traduzindo-se numa maior resolução.

Outra das alterações foi a adição directa da Claradiastase, em vez de esta ser aplicada em solução. As condições cromatográficas mantiveram-se iguais às aplicadas no 1º ensaio, à excepção do fluxo.

A representação gráfica seguinte (Figura 23) mostra as quatro técnicas, com diferentes quantidades de Claradiastase.



**Fig. 23** – Cromatogramas do 2º ensaio, obtidos através de diversas técnicas: **a)** Técnica 1 (0,05 g CD); **b)** Técnica 2 (0,1 g CD); **c)** Técnica 3 (0,2 g CD); **d)** Técnica 4 (0,5 g CD).



**Fig. 23** – (continuação) Cromatogramas do 2º ensaio, obtidos através de diversas técnicas: **a)** Técnica 1 (0,05 g CD); **b)** Técnica 2 (0,1 g CD); **c)** Técnica 3 (0,2 g CD); **d)** Técnica 4 (0,5 g CD).

Fazendo uma comparação dos quatro cromatogramas obtidos, verifica-se que a técnica 2, 3 e 4 (figura 23 b), c) e d) respectivamente) apresentam melhores resultados. Na figura 23 a), não se consegue identificar as vitaminas em estudo, uma vez, que não há qualquer diferenciação dos “picos”, a partir do minuto 6. Concluiu-se que a quantidade de enzima aplicada (0,05g) é insuficiente.

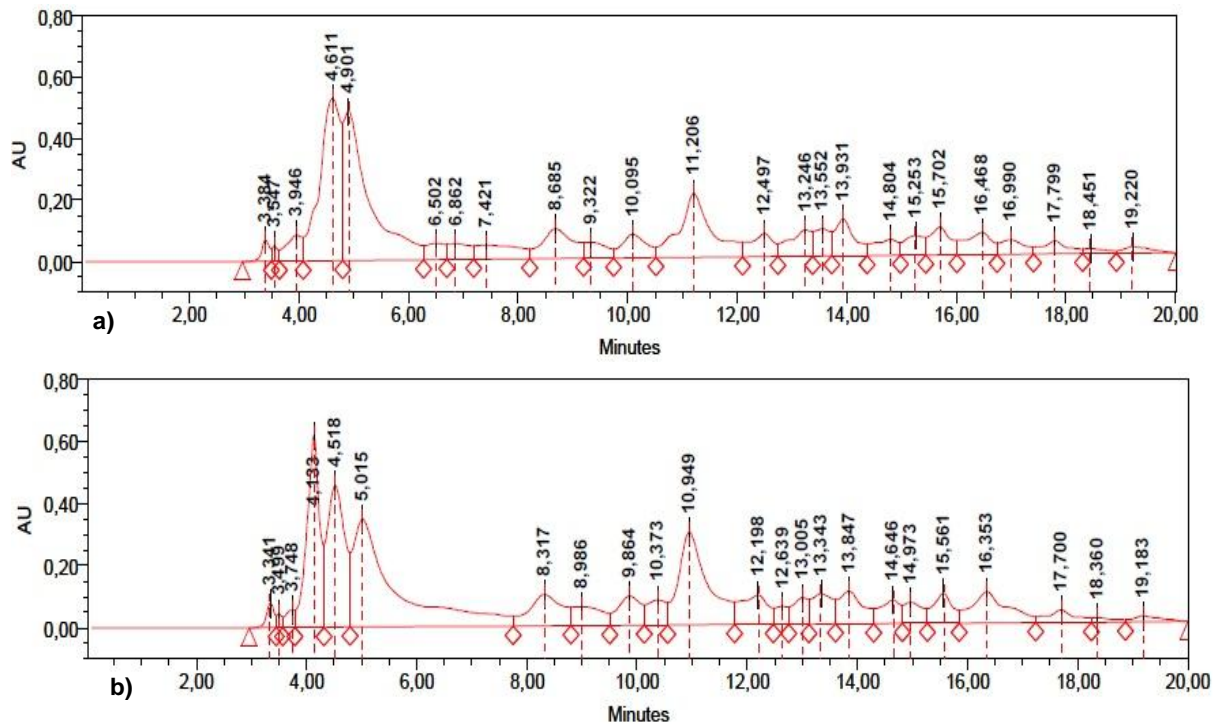
Nas restantes quantidades, verifica-se a diferenciação dos “picos” das vitaminas, sendo possível a sua identificação. Uma vez que tanto a técnica 2 e 3 apresentam resultados satisfatórios, torna-se desnecessária a aplicação de uma quantidade de enzima superior (0,5g), visto que os resultados obtidos são semelhante.

O 2º ensaio, levou a concluir que a aplicação directa da Claradiastase apresenta melhores resultados do que a aplicação da enzima em solução, e a alteração do fluxo proporciona uma melhor visualização uma vez que os “picos” não se encontram todos aglomerados no início da corrida (Figura 20), havendo um “espalhamento” pelo cromatograma ao longo de todo o tempo de corrida.

### c) 3º Ensaio

Como os resultados obtidos pela adição de 0,2 g de Claradiastase foram satisfatórios, realizou-se novamente este procedimento técnico, bem como um procedimento em que a enzima utilizada foi a Takadiastase, com a aplicação da mesma quantidade (0,2g) e com TCA.

De modo a obter uma melhor visualização dos gráficos, injectou-se um volume de amostra superior (100 µl) e manteve-se o mesmo tempo de corrida (20 minutos), Os resultados obtidos encontram-se na figura seguinte:



**Fig.24** – Cromatogramas do 3º ensaio, obtidos através de diversas técnicas: **a)** Técnica 1 (0,2 g CD); **b)** Técnica 2 (0,2 g TK).

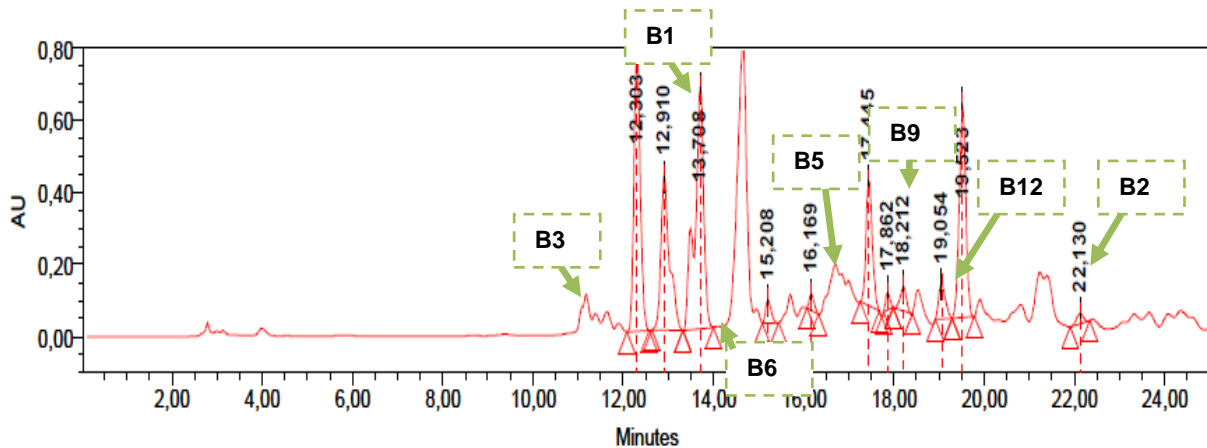
Embora os dois resultados sejam satisfatórios, ao comparar-se o cromatograma da Claradiastase com a Takadiastase, verifica-se que os “picos” iniciais encontram-se mais separados e diferenciados na amostra em que se aplicou a Takadiastase. Embora ambas as enzimas apresentem bons resultados, a Takadiastase demonstra uma melhor afinidade para as amostras em estudo.

#### d) 4º Ensaio

Uma vez determinada que para a extração das vitaminas do complexo B das amostras em estudo, a melhor enzima será a Takadiastase foram feitas algumas alterações a nível das condições cromatográficas. A coluna foi substituída, optando-se por uma da marca Waters C18: 5µm / 4,6x250 mm. A fase móvel e o tempo de corrida também sofreram alterações. Houve um aumento da concentração da fase móvel, passando de 0,3 ml de TFA para 1 ml, e o tempo de corrida passou de 20 para 25 minutos. O tempo de corrida sofreu alteração, pois a modificação das condições cromatográficas levou a que a vitamina B12 não fosse detectada. Ao se ajustar um novo tempo de corrida verificou-se o aparecimento da vitamina por volta dos 22 minutos.

Sendo o TFA um ácido muito forte, vai suprimir a ionização das vitaminas. Torna-se necessário ajustar o pH da fase móvel a 3,5 de modo a evitar o efeito causado pelo ácido. Obtêm-se maiores tempos de retenção se ocorrer uma total ionização do soluto, conduzindo, deste modo, a uma melhor separação dos “picos” cromatográficos.

O cromatograma obtido encontra-se representado a seguir (Figura 25):



**Fig. 25:** Cromatograma 4º Dia

Comparando-se o cromatograma obtido com o cromatograma da Figura 24 b), é notória a melhoria registada. O facto de se ter modificado as condições cromatográficas contribuiu para a obtenção de melhores resultados. Registou-se um menor número de “picos”, uma boa separação cromatográfica e foi possível identificar as vitaminas em estudo (o que até aqui se tornava complicado, visto que apenas alguns dos “picos” se conseguiam destacar), a partir dos espectros e tempos de retenção característicos, como descrito no ponto 1.2, dos resultados e discussão. O facto de o tempo de corrida ser superior, permitiu uma melhor separação dos “picos” ao longo do cromatograma. É igualmente notória a alteração dos “picos” cromatográficos, tendo estes apresentado uma melhor forma devido ao aumento da concentração da fase móvel.

Deste modo, a técnica utilizada para a determinação e quantificação das vitaminas presentes na carne será a técnica cuja enzima responsável pela hidrólise enzimática é a takadiastase, com uma quantidade de 0,2g, e com a adição de TCA. As condições cromatográficas serão um fluxo de 0,3 e 0,5 ml/min, volume de injeção de 100 µl e um tempo de corrida de 25 minutos.

## 1.2. Identificação das vitaminas em estudo

No sentido de identificar os “picos” representados nos cromatogramas, foi necessário injectar padrões das vitaminas de forma a obter os espectros característicos, o tempo de retenção e o comprimento de onda, para cada vitamina em estudo. As condições cromatográficas (volume de injeção, fluxo, tempo de corrida e fase móvel) para os padrões foram iguais às condições utilizadas na técnica escolhida (melhor procedimento técnico realizado).

A seguinte figura representa um cromatograma característico dos padrões das vitaminas e os respectivos tempos de retenção (Figura 26):

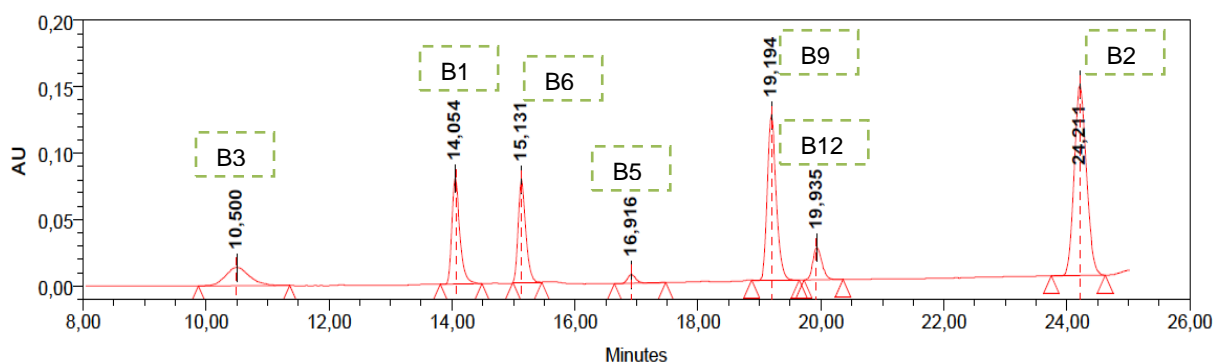


Fig. 26 – Cromatograma característico dos padrões das vitaminas.

A representação dos espectros encontra-se no anexo 2, os tempos de retenção e o comprimento de onda estão representados na tabela seguinte (Tabela 3).

Tabela 3 – Tempos de retenção e comprimentos de onda

Vitamina Detectada	Tempo retenção (min.)	Comp. Onda (nm)
Nicotinamida (B3)	10 – 12	261
Tiamina (B1)	12,1 – 14	246
Piridoxina (B6)	14,1 – 16	291
Ácido Pantoténico (B5)	16,1 – 18	278
Ácido Fólico (B9)	18,1 – 18,6	283
Cobalamina (B12)	18,7 – 20	361
Riboflavina (B2)	20,1 – 25	268

Após a determinação do procedimento técnico e a identificação das vitaminas, foi necessária a validação do método de análise para as vitaminas.

### 1.3. Validação do método de análise para as vitaminas

#### - Linearidade

A linearidade foi determinada para cada vitamina, em estudo. Os coeficientes de correlação ( $r$ ) obtidos para todos os casos demonstram que o método possui uma correlação elevada  $0,91 < R^2 < 0,99$ .

A tabela seguinte (Tabela 4) apresenta, para cada vitamina, a equação da sua curva de calibração, bem como o coeficiente de correlação. As representações gráficas das curvas de calibração encontram-se no anexo 3.

**Tabela 4** – Curvas de calibração e respectivos coeficientes de correlação

<b>Vitamina Detectada</b>	<b>Curvas de calibração</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>
<b>Tiamina (B1)</b>	$Y = 318517X + 7692,7$	$R^2: 0,9993$
<b>Riboflavina (B2)</b>	$Y = 559936X + 15942$	$R^2: 0,9991$
<b>Nicotinamida (B3)</b>	$Y = 48807X + 1644,2$	$R^2: 0,9919$
<b>Ác. Pantoténico (B5)</b>	$Y = 239689X - 2208,6$	$R^2: 0,9993$
<b>Piridoxina (B6)</b>	$Y = 286992X + 5910,1$	$R^2: 0,9993$
<b>Ác. Fólico (B9)</b>	$Y = 554394X - 4736,6$	$R^2: 0,9977$
<b>Cobalamina (B12)</b>	$Y = 103988X + 1527,8$	$R^2: 0,9994$

#### - Limite de detecção e quantificação

Os resultados para o LD e o LQ, obtidos utilizando o detector UV/vis, estão apresentados na tabela 5. Estes resultados revelam uma boa detectabilidade do método na determinação de vitaminas do complexo B, nas amostras em estudo.

**Tabela 5** – Limites de detecção e quantificação

<b>Vitamina</b>	<b>LD (mg/100g)</b>	<b>LQ (mg/100g)</b>
<b>Tiamina (B1)</b>	0,0450	0,13
<b>Riboflavina (B2)</b>	0,0480	0,14
<b>Nicotinamida (B3)</b>	0,0950	0,29
<b>Ác. Pantoténico (B5)</b>	0,3330	1,00
<b>Piridoxina (B6)</b>	0,0620	0,19
<b>Folato (B9)</b>	0,2480	0,75
<b>Cobalamina (B12)</b>	0,1120	0,34

- *Taxa de recuperação (Exactidão)*

A exactidão do método foi obtida através da taxa de recuperação, adicionando à amostra dois níveis de concentração. A literatura descreve que os intervalos aceitáveis estão geralmente entre os 70 e os 120%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120% de modo a garantir a integridade da amostra. Caso contrário, deve-se verificar todo o procedimento (Ribani *et al.*, 2004). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 6.

**Tabela 6** – Taxa de Recuperação (%)

<b>Vitamina</b>	<b>TR (%)</b>
<b>Tiamina (B1)</b>	61,0
<b>Riboflavina (B2)</b>	55,5
<b>Nicotinamida (B3)</b>	141,0
<b>Ác. Pantoténico (B5)</b>	83,4
<b>Piridoxina (B6)</b>	76,4
<b>Folato (B9)</b>	41,5
<b>Cobalamina (B12)</b>	26,4

Estes valores demonstram que o método de extracção utilizado não é o mais adequado para a nicotinamida, o folato e a cobalamina, uma vez que apresentam taxas de recuperação fora dos valores estipulados (50 – 120%).

Uma das possíveis razões para a vitamina B3 apresentar uma taxa de recuperação superior a 120%, é a existência de substâncias interferentes.

No caso da vitamina B12, o facto de apresentar sensibilidade ao ácido, a hidrólise ácida realizada levou à destruição de grande parte da vitamina presente, justificando-se assim o baixo valor de taxa de recuperação. No método utilizado, o ácido clorídrico é responsável pela hidrólise ácida, o que permite às vitaminas libertarem-se da matriz. O ácido utilizado diminui o pH da solução, encontrando-se este entre 1,3 – 1,5, levando à destruição da cobalamina. A vitamina B12 apresenta estabilidade a pH 5 – 7, podendo a estes valores de pH ser autoclavada a 121 °C, durante 20 minutos, sem sofrer perdas consideráveis (Ball, 2006).

A taxa de recuperação para a vitamina B9, também apresentou valores inferiores aos aceitáveis, indicando, assim, que método de extracção não é dos mais adequados. De acordo com a revisão bibliográfica (Ball, 2006), para uma boa extracção desta vitamina é necessária a utilização de três enzimas em simultâneo (conjugases,  $\alpha$ -amílase, proteases).

O método de extracção deve ser modificado de modo a melhorar a extracção do folato e da cobalamina, mas sem comprometer as restantes vitaminas. Uma das opções seria a realização de duas extracções para cada amostra, uma para as vitaminas B1, B2, B3, B5, B6 e B9 em que se adicionaria  $\alpha$ -amílase, de modo a aumentar a extracção de vitamina B9; a outra extracção seria para a vitamina B12, em que se optaria pela utilização de um ácido mais fraco, de modo a conferir à solução um pH entre 5 – 7.

#### 1.4. Teores de vitaminas obtidos na carne de bovino

A partir dos cromatogramas obtidos de cada amostra (Figura 27) procedeu-se à quantificação do teor de vitaminas, a partir da altura do pico (Tabela 7). Na figura seguinte, encontra-se um dos cromatogramas obtidos, a partir do qual se quantificou as vitaminas.

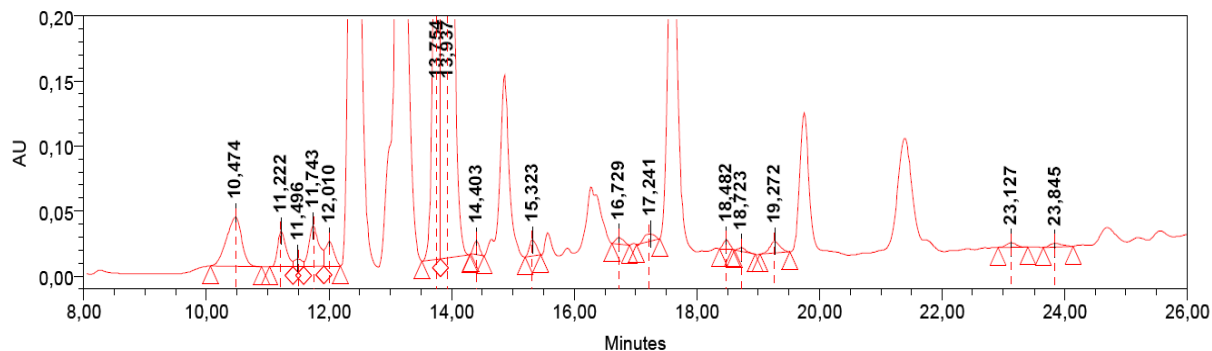


Fig. 27 – Cromatograma característico de uma amostra

Tabela 7 – Resultados característicos de uma amostra

	Nome	Tempo Retenção	Área	Altura
1	B3	11,743	353976	30944
2	B1	13,754	2390722	330689
3	B6	14,403	65799	10270
4	B5	16,729	43273	4829
5	B9	18,482	42976	6497
6	B12	19,272	106108	8963
7	B2	23,845	37064	2630

Os teores médios de vitaminas obtidos para os músculos Ld e Gm, a partir das 20 amostras de carne, encontram-se na tabela seguinte (Tabela 8):

**Tabela 8** – Teores de vitaminas obtidos nas amostras em estudo

	Valor obtido (mg/100 g)		
	Ld	Gm	<i>p</i>
Teor de Tiamina	0,628	0,854	*
Teor de Riboflavina	0,269	0,163	n.s.
Teor de Niacina	5,226	6,243	n.s.
Teor de Ácido Pantoténico	1,018	1,009	n.s.
Teor de Piridoxina	1,873	1,888	n.s.
Teor de Folato	0,111	0,108	n.s.

n.s. – não significativo; \*diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Os teores da cobalamina não foram contabilizados, uma vez que os valores obtidos foram muito superiores aos esperados.

Embora a carne de bovino não seja dos produtos alimentares mais ricos em vitaminas B, é um grande contributo para o fornecimentos destes compostos ao organismo.

Os teores médios obtidos foram comparados com valores obtidos em outros trabalhos realizados (Tabelas 9 a 12).

**Tabela 9** – Teores de tiamina encontrados em carne de bovino

	Leonhardt, 1997 (mg/100g)	Lombardi – Boccia, G. et al., 2005 (mg/100g)	Williams, 2007 (mg/100g)
Teor de Tiamina	Ld 0,04 ± 0,01	Ld 0,08 ± 0,01	Ld, Gm* 0,04

\*valores médios para os músculos Ld e Gm

**Tabela 10** – Teores de riboflavina encontrados em carne de bovino

	<b>Leonhardt, 1997 (mg/100g)</b>	<b>Silva, 2008 (mg/100g)</b>	<b>Williams, 2007 (mg/100g)</b>
<b>Teor de</b>	Ld	Ld	Ld, Gm*
<b>Riboflavina</b>	0,13 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,18

\*valores médios para os músculos Ld e G

**Tabela 11** – Teores de niacina encontrados em carne de bovino

	<b>Lombardi – Boccia, G. et al., 2005 (mg/100g)</b>	<b>Williams, 2007 (mg/100g)</b>
<b>Teor de</b>	Ld	Ld, Gm*
<b>Niacina</b>	5,7 ± 0,25	5

\*valores médios para os músculos Ld e Gm

**Tabela 12** – Teores de ácido pantotênico e piridoxina em carne de bovino

	<b>Williams, 2007 (mg/100g)</b>
<b>Teor de ácido pantotênico</b>	Ld, Gm *
	0,35
<b>Teor de Piridoxina</b>	0,52

\*valores médios para os músculos Ld e Gm

**Tabela 13** – Teores de folato em carne de bovino

	<b>INSRJ, s.d (µg/100g)</b>
<b>Teor de folato</b>	Ld, Gm *
	16

\*valores médios para os músculos Ld e Gm

Comparando-se os valores obtidos, com os encontrados em outros estudos, verifica-se que, de um modo geral, os teores das vitaminas nas amostras analisadas são superiores aos encontrados na bibliografia.

## 2. Estudo da influência de vários factores no teor de vitaminas

Para o estudo da influência do tipo de músculo, número de lactações e condição de produção dos animais, procedeu-se a uma análise estatística como referido no ponto 7 dos materiais e métodos.

A análise de variância, para cada vitamina, encontra-se no anexo 4 e as médias obtidas, e respectivos erros padrão, encontram-se no anexo 5.

### 2.1. Influência do tipo de músculo no teor de vitaminas

Uma vez que para o estudo foram utilizadas amostras provenientes dos músculos *Longissimus Dorsi* e *Gluteus Medius*, achou-se necessária a comparação dos dois músculos, nas várias vitaminas, a fim de se verificar uma possível influência nos teores das vitaminas hidrossolúveis.

**Tabela 14** – Análise estatística da influência do músculo no teor de vitaminas

	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>Nível significância</b>
<b>B1</b>	4,648	0,0345	*
<b>B2</b>	3,318	0,0728	n.s.
<b>B3</b>	1,299	0,2581	n.s.
<b>B5</b>	0,004	0,9472	n.s.
<b>B6</b>	0,003	0,9555	n.s.
<b>B9</b>	0,008	0,9287	n.s.

n.s. – não significativo; \* diferença significativa ( $p < 0,05$ )

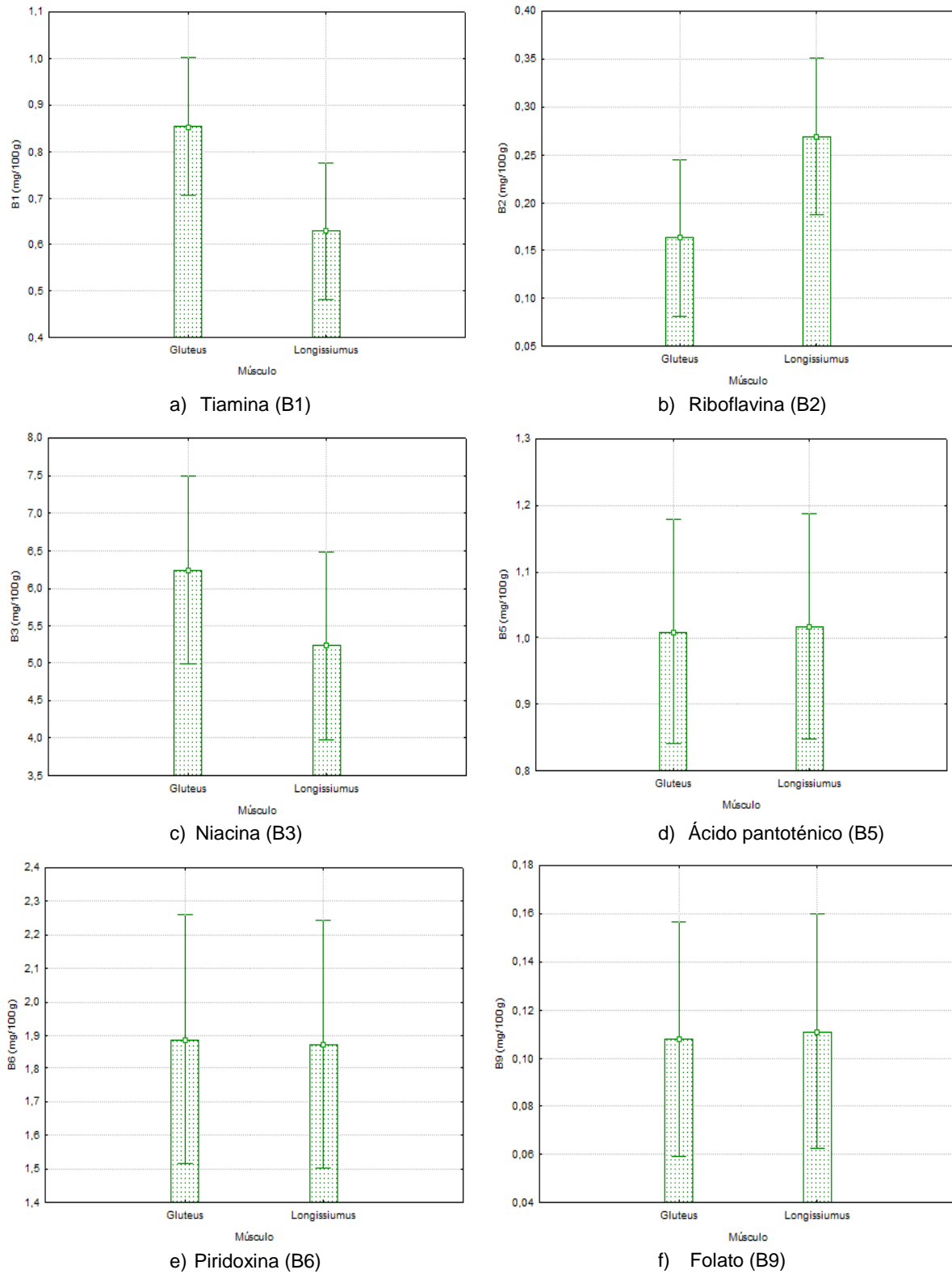


Fig. 28 – Influência do tipo de músculo no teor de vitaminas

O factor músculo revelou uma influência significativa no teor de vitamina B1 (Tabela 14) ( $F= 4,648$ ;  $p<0,05$ ), contudo a separação das médias efectuada segundo Tukey não evidenciou diferenças significativas entre os valores médios obtidos para os dois músculos em estudo (Figura 28; Anexo 5).

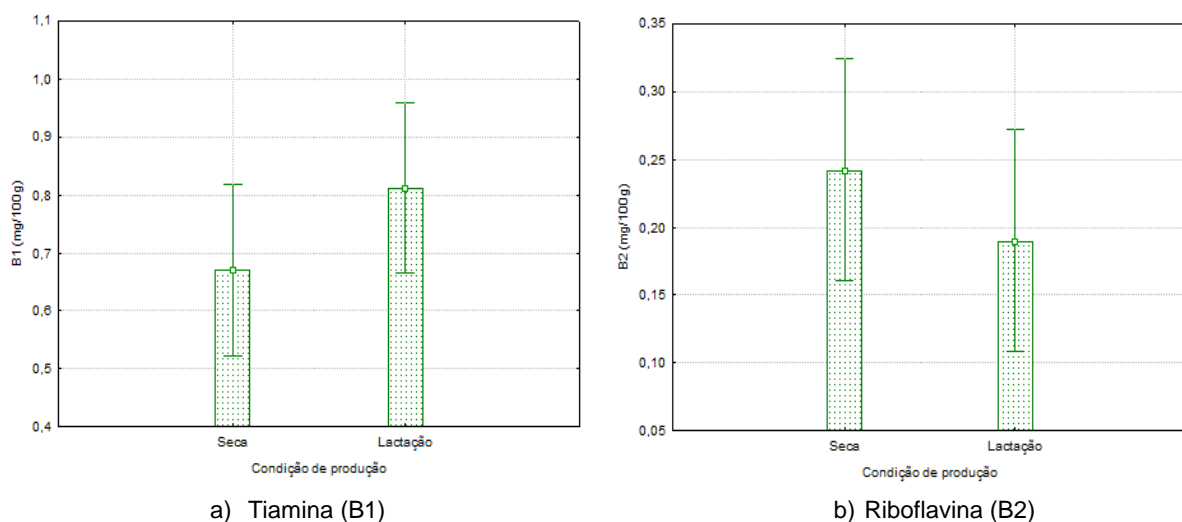
## 2.2. Influência das condições de produção no teor de vitaminas

Outro dos factores analisados foi a condição da produção dos animais, isto é, se no momento do abate encontravam-se em fase de produção de leite ou em fase seca.

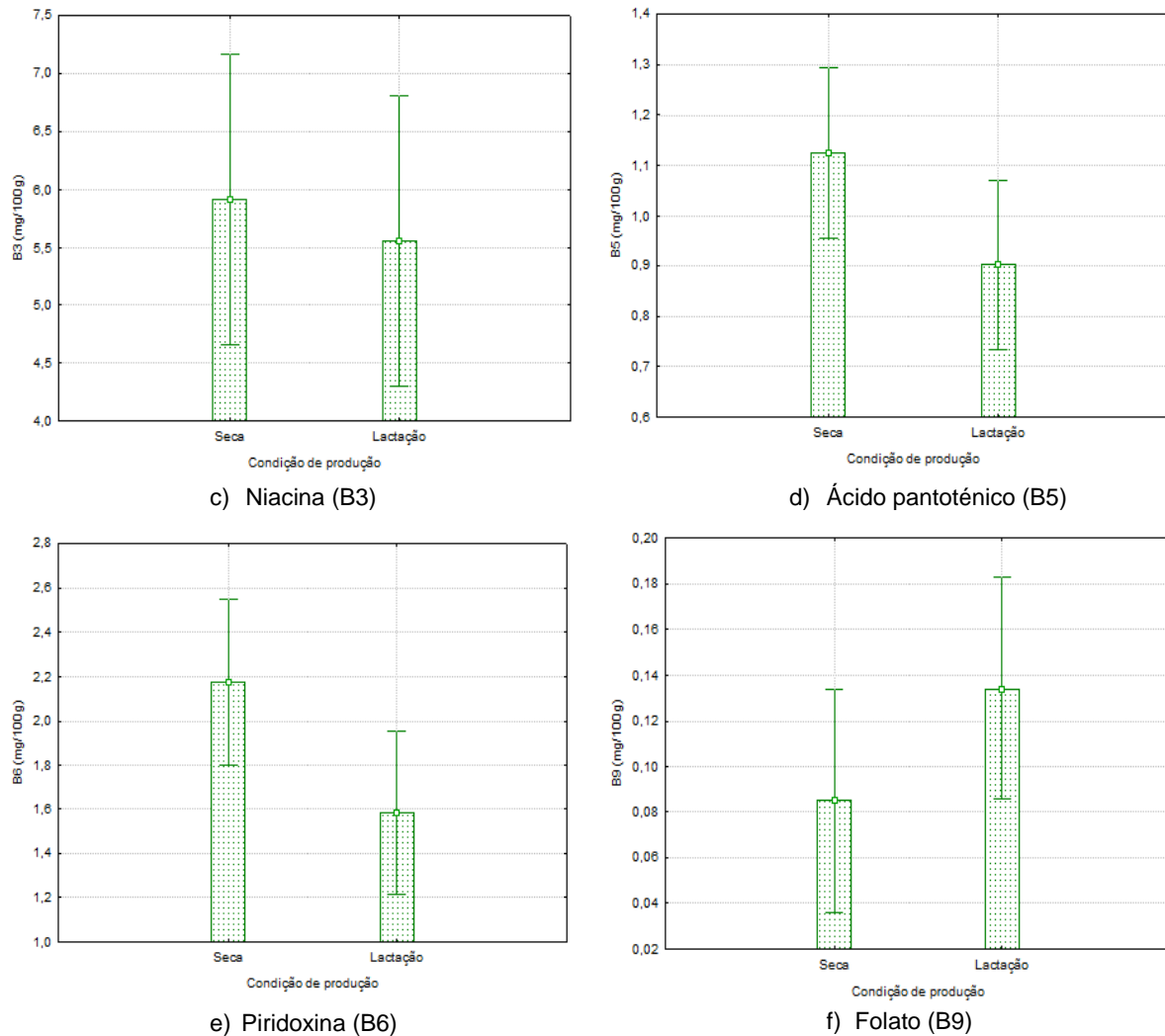
**Tabela 15** – Análise estatística da influência das condições de produção no teor de vitaminas

	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>Nível significância</b>
<b>B1</b>	1,858	0,1772	n.s.
<b>B2</b>	0,805	0,3728	n.s.
<b>B3</b>	0,011	0,9183	n.s.
<b>B5</b>	2,623	0,1098	n.s.
<b>B6</b>	4,414	0,0393	*
<b>B9</b>	1,125	0,2925	n.s.

n.s. – não significativo ; \* diferença significativa ( $p<0,05$ )



**Fig. 29** – Influência da cond. prod. no teor de vitaminas



**Fig. 29** – (continuação) Influência da cond. prod. no teor de vitaminas

Através da análise estatística efectuada (Tabela 15), verifica-se que o factor condição de produção revelou influência no teor de vitamina B6 ( $F= 4,418$ ;  $p<0,05$ ). As restantes vitaminas não apresentaram diferenças significativas, nos teores médios (Anexo 5), entre as duas fases.

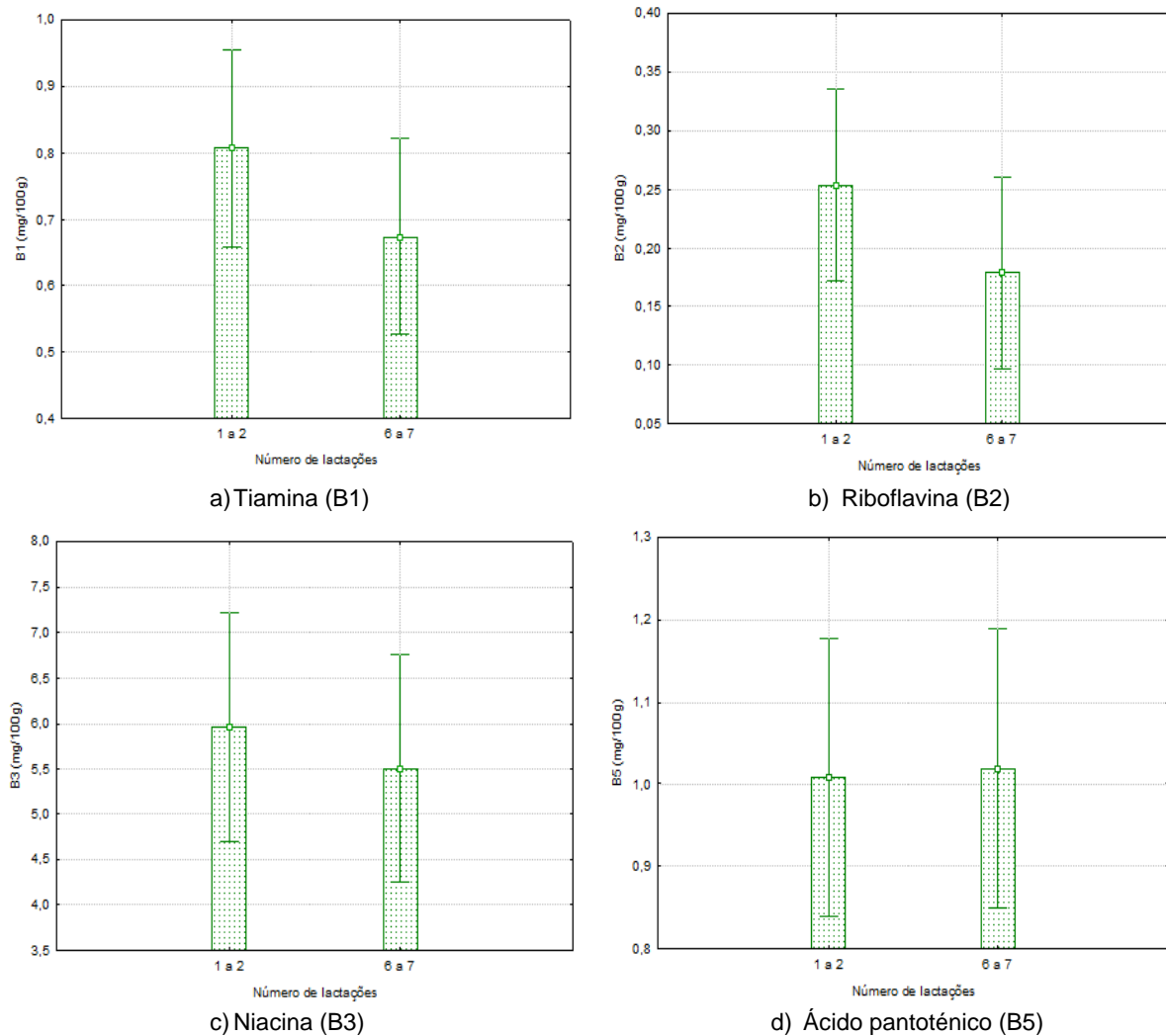
### 2.3. Influência do nº lactações no teor de vitaminas

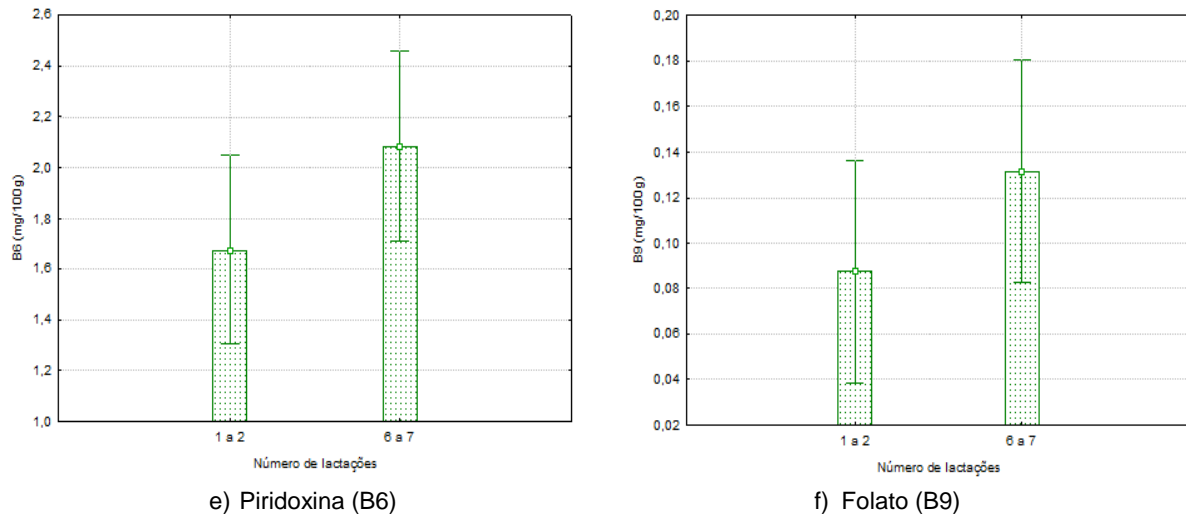
As amostras utilizadas para o estudo provinham de vacas, cujo número de lactações variava. Sendo este um factor que poderia apresentar influência no teor de vitaminas, realizou-se uma análise estatística de modo a verificar a possibilidade de existência de influência entre animais com 1-2 lactações e animais com 6-7 lactações.

**Tabela 16** – Análise estatística da influência do n.º de lactações no teor de vitaminas

	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>Nível significância</b>
<b>B1</b>	2,326	0,1317	n.s.
<b>B2</b>	14,786	0,0002	**
<b>B3</b>	21,248	0,00002	***
<b>B5</b>	3,522	0,0647	n.s.
<b>B6</b>	0,556	0,4584	n.s.
<b>B9</b>	4,548	0,0364	*

n.s. – não significativo; \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ); \*\*diferença significativa ( $p < 0,001$ ); \*\*\*diferença significativa ( $p < 0,0001$ )

**Fig.30** - Influência do n.º lactações no teor de vitaminas



**Fig.30 – (continuação)** Influência do n.º lactações no teor de vitaminas

O número de lactações influencia o teor das vitaminas B2 ( $F= 14,786; p<0,001$ ), B3 ( $F= 21,248; p<0,0001$ ) e B9 ( $F= 4,548; p<0,05$ ). A separação das médias efectuada segundo Tukey (Anexo 5), também evidenciou diferenças significativas entre os valores médios.

#### 2.4. Influência das interacções dos vários factores no teor de vitaminas

Após a análise estatística dos vários factores em separado, torna-se necessário verificar se a interacção dos factores apresenta influência no teor das vitaminas.

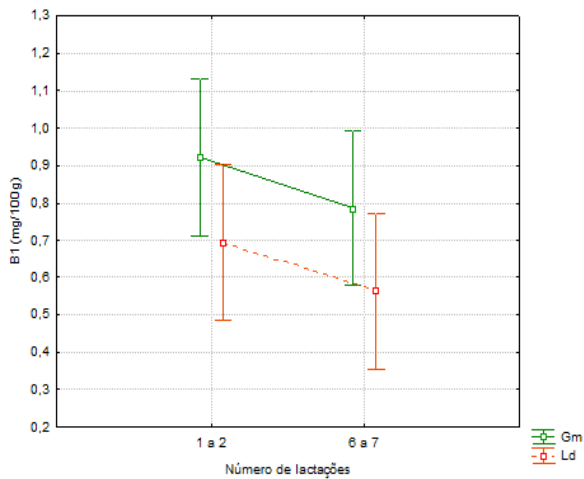
A análise de variância, para cada vitamina, encontra-se no anexo 4 e as médias obtidas, e respectivos erros padrão, encontram-se no anexo 5.

2.4.1. Influência do músculo x nº lactações

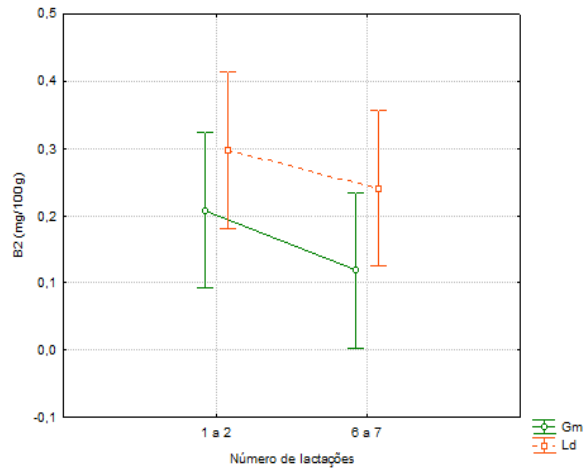
Tabela 17 – Análise estatística da influência do músculo x nº lactações no teor de vitaminas

	F – value	P	Nível significância
<b>B1</b>	0,0005	0,9825	n.s.
<b>B2</b>	0,081	0,7771	n.s.
<b>B3</b>	0,005	0,9459	n.s.
<b>B5</b>	1,169	0,2832	n.s.
<b>B6</b>	0,477	0,4291	n.s.
<b>B9</b>	0,148	0,7013	n.s.

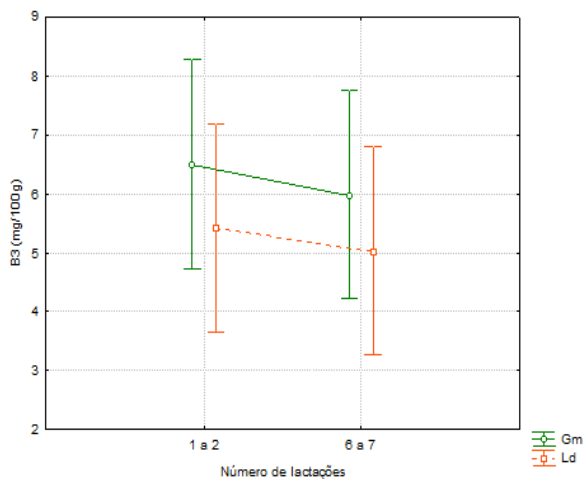
n.s. – não significativo



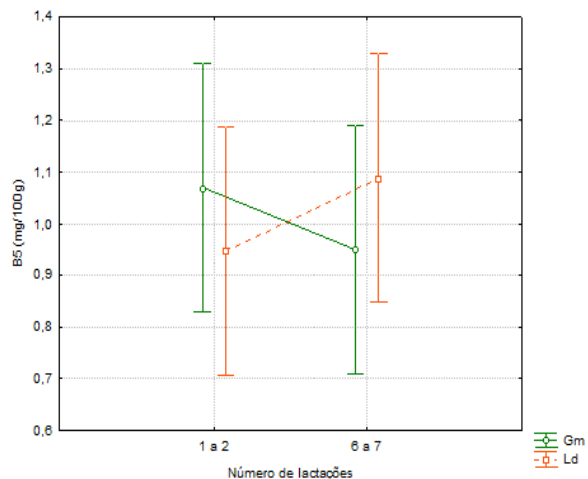
a) Tiamina (B1)



b) Riboflavina (B2)

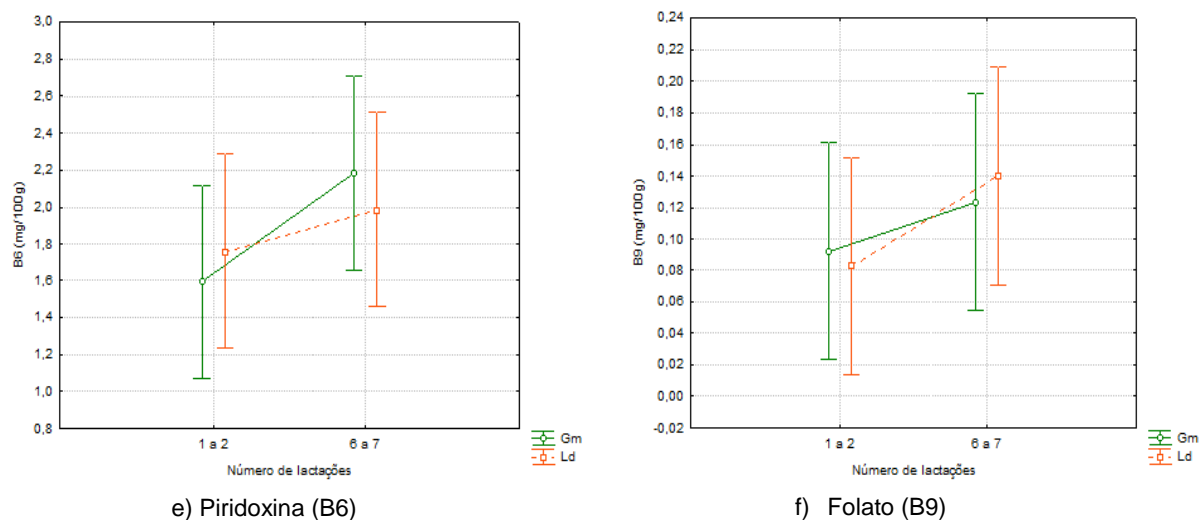


c) Niacina (B3)



d) Ácido pantoténico (B5)

Fig. 31 – Influência do tipo de músculo x n.º lactações no teor de vitaminas



**Fig. 31** – (continuação) Influência do tipo de músculo x n.º lactações no teor de vitaminas

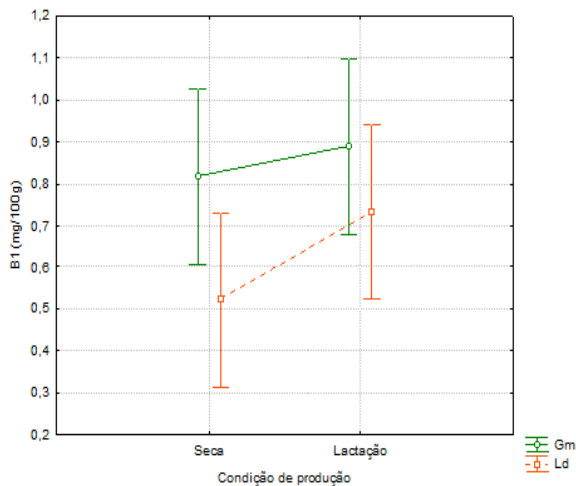
Embora o número de lactações influencie o teor das vitaminas B2, B3 e B9 presente na carne (Tabela 16; Figura 30), estes teores não variam significativamente (B2:  $F=0,081$ ;  $p=0,7771$ ; B3:  $F=0,005$ ;  $p=0,9459$ ; B9:  $F=0,148$ ;  $p=0,7013$ ) entre os dois músculos (Tabela 17; Figura 31).

#### 2.4.2. Influência do músculo x cond. prod.

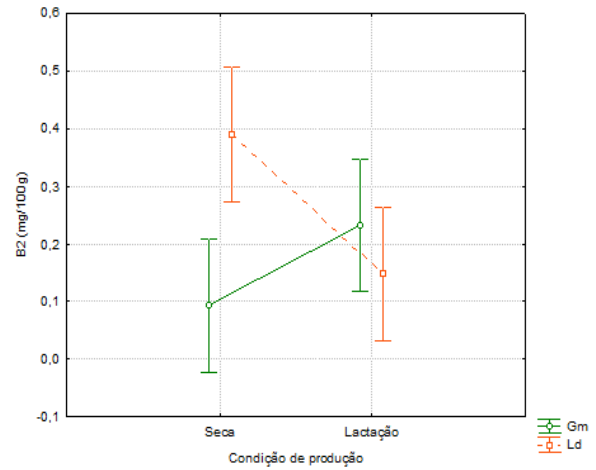
**Tabela 18** – Análise estatística da influência do músculo x cond. prod. no teor de vitaminas

	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>Nível significância</b>
<b>B1</b>	0,446	0,5065	n.s.
<b>B2</b>	10,756	0,0016	*
<b>B3</b>	0,343	0,5598	n.s.
<b>B5</b>	13,196	0,0005	**
<b>B6</b>	0,037	0,8479	n.s.
<b>B9</b>	0,268	0,6066	n.s.

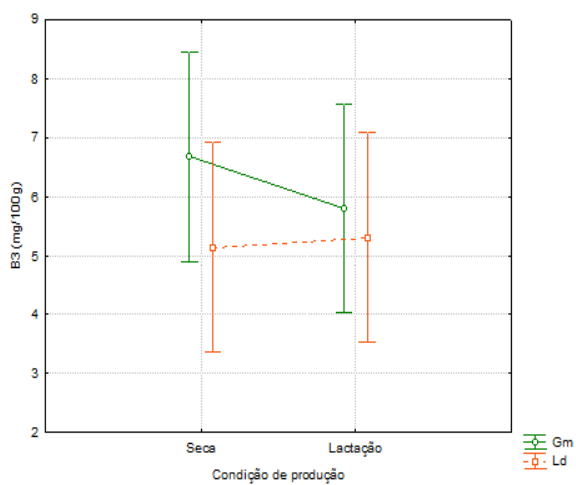
n.s. – não significativo; \*diferença significativa ( $p<0,05$ ); \*\*diferença significativa ( $p<0,001$ )



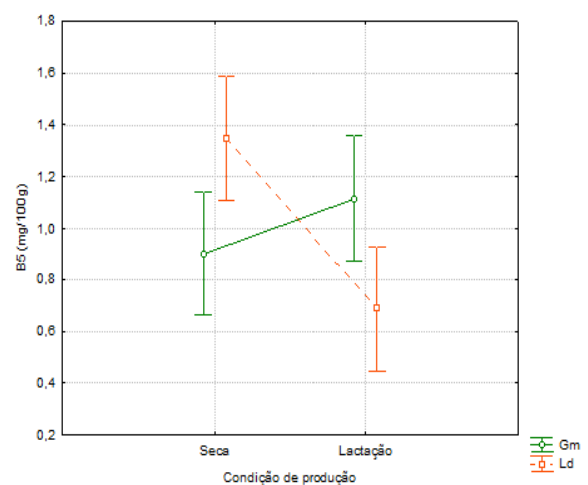
a) Tiamina (B1)



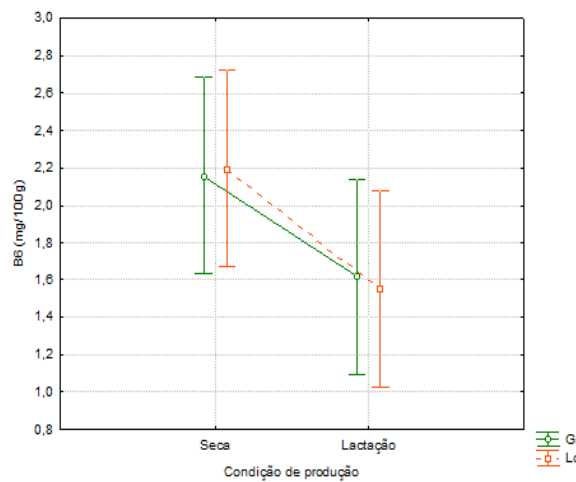
b) Riboflavina (B2)



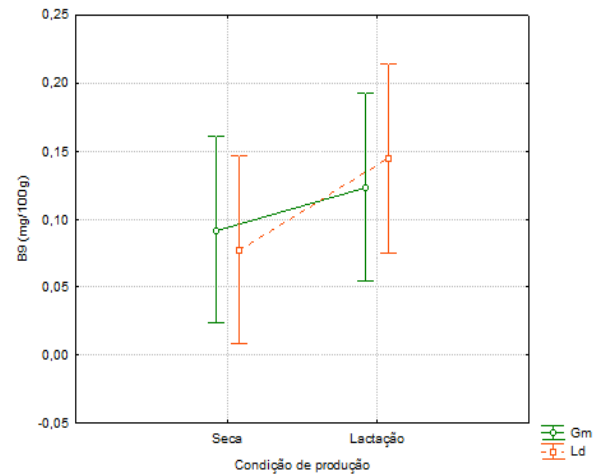
c) Niacina (B3)



d) Ácido pantoténico (B5)



e) Piridoxina (B6)



f) Folato (B9)

Fig. 32 – Influência do tipo de músculo x cond. prod. no teor de vitaminas

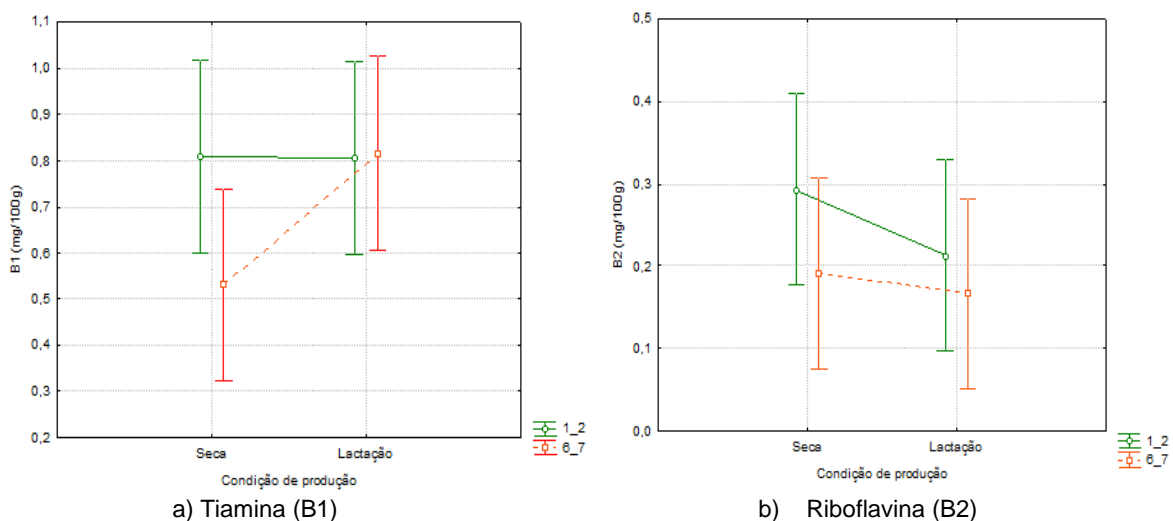
As vitaminas B2 e B5 apresentaram diferenças significativas nos seus teores médios (Anexo 5), na interação dos dois factores. Embora não tenham apresentado influência, quando analisado cada factor em separado (Tabelas 14 e 15), em conjunto influenciam o teor das vitaminas. Na fase seca verifica-se uma diferença significativa nos teores de vitamina B2 ( $F= 10,756$ ;  $p<0,05$ ), entre os dois músculos. Os teores de vitamina B5 diminuem significativamente ( $F= 13,196$ ;  $p<0,001$ ) no músculo Ld, quando os animais se encontram em fase de lactação (Figura 32).

#### 4.2.3. Influência da cond. prod. x nº lactações

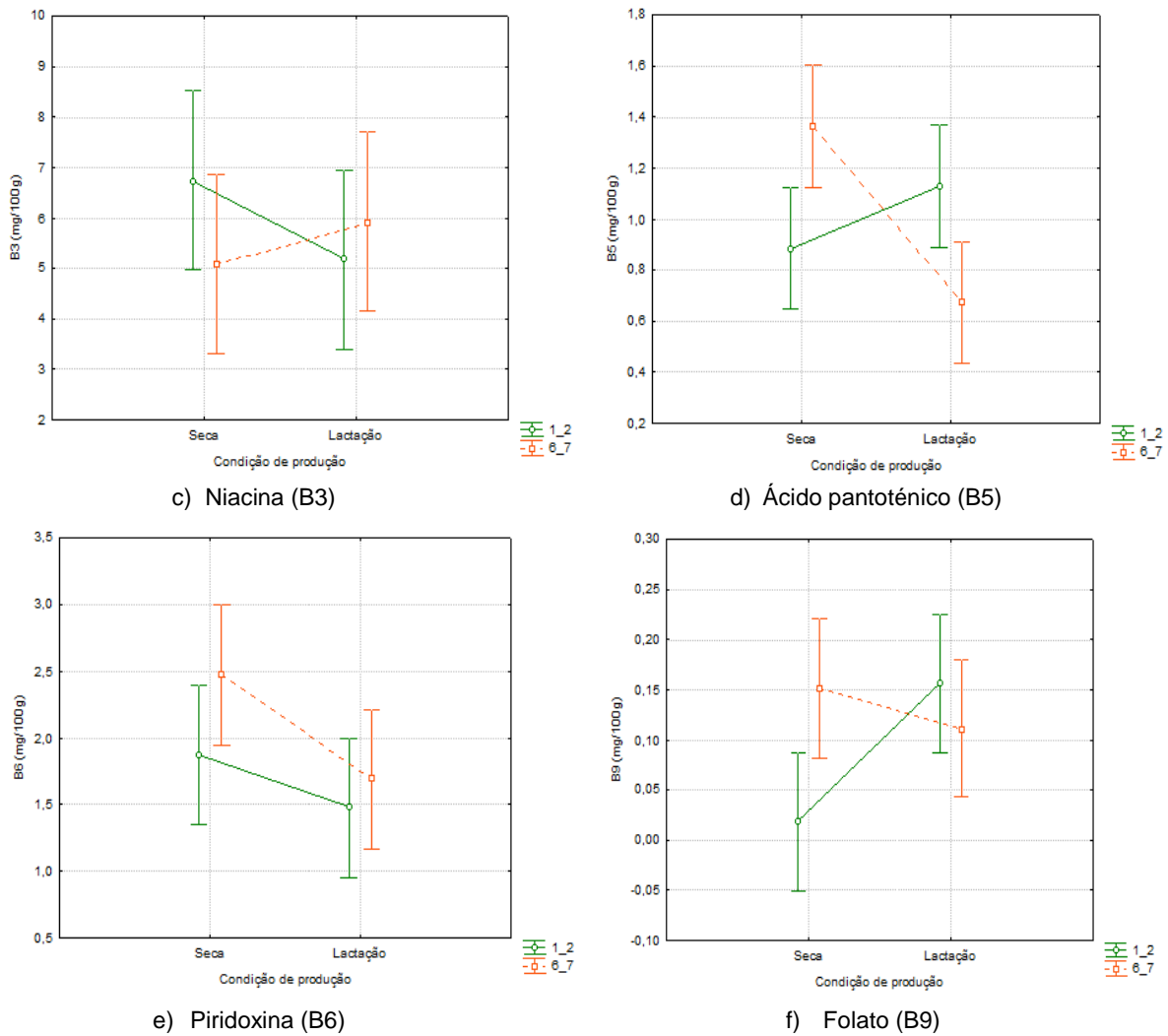
**Tabela 19** – Análise estatística da influência da cond. prod. X nº lactações no teor de vitaminas

	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>Nível significância</b>
<b>B1</b>	0,446	0,5065	n.s.
<b>B2</b>	4,664	0,0342	*
<b>B3</b>	12,664	0,0008	**
<b>B5</b>	5,333	0,0283	*
<b>B6</b>	0,0003	0,9870	n.s.
<b>B9</b>	10,056	0,0022	*

n.s. – não significativo



**Fig. 33** – Influência do tipo de cond. prod. x nº lactações no teor de vitaminas



**Fig. 33** – (continuação) Influência do tipo de cond. prod. x nº lactações no teor de vitaminas

Pela análise da tabela 19 e da figura 33, verifica-se que os teores das vitaminas B2, B3, B5 e B9 apresentam diferenças significativas na interação entre o número de lactações e as condições de produção. Enquanto que a influência, dos dois factores, nas vitaminas B2 ( $F= 4,664$ ;  $p<0,05$ ), B5 ( $F= 5,333$ ;  $p<0,05$ ) e B9 ( $F=10,056$ ;  $p<0,05$ ) é pouco significativa, na vitamina B3 ( $F=12,664$ ;  $p<0,001$ ) ocorre uma influência significativa nos teores médios.

## Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem retirar as seguintes conclusões:

- O método proposto é simples e rápido, permitindo a determinação simultânea das vitaminas B1, B2, B3, B5 e B6. Este método pode ser aplicado com sucesso devido a boa linearidade, detectabilidade e exactidão demonstrada;
- Para uma determinação eficaz das vitaminas B9 e B12 é necessário ajustar o método de extracção às propriedades e sensibilidades destas vitaminas. Embora as taxas de recuperação tenham sido baixas, o coeficiente de correlação obtido, para ambas as vitaminas, foi elevado permitindo concluir que com uma extracção mais adequada das vitaminas, o método proposto permite uma eficaz determinação simultânea das sete vitaminas em estudo;
- Independentemente do método de extracção utilizado, é fundamental a adição de TCA. A carne apresenta uma matriz muito complexa, tornando-se necessária a desnaturação das proteínas que vão interferir com as vitaminas;
- Embora as duas enzimas utilizadas apresentem resultados satisfatórios, a takadiastase apresentou uma maior afinidade para a amostra;
- O aumento da concentração de TFA melhora a forma do “pico”. Contudo, pH da fase móvel precisa de ser controlado, pois é responsável pelo tempo de retenção;
- Um fluxo inferior permite uma melhor separação e visualização dos “picos” cromatográficos;

Foi ainda possível concluir que o teor de vitaminas, presente na carne, é influenciado por vários factores. O teor da vitamina B1 é influenciado pelo tipo de músculo, apresentando-se inferior ( $p < 0,05$ ) no músculo Ld. O factor número de lactações influencia as vitaminas B2, B3 e B9, enquanto que o tipo de condição de produção influencia os teores médios da vitamina B6.

## Bibliografia

AASLYNG, M. ET AL. (2003). *Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking procedure*. Food Quality and Preference, 14: 277–288.

AGROPORTAL (2003). *Açores : Bovinos da raça Holstein Frisia em concurso em S.Miguel*. Disponível em: <http://www.agroportal.pt/x/agronoticias/2003/05/24b.htm>. Acedido a: 8 de Junho de 2011.

AGROQUISA (s.d.). *Mundo animal: raças bovinos*. Disponível em: [http://www.agroquisa.pt/mundo\\_animal.php?lg=pt&id\\_mundo\\_animal\\_categoria\\_new=2&id\\_mundo\\_animal\\_sub\\_categoria\\_new=6&id\\_mundo\\_animal\\_new=26#link16](http://www.agroquisa.pt/mundo_animal.php?lg=pt&id_mundo_animal_categoria_new=2&id_mundo_animal_sub_categoria_new=6&id_mundo_animal_new=26#link16). Acedido a: 4 de Março de 2011

ALBALÁ-HURTADO, S. ET AL. (1997). *Determination of water-soluble vitamins in infant milk by highperformance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 778: 247-253.

ALBERTO, J. (2000). *Produção e comercialização: sector da carne bovina*. Disponível em: <http://www.aasm-cua.com.pt/defVisNot.asp?ID=175>. Acedido a: 19 de Abril de 2011.

ALEA (s.d.). *Dieta portuguesa afasta-se das boas práticas nutricionais Balança Alimentar Portuguesa 2003 – 2008*. Disponível em: <http://alea-estp.ine.pt/html/actual/html/act55.html>. Acedido a: 14 de Fevereiro de 2011.

ALTANGEREL, B. ET AL. (2009). *HPLC Determination of vitamins B3, B5 and B6 in beef liver*. Acta fytotechnica et zootechnica – Mimoriadne číslo, S. 1-7. Disponível em: [www.fem.uniag.sk/acta/download.php?id=537](http://www.fem.uniag.sk/acta/download.php?id=537). Acedido a: 17 de Maio de 2011.

ANALYTICALVENTURE (2005). *Reverse Phase HPLC*. Disponível em: <http://www.analyticalventura.com/rp-hplc.shtml>. Acedido a: 28 de Abril de 2011.

ANDERSON, J.; YOUNG, L. (2008). *Water-Soluble Vitamins*. Food and Nutrition Series. Disponível em: <http://www.ext.colostate.edu/pubs/foodnut/09312.pdf>. Acedido a: 13 de Julho de 2011.

ANÓNIMO (2010). *Carne do mal*. Disponível em: <http://tudost.blog.com/>. Acedido a: 16 de Fevereiro de 2011.

ANÓNIMO (s.d.). *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência análise da cafeína em bebidas por HPLC*. Disponível em: [https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/49904/1/LQIII-Cromat\\_HPLC\\_Cafeina.pdf](https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/49904/1/LQIII-Cromat_HPLC_Cafeina.pdf). Acedido a: 29 de Junho de 2011.

APCRF (2008). *A Raça Holstein Frísia*. Disponível em: <http://www.apcrf.pt/gca/?id=147>. Acedido a: 8 de Junho de 2011.

ARAGÃO, N. ET AL. (2009). *Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas*. Quim. Nova, 32: 2476-2481.

ARRUDA, V. (2009). *Estabilidade de vitaminas do complexo B em Pólen Apícola*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Brasil). Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-25032010-162818/pt-br.php>.

BAILEY, L.; GREGORY, J. (1999). *Folate Metabolism and Requirements*. Disponível em: <http://jn.nutrition.org/content/129/4/779.full.pdf+html>. Acedido a: 31 de Março de 2011.

BALL, G.F.M. (2004). *Vitamins: Their Role in the Human Body*. Blackwell Publishing. London.

BALL, G.F.M. (2006). *Vitamins in foods: Analysis, Bioavailability, and Stability*. Taylor & Francis Group. New York.

BARRIOS, M. ET AL. (1999). *Vitamina B12: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia*. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter, 15(3):159-74.

BAYER, A.G. (2008). *Vitamina B6*. Disponível em: [http://www.vitaminas.bayer.pt/scripts/pages/pt/vitaminas/vitamina\\_b6/index.php](http://www.vitaminas.bayer.pt/scripts/pages/pt/vitaminas/vitamina_b6/index.php). Acedido a: 18 de Abril de 2011

BERNUÉS, A. ET AL. (2003). *Extrinsic attributes of red meat as indicators of quality in Europe: an application for market segmentation*. Food Quality and Preference 14 (2003) 265–276

BERTRAM, H ET AL. (2007). *Relationship between water mobility and distribution and sensory attributes in pork slaughtered at an age between 90 and 180 days*. Meat Science, 77: 190–195.

BEKHIT, A.E.D.; FAUSTMAN, C. (2005). *Metmyoglobin reducing activity*. Meat Science, 71: 407–439.

BIESALSKI, H.K. (2005). *Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?*. Meat Science, 70: 509–524.

CADERNO DE ESPECIFICAÇÕES (s.d.). *Carne dos Açores Indicação Geográfica – IG*. Disponível em: <http://edt-gra.azores.gov.pt/NR/rdonlyres/FC4AF47D-C03A-46B0-9173->

F54B865AAB65/449963/cadernoEspecificaesIGPCarnedosAores.pdf. Acedido a: 15 de Fevereiro de 2011.

CALKINS, C.R.; HODGEN, J.M. (2007). *A fresh look at meat flavor*. Meat Science, 77: 63–80.

CAMARGO, A. (2006). *Conforto animal em condições de pasto*. Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1379>. Acedido a: 3 de Junho de 2011.

CARNE DOS AÇORES (s.d.). *“Fruto da Pastagem”*. Disponível em: [http://www.faa.pt/art\\_carne\\_acores.pdf](http://www.faa.pt/art_carne_acores.pdf). Acedido a: 7 de Fevereiro de 2011.

CAVIEDES, J. ET AL. (2011). *Relación entre las características de la pastura y el contenido de ácido linoleico conjugado (ALC) en la leche*. Rev Colomb Cienc Pecu, 24:63-73

CHATZIMICHALAKIS, P. ET AL. (2004). *Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction*. J. Sep. Sci., 27: 1181–1188.

CHO, Y.; KIM, B. (2005). *Vitamin B6 intake by Koreans should be based on sufficient amount and a variety of food sources*. Nutrition, 21: 1113–1119

COMISSÃO EUROPEIA (2004). *O Sector da carne na União Europeia*. Disponível em: [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:JYDGiLLkt\\_oJ:ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/meat/2004\\_pt.pdf+O+sector+da+carne+da+Uniao+europeia+febre+aftosa&hl=pt-PT&gl=pt&pid=bl&srcid=ADGEESg5IY--q3CIIGz5AzTTEsxbfmBO2BYdb36fPwDRhfwnte\\_2t83GU0-xpJnBuaF4N3EWk-QeDiLmTWCCoCuWJedvf1n5dBOK5LkV3kBblcJJ2QO6WdyTSZOY3X-93iqbCVZ5O0YV&sig=AHIEtbSn1ihNDgHhOFZ5XTHX9y1fRYzW9A](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:JYDGiLLkt_oJ:ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/meat/2004_pt.pdf+O+sector+da+carne+da+Uniao+europeia+febre+aftosa&hl=pt-PT&gl=pt&pid=bl&srcid=ADGEESg5IY--q3CIIGz5AzTTEsxbfmBO2BYdb36fPwDRhfwnte_2t83GU0-xpJnBuaF4N3EWk-QeDiLmTWCCoCuWJedvf1n5dBOK5LkV3kBblcJJ2QO6WdyTSZOY3X-93iqbCVZ5O0YV&sig=AHIEtbSn1ihNDgHhOFZ5XTHX9y1fRYzW9A). Acedido a: 8 de Abril de 2011.

COSTA, G. ET AL. (2008). *Carne caprina e ovina: composição lipídica e características sensoriais*. Rev. Bras. Saúde Prod. An., 9: 497-506.

CUNHA, L.; MOURA, A. (2008). *Consumidor português face à segurança alimentar*. Disponível em: <http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-04/n4-sequali-46.pdf>. Acedido a: 15 de Junho.

DAWSON, K. ET AL. (1988). *HPLC Determination of Riboflavin, Niacin, and Thiamin in Beef, Pork, and Lamb after Alternate Heat-Processing Methods*. J. Agric. Food Chem., 36: 1176-1179

- DELGADILLO, J.; AYALA, G. (2009). *Efectos de la deficiencia de riboflavina sobre el desarrollo del tejido dentoalveolar, en ratas*. An Fac med., 70(1):19-27
- DENU, J. (2005). *Vitamin B3 and sirtuin function*. TRENDS in Biochemical Sciences, 30: 479 - 483.
- DIAS, A. (2008). *Caracterização de duas explorações de raça bovina alentejana produtoras de carne alentejana DOP*. Dissertação para a obtenção do grau, apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária.
- DIÉGUEZ, A.; HIERREZUELO, J. (1997). *Tiamina*. Medisan, 1(1):23-29.
- ESPERANCA, M. (2011). *The Wonders of vitamin B12: keep sane and young*. 15 – 29. Xilibris Corporation. USA.
- ESTEVE, M.J. ET AL. (2002). *Contents of vitamins B1, B2, B6 and B12 in pork and meat products*. Meat Science, 62: 73 – 78.
- FAA - FEDERAÇÃO AGRÍCOLA DOS AÇORES (s.d.<sup>3</sup>). *Produtores*. Disponível em: <http://www.faa.pt/conteudo2.php?cat=2&cat1=6&cat2=0&cat3=0&idioma=pt>. Acedido a: 26 de Junho de 2011.
- FERREIRA, M. ET AL. (2000). *Relationships of the minerals and fatty acids contentes in processed turkey meat products*. Food Chemistry, 69:259 – 265.
- FERREIRA, T. (2008). *Produção de Suínos de raça Alentejana em sistema intensivo até ao final da pré-engorda*. Dissertação para a obtenção do grau de mestre, apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.
- FIEMS, L.O. ET AL. (2000). *Relationship between fat depots in carcasses of beef bulls and effect on meat colour and tenderness*. Meat Science, 56: 41-47.
- FINGLAS, P.; MORGAN, M. (1994). *Application of biospecific methods to the determination of B-group vitamins in food—a review*. Food Chemistry, 49: 191-201.
- GIRARD, C. (1997). *B-Vitamins: Current Recommendations are Inadequate for Optimal Production*. Disponível em: <http://www.wcds.ca/proc/1997/ch08-97.htm>. Acedido a 20 de Setembro de 2011.
- GJERGJA, R. ET AL. (2006). *Knowledge and use of folic acid in Croatian pregnant women—a need for health care education initiative*. Reproductive Toxicology, 21: 16–20.
- GOLAN, E.; UNNEVEHR, L. (2008). *Food product composition, consumer health, and public policy: Introduction and overview of special section*. Food Policy, 33: 465–469.

- GONTHIER, A. ET AL. (1998). *Determination of pantothenic acid in foods: influence of the extraction method*. Food Chemistry, 63: 287-294.
- GOVERNO DOS AÇORES (s.d.). *Carne dos Açores IGP*. Disponível em: <http://ed-tgra.azores.gov.pt/Portal/pt/entidades/sraf-iama/textoImagem/Carne+dos+A%C3%A7ores.htm>. Acedido a: 17 de Fevereiro de 2010.
- GROPPER, S. ET AL. (2009). *The water-soluble vitamins*. Em: *Advanced nutrition and human metabolism*. 309 – 372. Wadsworth Cengage Learning. USA.
- HADLICH, J. ET AL. (2008). *A influência do colágeno na textura da carne*. Pubvet, V. 2, N. 32, Ed. 43, Art. 160.
- HANEKOM, Y. (2010). *The effect of extensive and intensive production systems on the meat quality and carcass characteristics of Dohne Merino lambs*. *Dissertação apresentada à Stellenbosch University*. Disponível em: [https://scholar.sun.ac.za/bitstream/handle/10019.1/5385/hanedkom\\_effect\\_2010.pdf?sequence=2](https://scholar.sun.ac.za/bitstream/handle/10019.1/5385/hanedkom_effect_2010.pdf?sequence=2).
- HOLM, L. & MØHL, M. (2000). *The role of meat in everyday food culture: an analysis of an interview study in Copenhagen*. *Appetite*, 34(3), 277-283.
- HUFFMAN, K. ET AL. (1997). *Effect of Beef Tenderness on Consumer Satisfaction with Steaks Consumed in the Home and Restaurant*. *Journal of Animal Science*, 80: 91-97.
- INE (2004). *Dia mundial da alimentação (16 de Outubro)*. Disponível a: [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Acedido a: 14 de Fevereiro de 2011.
- INE (2010). *Base de dados: Consumo humano de carne per capita (Kg/hab.) por tipo de carne, anual*. Disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt).
- INSEL, P. ET AL. (2007). *Water – Soluble Vitamins*. Em: *Nutrition – 4th ed.* 429 – 466. Jones and Bartlett Publishers. USA.
- INSRJ (s.d.) *Tabela da Composição de Alimentos – Edições do Instituto Nacional de Saúde* Dr. Ricardo Jorge.
- JÚNIOR, O. ET AL. (2001). *Validação de métodos analíticos*. *Caderno de Pesquisa*, 12: 116-131.
- KALL, M. (2003). *Determination of total vitamin B6 in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis*. *Food Chemistry*, 82: 315–327.

KANNAN, K.; JAIN, S. (2003). *Effect of vitamin B6 on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential, and lipid peroxidation in H2O2 – treated U937 monocytes*. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6T38-4BBH64H-1C&\\_cdi=4940&\\_user=2487089&\\_pii=S0891584903006099&\\_origin=search&\\_coverDate=02%2F15%2F2004&\\_sk=999639995&view=c&wchp=dGLbVzW-zSkzS&md5=460c4ac7dfa6d2c1cb856a3c397a4196&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T38-4BBH64H-1C&_cdi=4940&_user=2487089&_pii=S0891584903006099&_origin=search&_coverDate=02%2F15%2F2004&_sk=999639995&view=c&wchp=dGLbVzW-zSkzS&md5=460c4ac7dfa6d2c1cb856a3c397a4196&ie=/sdarticle.pdf).

KIRSCHMANN, J.; NUTRITION SEARCH, INC (2006). *Nutrients*. Em: Nutrition Almanac. 11 – 86. McGraw-Hill Professional. New York.

KOHLMEIER, M. (2006). *Water-soluble vitamins and non-nutrients*. Em: Nutrient metabolism. 539 – 643. Elsevier Ltd. UK.

LAHÉLY, S. ET AL. (1999). *Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization*. Food Chemistry, 65: 129 – 133.

LEONHARDT, M.; WENK, C. (1997). *Variability of Selected Vitamins and Trace Elements of Different Meat Cuts*. Journal of food composition and analysis 10, 218–224.

LOMBARDI-BOCCIA, G. ET AL. (2005). *Aspects of meat quality: trace elements and B vitamins in raw and cooked meats*. Journal of Food Composition and Analysis, 18: 39–46.

LOVE, J. (1999). *Product acceptability evaluation*. Em: Quality Attributes and Their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products. Volume 9. A.M. Pearson e T.R. Dutson (Eds.). 337 – 355. Aspen Publication. Maryland.

MADRP (2007). *Carne: Diagnóstico sectorial*. Disponível a: [http://www.gppaa.min-agricultura.pt/pbl/diagnosticos/Carne\\_\\_Diagnostico\\_Sectorial.pdf](http://www.gppaa.min-agricultura.pt/pbl/diagnosticos/Carne__Diagnostico_Sectorial.pdf). Acedido a: 14 de Fevereiro de 2011.

MANCINI, R.A.; HUNT, M.C. (2005). *Current research in meat color*. Meat Science, 71: 100–121

MANSUR, L. (2009). *Vitaminas Hidrossolúveis no metabolismo*. Seminário apresentado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Disponível em: [http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/vitaminas\\_hidro.pdf](http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/vitaminas_hidro.pdf). Acedido a: 16 de Março de 2011.

MATOS, J. (2010). *A raça Aberdeen Angus: Um testemunho sobre a excelência da sua qualidade*. 15 – 22. Espaço Angus magazine.

- MCAFEE, A. ET AL. (2010). *Red meat consumption: An overview of the risks and benefits*. Meat Science, 84: 1–13.
- MILLER, R. (2002). *Factors affecting the quality of raw meat*. Em: Meat processing: improving quality, J. Kerry, J. Kerry e D. Ledwards (Eds). 27 – 63. Woodhead Publishing Limited. Cambridge.
- MORRISSEY, P. ET AL. (1994). *Vitamin E and meat quality*. Proceedings of the Nutrition Society, 53: 289 – 295.
- MURAMOTO, T. ET AL. (2003). *Effect of dietary b-carotene supplementation on beef color stability during display of two muscles from Japanese Black steers*. Meat Science 63: 39–42.
- MUTETIKKA, D.B.; MAHAN, D.C. (1993). *Effect of pasture, confinement, and diet fortification with vitamin E and selenium on reproducing gilts and their progeny*. J ANIM SCI, 71:3211-3218.
- NDAW, S. ET AL. (2000). *Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs*. Food Chemistry 71: 129-138.
- OTTEN, J. ET AL. (2006). *Vitamins and Minerals*. Em: DRI, Dietary Reference Intakes: the essential guide to nutrient requirements. 167 – 280. Institute of Medicine of the National Academies. Washington.
- OUALI, A. ET AL. (2006). *Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms*. Meat Science, 74:44–58
- PEARSON, A.M.; DUSTUN, T.N. (1999). *Introduction to quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products*. Em: Quality Attributes and Their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products. Volume 9. 1 – 33. Aspen Publication. Maryland.
- PEREIRA, C. (2008). *Produtos tradicionais com nomes protegidos: Sua influência na redução da percepção do risco alimentar*. Disponível em: <http://antonio-fonseca.com/Unidades%20Curriculares/2-Ano/Trabalhos%20de%20Campo%20II/6%20Apontamentos/Projecto%20TCII.pdf>. Acedido a: 18 de Abril de 2011.
- PERI, C. (2006). *The universe of food quality*. Food Quality and Preference, 17: 3–8.
- PINTO, J. (2010). *Oportunidades & desafios na fileira da carne*. Disponível em: [http://www.faa.pt/TEMA6\\_3](http://www.faa.pt/TEMA6_3). Acedido a: 14 de Fevereiro de 2011.

PINTO DE ANDRADE, L. ET AL. (1999). "DOP – Valor acrescentado em Sistemas Extensivos". Disponível em: <http://docentes.esa.ipcb.pt/amrodrig/BADAJEZ.pdf>. Acedido a: 8 de Junho de 2011.

POWERS, H. (2003). *Riboflavin (vitamin B-2) and health*. Am J Clin Nutr, 77:1352 – 60.

PRATES, J. ET AL. (2006). *Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and b-carotene in Barrosã-PDO veal*. Food Chemistry, 94: 469–477

PRATIWI, N.M. ET AL. (2006). *Total cholesterol concentrations of the muscles in castrated Boer goats*. Small Ruminant Research, 64: 77–81

RAMOS, O. (2008). *Efeito combinado da raça e do sistema de produção na qualidade nutricional da fracção lipídica da carne de borrego e de cabrito*. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária.

REIS, M. (2010). *Avaliação de Índices reprodutivos em vacadas de carne em extensivo no Alentejo*. Dissertação para a obtenção do grau de mestre, apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

Regulamento (CE) nº 1183/2006 – do Conselho de 24 de Julho de 2006 relativo à grelha comunitária de classificação das carcaças de bovinos adultos. Conselho da União Europeia.

RIBANI, M. ET AL. (2004). *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Quim. Nova, 27: 771-780.

RODRIGUES, A.M. (1997). *Sistema de Produção de Bovinos de carne em Portugal*. Disponível em <http://mail.esa.ipcb.pt/amrodrig/CCBCARNE.pdf>. Acedido a: 22 de Fevereiro de 2011.

RODRIGUES, A.M. (2005). *A produção e consumo de carne bovina em Portugal*. Agrius nº5, Caderno do Jornal Expresso, edição nº 1649

ROSE-SALLIN, C. ET AL. (2001). *Comparison of microbiological and HPLC – fluorescence detection methods for determination of niacin in fortified foods products*. Food Chemistry, 73: 473 – 480.

RUGGERI, S. ET AL. (1999). *Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 855: 237 – 245.

SANTOS, C. (2003). *O efeito da vitamina B12 nos frangos*. Trabalho realizado no âmbito da disciplina de Produção de Monogástricos do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade dos Açores. Disponível em: <http://www.angra.uac.pt/MPA/MPA/P%C3%A1ginas%20do%20Mestrado/Mestrado/Produ%>

C3%A7%C3%A3o%20de%20Monog%C3%A1stricos/Carlos%20Vouzela/vitB12%20nos%20frangos.PDF.

SARCINELLI, M. ET AL. (2007). *Características da carne bovina*. Disponível em: [http://www.agais.com/telomc/b00807\\_caracteristicas\\_carnebovina.pdf](http://www.agais.com/telomc/b00807_caracteristicas_carnebovina.pdf). Acedido a: 15 de Fevereiro de 2011.

SARRIÉS, M.V.; BERIAIN, M.J. (2006). *Colour and texture characteristics in meat of male and female foals*. Meat Science 74: 738–745.

SCHMID, A. ET AL (2006). *Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review*. Meat Science, 73: 29–41.

SCHONFELDT, H.C.; STRYDOM, P.E. (2011). *Effect of age and cut on tenderness of South African beef*. Meat Science 87: 206–218

SILVA, M. ET AL. (2008). *Mineral and vitamin content os beef, chicken and turkey hydrolysates*. Quim. Nova, 31: 41-43.

SIMOPOULOS, A.P. (2008). *The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases*. Exp. Biol. Med., 233:674-688.

SKOOG, D. ET AL. (2006). Principles of Instrumental Analysis. Ed.: Brooks Cole.

Sobreira, G. (s.d.). Banco de Imagens – Confinamento. Disponível em: <http://www.terrastock.com.br/default.asp?i=br&p=detalhes&cod=a0843>. Acedido a: 3 de Junho de 2011.

STARGROVE, M. ET AL. (2008). *Nutrient-drug interactions and drug-induced nutrient depletions*. Em: Herb, Nutrient, and Drug interactions: clinical implications and therapeutic strategies. 173 – 447. Elsevier. USA.

TANG, X. ET AL. (2006). *A simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase HPLC*. Journal of Food Composition and Analysis, 19: 831–837

TSANG, G. (2005). *Health Benefits of Omega 3 fatty acids*. Disponível em: <http://www.healthcastle.com/omega3.shtml>. Acedido a: 18 de Julho de 2011.

VALSTA, L.M. ET AL. (2005). *Meat fats in nutrition*. Meat Science, 70:525 – 530.

VAN DEN BERG, H. ET AL. (1996). *Third EU MAT intercomparison on methods for the determination of vitamins B-1, B-2 and B-6 in food*. Food Ckmisrry, 57: 101-108.

- WALSH, H. *ET AL.* (1980). *A comparison of microbiological and radioimmunoassay methods for the determination of pantothenic acid in foods.* J. Food Biochem., 3: 175 - 189.
- WANG, X. *ET AL.* (2007). *Cyanocobalamin (vitamin B12) conjugates with enhanced solubility.* Bioorganic & Medicinal Chemistry , 15: 1780–1787.
- WATTS, B. *ET ALL* (1947). *The enzymatic extraction of riboflavin from pork for the fluorometric determination.* Publish as Scientific Paper nº 746, College of Agriculture and agricultural Experiment Stations. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/172/2/707.full.pdf>.
- WILLIAMS, P. (2007). *Nutritional composition of red meat.* Nutrition & Dietetics, 64 (Suppl. 4): S113–S119.
- WINDAHL, K. *ET AL.* (1998). *The determination of niacin in selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography: acid extraction.* Food Chemistry, 65: 263 – 270.
- WOOD, J.D. *ET AL.* (2003). *Effects of fatty acids on meat quality: a review.* Meat Science, 66: 21–32.
- XIONG, H. *ET AL.* (1999). *Quality characteristics of muscle foods: An overview.* Em: Quality attributes of muscle foods, Youling L. Xiong, Chi-Tang Ho, Fereidoon Shahidi (Eds). 1-10. Kluwer Academic. New York.
- ZEOLA, N. *ET AL.* (2002). *Influência de diferentes níveis de concentrado sobre a qualidade da carne de cordeiros Morada Nova.* RPCV, 97: 175-180

**Anexos**

## **ANEXO 1 – Plano das diferentes técnicas utilizadas**

### **1º Ensaio**

- Para balões volumétricos de 100 ml

- **Técnica 1:** Extração só com hidrólise ácida (60 ml HCL 0,1 M);
- **Técnica 2:** Extração com hidrólise ácida (60 ml HCL 0,1 M) + hidrólise enzimática (2 ml Claradiastase a 2%);
- **Técnica 3:** Extração com hidrólise ácida (60 ml HCL 0,1 M) + hidrólise enzimática (1 g Takadiastase);
- **Técnica 4:** Extração com hidrólise (60 ml HCL 0,1 M) + hidrólise enzimática (2 ml Claradiastase a 2%) + 2 ml TCA;
- **Técnica 5:** Extração só com hidrólise ácida (60 ml HCL 0,1 M) + 2 ml TCA.

### **2º Ensaio**

- Para balões volumétricos de 50 ml

- 5 g amostra
- 30 ml HCL 0,1 M
- Claradiastase\*
- 2ml TCA 50%

\*Claradiastase (adição directa da enzima)

- **Técnica 1:** 0,05g claradiastase
- **Técnica 2:** 0,1g claradiastase
- **Técnica 3:** 0,2g claradiastase
- **Técnica 4:** 0,5g claradiastase

### 3º Ensaio

- Para balões volumétricos de 100 ml

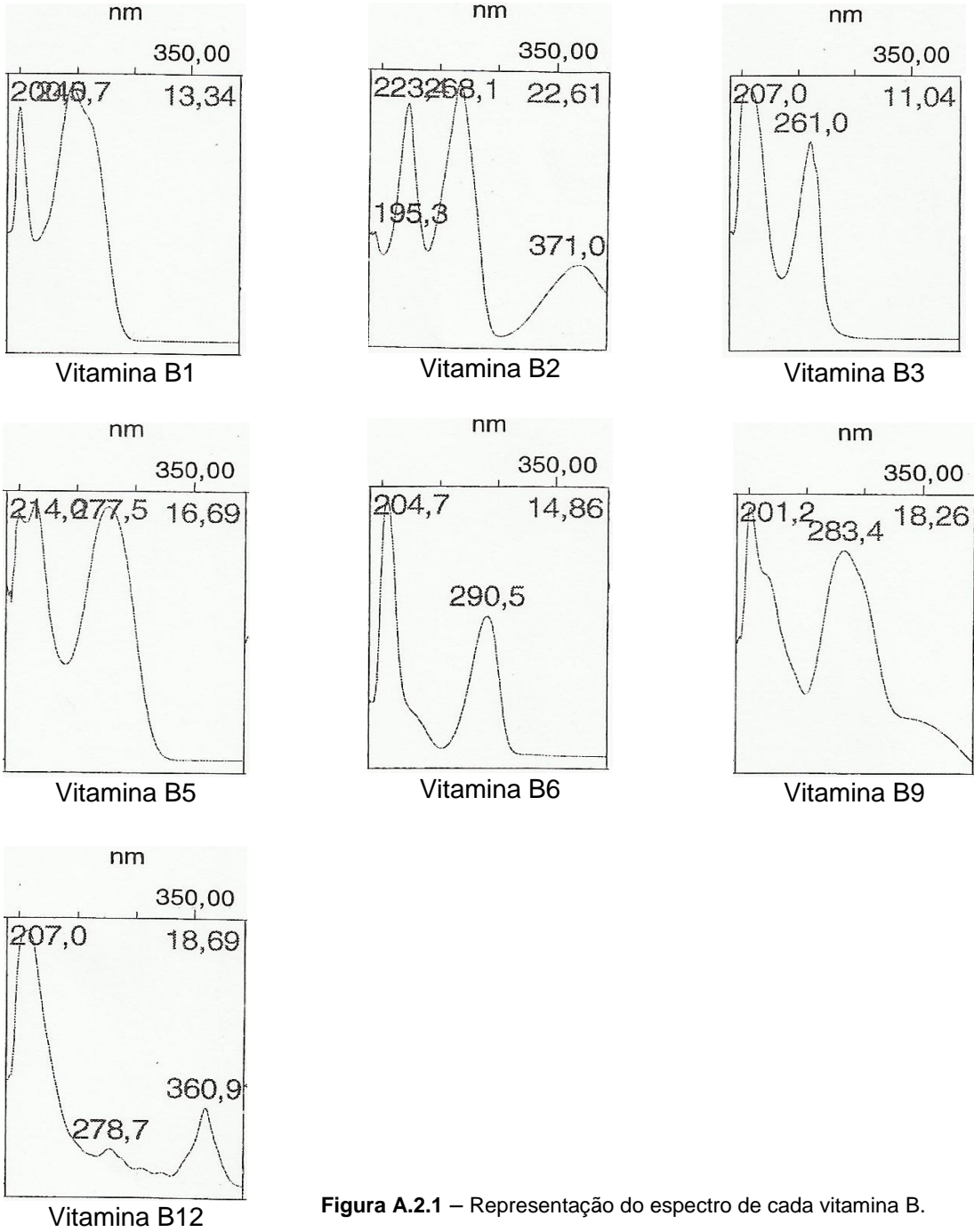
- **Técnica 1:** 0,2 g claradiastase + 2 ml TCA a 50%
- **Técnica 2:** 0,2 g takadiastase + 2 ml TCA a 50%

### 4º Ensaio

- **Frasco 1:** amostra + hidrólise química e enzimática (takadiastase)+TCA

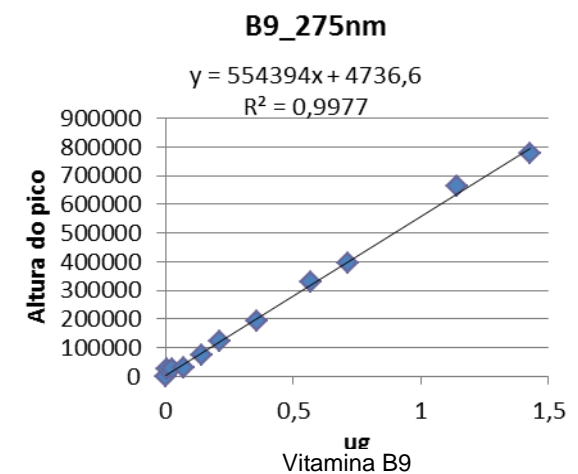
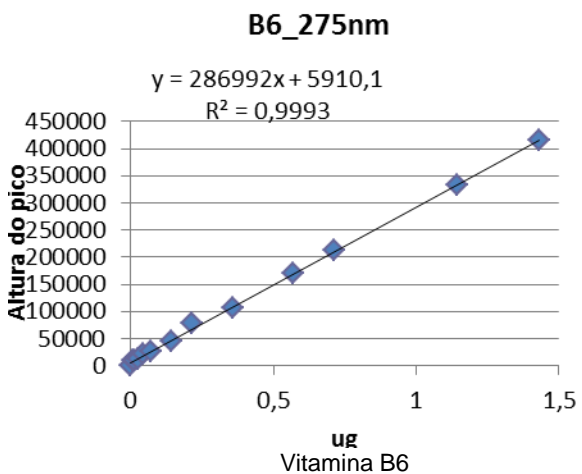
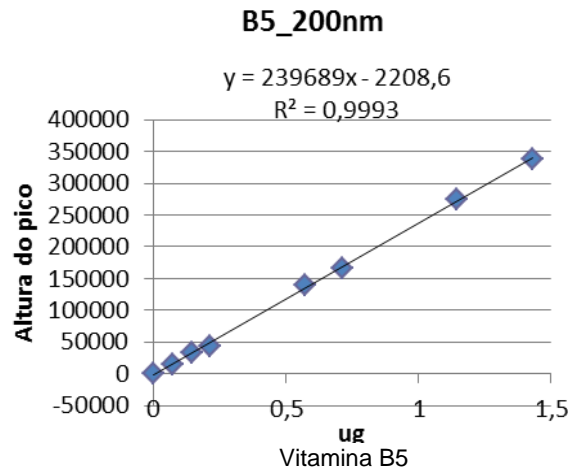
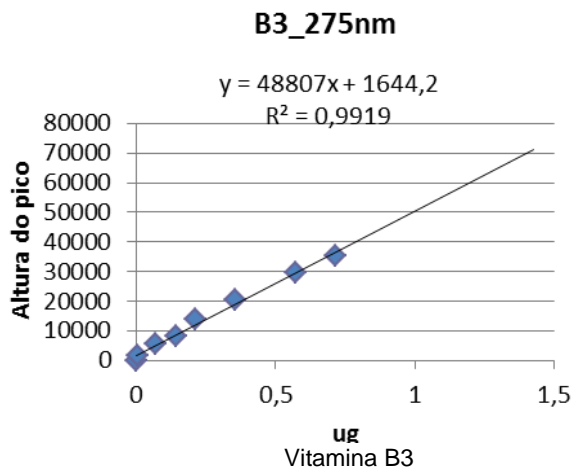
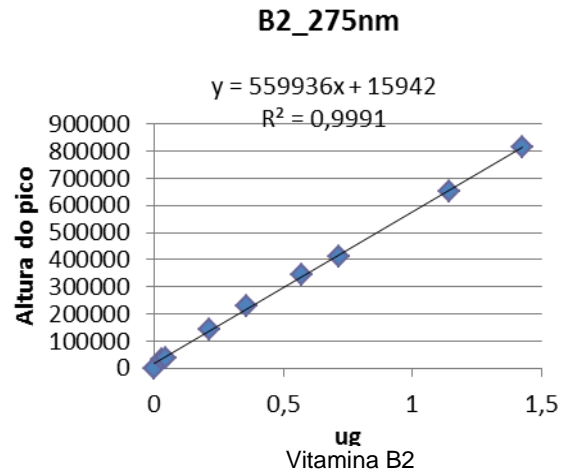
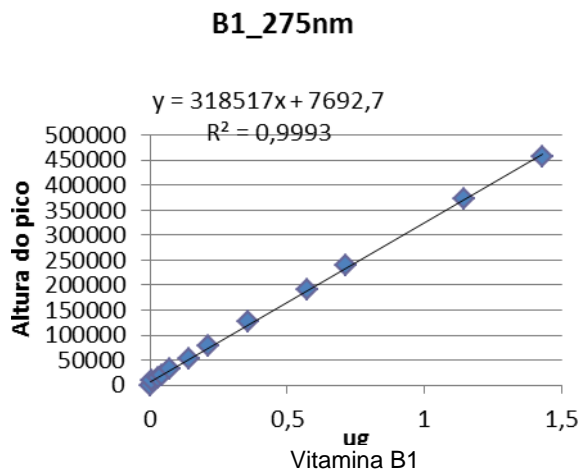
(Alteração das condições cromatográficas)

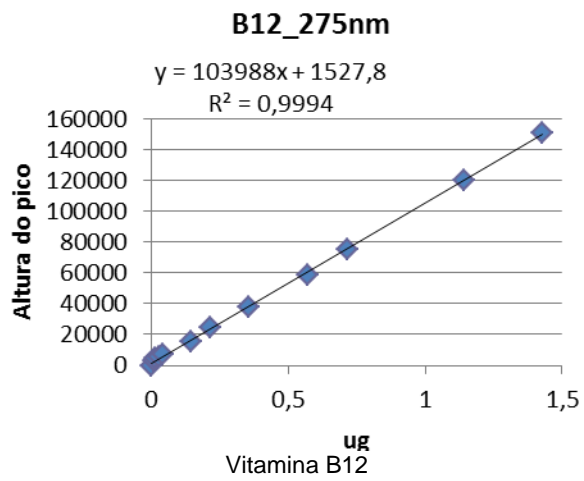
**ANEXO 2 – Comprimentos de onda de cada Vitamina do Complexo B**



**Figura A.2.1 – Representação do espectro de cada vitamina B.**

### ANEXO 3 - Curvas de calibração





**Figura A.3.1** – Curvas de calibração das várias vitaminas B.

## ANEXO 4 – Análise de variância das vitaminas B1, B2, B3, B5, B6 e B9

Tabela A.4.1 – Resultados da análise de variância da Tiamina (B1)

	<b>g.l.</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Cond. Prod.</b>	1	0,408	0,408	1,858	0,1772
<b>N.º Lactações</b>	1	0,510	0,510	2,326	0,1317
<b>Músculo</b>	1	1,019	1,019	<b>4,648</b>	<b>0,0345</b>
<b>Idade (Meses)</b>	1	0,395	0,395	1,802	0,1838
<b>Peso (kg)</b>	1	0,294	0,294	1,342	0,2506
<b>Cond. Prod x N.º lactações</b>	1	0,688	0,688	3,136	0,0809
<b>Cond. Prod x músculo</b>	1	0,098	0,098	0,446	0,5065
<b>N.º lactações x Músculo</b>	1	0,0001	0,0001	0,0005	0,9825
<b>Cond. Prod x músculo x N.º lactações</b>	1	0,837	0,837	3,814	0,0548
<b>Modelo</b>	9	3,650	0,406	1,849	0,0745
<b>Resíduos</b>	70	15,354	0,219	----	----
<b>Total</b>	79	19,004	----	----	----
<b>R<sup>2</sup>= 0,192</b>					

Tabela A.4.2 – Resultados da análise de variância da Riboflavina (B2)

	<b>g.l.</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Cond. Prod.</b>	1	0,055	0,055	0,805	0,3728
<b>N.º Lactações</b>	1	1,003	1,003	<b>14,786</b>	<b>0,0002</b>
<b>Músculo</b>	1	0,225	0,225	3,318	0,0728
<b>Idade (Meses)</b>	1	1,241	1,241	<b>18,301</b>	<b>0,00006</b>
<b>Peso (kg)</b>	1	1,429	1,429	<b>21,078</b>	<b>0,00002</b>
<b>Cond. Prod x N.º lactações</b>	1	0,316	0,316	<b>4,664</b>	<b>0,0342</b>
<b>Cond. Prod x músculo</b>	1	0,729	0,729	<b>10,756</b>	<b>0,0016</b>
<b>N.º lactações x Músculo</b>	1	0,005	0,005	0,081	0,7771
<b>Cond. Prod x músculo x N.º lactações</b>	1	0,206	0,206	3,033	0,0859
<b>Modelo</b>	9	3,364	0,374	<b>5,5103</b>	<b>0,00001</b>
<b>Resíduos</b>	70	4,748	0,068	----	----
<b>Total</b>	79	8,112	----	----	----
<b>R<sup>2</sup>= 0,415</b>					

Tabela A.4.3 – Resultados da análise de variância da Niacina (B3)

	<b>g.l.</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Cond. Prod.</b>	1	0,169	0,169	0,011	0,9183
<b>N.º Lactações</b>	1	338,040	338,041	<b>21,248</b>	<b>0,00002</b>
<b>Músculo</b>	1	20,680	20,680	1,299	0,2581
<b>Idade (Meses)</b>	1	401,459	401,459	<b>25,234</b>	<b>0,000004</b>
<b>Peso (kg)</b>	1	151,915	151,915	<b>9,548</b>	<b>0,0028</b>
<b>Cond. Prod x N.º lactações</b>	1	193,868	193,868	<b>12,185</b>	<b>0,0008</b>
<b>Cond. Prod x músculo</b>	1	5,460	5,460	0,343	0,5598
<b>N.º lactações x Músculo</b>	1	0,074	0,074	0,005	0,9459
<b>Cond. Prod x Músculo x N.º Lactações</b>	1	6,713	6,713	0,422	0,5180
<b>Modelo</b>	9	507,659	56,406	<b>3,545</b>	<b>0,0011</b>
<b>Resíduos</b>	70	1113,668	15,909	----	----
<b>Total</b>	79	1621,327	----	----	----
<b>R<sup>2</sup> = 0,313</b>					

Tabela A.4.4 – Resultados da análise de variância do Ácido pantoténico (B5)

	<b>g.l.</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Cond. Prod.</b>	1	0,759	0,759	2,623	0,1098
<b>N.º Lactações</b>	1	1,019	1,019	3,522	0,0647
<b>Músculo</b>	1	0,001	0,001	0,004	0,9472
<b>Idade (Meses)</b>	1	1,167	1,167	<b>4,031</b>	<b>0,0485</b>
<b>Peso (kg)</b>	1	0,078	0,078	0,272	0,6035
<b>Cond. Prod x N.º lactações</b>	1	1,544	1,544	<b>5,333</b>	<b>0,0238</b>
<b>Cond. Prod x músculo</b>	1	3,820	3,820	<b>13,196</b>	<b>0,0005</b>
<b>N.º lactações x Músculo</b>	1	0,338	0,338	1,169	0,2832
<b>Cond. Prod x Músculo x N.º Lactações</b>	1	0,073	0,073	0,253	0,6166
<b>Modelo</b>	9	10,743	1,194	<b>4,123</b>	<b>0,0003</b>
<b>Resíduos</b>	70	20,625	0,289	----	----
<b>Total</b>	79	31,368	----	----	----
<b>R<sup>2</sup> = 0,346</b>					

Tabela A.4.5 – Resultados da análise de variância da Piridoxina (B6)

	<b>g.l.</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Cond. Prod.</b>	1	6,138	6,138	<b>4,414</b>	<b>0,0392</b>
<b>N.º Lactações</b>	1	0,773	0,773	0,556	0,4584
<b>Músculo</b>	1	0,004	0,004	0,003	0,9555
<b>Idade (Meses)</b>	1	2,441	2,441	1,756	0,1894
<b>Peso (kg)</b>	1	0,405	0,405	0,291	0,5911
<b>Cond. Prod x Nº lactações</b>	1	0,0004	0,0004	0,0003	0,9870
<b>Cond. Prod x músculo</b>	1	0,052	0,052	0,037	0,8479
<b>Nº lactações x Músculo</b>	1	0,663	0,663	0,477	0,4291
<b>Cond. Prod x Músculo x Nº Lactações</b>	1	0,091	0,091	0,065	0,7990
<b>Modelo</b>	9	14,349	1,594	1,146	0,3428
<b>Resíduos</b>	70	97,346	1,390	----	----
<b>Total</b>	79	111,695	----	----	----

R<sup>2</sup> = 0,128

Tabela A.4.6 – Resultados da análise de variância do Folato (B9)

	<b>g.l.</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Cond. Prod.</b>	1	0,027	0,027	1,125	0,2925
<b>N.º Lactações</b>	1	0,109	0,109	<b>4,548</b>	<b>0,0364</b>
<b>Músculo</b>	1	0,0002	0,0002	0,008	0,9287
<b>Idade (Meses)</b>	1	0,061	0,061	2,553	0,1145
<b>Peso (kg)</b>	1	0,019	0,019	0,783	0,3793
<b>Cond. Prod x Nº lactações</b>	1	0,242	0,242	<b>10,056</b>	<b>0,0022</b>
<b>Cond. Prod x músculo</b>	1	0,006	0,006	0,268	0,6066
<b>Nº lactações x Músculo</b>	1	0,004	0,004	0,148	0,7013
<b>Cond. Prod x Músculo x Nº Lactações</b>	1	0,011	0,011	0,474	0,4936
<b>Modelo</b>	9	0,382	0,042	1,766	0,0905
<b>Resíduos</b>	70	1,682	0,024	----	----
<b>Total</b>	79	2,064	----	----	----

R<sup>2</sup> = 0,346

## ANEXO 5 – Valores das médias das vitaminas e do erro padrão para cada factor em estudo

**Tabela A.5.1** – Valores das médias e respectivo erro padrão, para cada vitamina, em influência do tipo de músculo.

	<b>Ld</b>	<b>Gm</b>	<b>Erro padrão</b>
<b>B1</b>	0,628	0,854	0,074
<b>B2</b>	0,269	0,163	0,041
<b>B3</b>	5,226	6,243	0,631
<b>B5</b>	1,018	1,009	0,085
<b>B6</b>	1,873	1,888	0,186
<b>B9</b>	0,111	0,108	0,025

Valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

**Tabela A.5.2** – Valores das médias e respectivo erro padrão, para cada vitamina, em influência do tipo Condição de Produção.

	<b>Lactação</b>	<b>Seca</b>	<b>Erro padrão</b>
<b>B1</b>	0,811	0,670	0,074
<b>B2</b>	0,190	0,242	0,041
<b>B3</b>	5,556	5,913	0,631
<b>B5</b>	0,902	1,125	0,085
<b>B6</b>	1,584 <sup>a</sup>	2,176 <sup>b</sup>	0,186
<b>B9</b>	0,134	0,085	0,0025

Valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

**Tabela A.5.3** – Valores das médias e respectivo erro padrão, para cada vitamina, em influência do N.º de Lactações.

	<b>1_2</b>	<b>6_7</b>	<b>Erro padrão</b>
<b>B1</b>	0,808	0,674	0,074
<b>B2</b>	0,253 <sup>b</sup>	0,179 <sup>a</sup>	0,041
<b>B3</b>	5,959 <sup>b</sup>	5,509 <sup>a</sup>	0,631
<b>B5</b>	1,008	1,019	0,085
<b>B6</b>	1,676	2,084	0,186
<b>B9</b>	0,087 <sup>b</sup>	0,132 <sup>a</sup>	0,025

Valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

**Tabela A.5.4** – Valores das médias e respectivo erro padrão, para cada vitamina, em influência da Cond. Prod. X N.º de Lactações.

	Lactação		Seca		Erro padrão
	1_2	6_7	1_2	6_7	
<b>B1</b>	0,806	0,817	0,809	0,531	0,105
<b>B2</b>	0,214 <sup>b</sup>	0,167 <sup>b</sup>	0,293 <sup>a</sup>	0,191 <sup>a</sup>	0,058
<b>B3</b>	5,181 <sup>b</sup>	5,931 <sup>b</sup>	6,738 <sup>a</sup>	5,087 <sup>a</sup>	0,892
<b>B5</b>	1,129 <sup>ab</sup>	0,675 <sup>a</sup>	0,887 <sup>ab</sup>	1,364 <sup>b</sup>	0,120
<b>B6</b>	1,477	1,692	1,875	2,476	0,274
<b>B9</b>	0,157 <sup>a</sup>	0,111 <sup>ab</sup>	0,018 <sup>b</sup>	0,151 <sup>b</sup>	0,035

Valores médios seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

**Tabela A.5.5** – Valores das médias e respectivo erro padrão, para cada vitamina, em influência da Cond. Prod. x tipo de músculo.

	Lactação		Seca		Erro padrão
	Gm	Ld	Gm	Ld	
<b>B1</b>	0,889	0,733	0,818	0,522	0,105
<b>B2</b>	0,233 <sup>ab</sup>	0,148 <sup>b</sup>	0,094 <sup>b</sup>	0,391 <sup>a</sup>	0,058
<b>B3</b>	5,803	5,309	6,682	5,143	0,892
<b>B5</b>	1,117 <sup>ab</sup>	0,688 <sup>b</sup>	0,903 <sup>ab</sup>	1,348 <sup>a</sup>	0,120
<b>B6</b>	1,617	1,552	2,158	2,194	0,264
<b>B9</b>	0,124	0,145	0,092	0,077	0,035

**Tabela A.5.6** – Valores das médias e respectivo erro padrão, para cada vitamina, em influência do N.<sup>o</sup> lactações x tipo de músculo.

	<b>1_2</b>		<b>6_7</b>		<b>Erro padrão</b>
	<b>Gm</b>	<b>Ld</b>	<b>Gm</b>	<b>Ld</b>	
<b>B1</b>	0,922	0,694	0,786	0,563	0,105
<b>B2</b>	0,208	0,298	0,118	0,240	0,058
<b>B3</b>	6,499	5,421	5,987	5,031	0,892
<b>B5</b>	1,069	0,947	0,950	1,088	0,120
<b>B6</b>	1,593	1,759	2,183	1,986	0,264
<b>B9</b>	0,093	0,082	0,123	0,139	0,035