

# Avaliação da concentração de retinol em requeijões cremosos comercializados em Natal, RN/Brasil

## Retinol concentrations in the cream cheeses sold in Natal, RN/Brazil

RIALA6/1170

Samara Dantas BATISTA<sup>1</sup>, Gabrielle Mahara Martins AZEVEDO<sup>1</sup>, Katherine Feitosa de ARAÚJO<sup>1</sup>, Lígia Rejane Siqueira GARCIA<sup>2</sup>, Karla Danielly da Silva RIBEIRO<sup>2</sup>, Carlos José de LIMA<sup>2</sup>, Roberto DIMENSTEIN<sup>2\*</sup>

\*Endereço para correspondência: Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Av. Senador Salgado Filho 3000 CEP 59072-970 Natal, RN/Brasil, telefone: 55 (0\*\*84) 3215-3416 ramal 205, fax 55 (0\*\*84) 32119208; e-mail: robertod@ufrnet.br

<sup>1</sup>Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN/Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN/Brasil.

Recebido: 19/08/2008 – Aceito para publicação: 24/09/2008

### RESUMO

Os lipídeos são componentes de diferentes alimentos da dieta humana. Sua concentração afeta os teores de vitaminas lipossolúveis, como a vitamina A, que apresenta ação relevante nos processos biológicos como reprodução, ciclo visual e diferenciação celular. O requeijão, que constitui um queijo fundido derivado do leite, é considerado fonte desse micronutriente. As concentrações de retinol foram avaliadas em duas marcas de requeijão (A e B) nas versões integral e desnatada, comercializadas na cidade de Natal/ RN. Três unidades de cada versão das duas marcas foram adquiridas em supermercado da cidade. Após a extração, a concentração de retinol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. As médias das concentrações de retinol em cada marca foram  $40,5 \pm 0,7$  e  $14,3 \pm 4,5 \mu\text{g}/100\text{g}$  respectivamente para requeijão integral e desnatado da marca A ( $p < 0,05$ ), e de  $75,7 \pm 3,51$  e  $26,3 \pm 2,52 \mu\text{g}/100\text{g}$  respectivamente para integral e desnatado da marca B ( $p < 0,05$ ). Os resultados demonstraram que a versão integral possui concentração de retinol superior à versão desnatada; entretanto, os níveis de retinol encontrados estão abaixo dos valores relatados por outros autores. Essa variação possivelmente ocorre em virtude da ausência de padronização na fabricação do requeijão.

**Palavras-chave.** retinol, requeijão, CLAE.

### ABSTRACT

Lipids are food components of the human nourishment, and the concentration of these constituents affect on liposoluble vitamins levels, such as vitamin A which takes part in biological processes of reproduction, in visual cycle and in cellular differentiation. As the cream cheese, made from molten milk, is considered the source of this micronutrient, the retinol concentrations in cream cheese samples marketed in the city of Natal, RN were investigated. Three units of each cream cheese kinds, that is, the whole type and skimmed type from two brands (A and B) were purchased from a supermarket of that city. After processing the retinol extraction, its concentration was determined by means of high performance liquid chromatography. The average of retinol concentrations in cream cheese samples from two brands were  $40.5 \pm 0.7$  and  $14.3 \pm 4.5 \mu\text{g}/100\text{g}$  in whole and skimmed samples from brand A ( $p < 0.05$ ), respectively, and  $75.7 \pm 3.51$  and  $26.3 \pm 2.52 \mu\text{g}/100\text{g}$  in whole and skimmed types from brand B ( $p < 0.05$ ), respectively. The whole cream cheese showed higher concentration of retinol than the skimmed type, although the found retinol levels were lower than those values elsewhere reported. The retinol contents dissimilarity might occurs as no standard operational protocol for cream cheese production has been available yet.

**Key word.** retinol, cream cheese, HPLC.

## INTRODUÇÃO

O requeijão é um derivado do leite fabricado no Brasil com algumas variações de tecnologia e características<sup>1</sup>. Este produto surgiu da necessidade de conservação do leite recém ordenhado, proporcionando maior durabilidade, ao passo que aproveita o soro do leite que era tratado como resíduo<sup>2</sup>. Ele pertence à classe de queijos processados ou fundidos e é fabricado a partir de leite pasteurizado ou não, com ou sem adição de cultura láctica<sup>3,4</sup>.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), requeijão se define como o produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite. Existe uma variedade de requeijões que são classificados conforme matérias-primas empregadas em seu processo de elaboração. Dessa forma, o requeijão pode ser classificado como cremoso, obtido da mesma base de ingredientes com adição de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou butter oil. Ou como Requeijão de Manteiga (conhecido como Requeijão do Norte), o qual é obtido pela fusão prolongada com agitação de uma mistura de manteiga e massa de coalhada de leite integral, semi-desnatado ou desnatado. Além destes, outros ingredientes podem ser adicionados como condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias<sup>5</sup>.

A composição média do requeijão típico consiste de 60% de água, 25% de gordura, 10% de proteína, 2% de carboidratos e 1% de NaCl<sup>6</sup>.

Há no mercado dois tipos de requeijão classificados como cremosos: desnatado e integral. O requeijão desnatado (*light*) deve atender à classificação estabelecida pelo Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional complementar<sup>7</sup>, que determina uma redução mínima de 25% em gorduras totais e diferença maior que três gramas de gordura por 100g de sólidos em relação ao produto integral.

O teor de gordura vai afetar não só no sabor e na firmeza, como também na determinação do valor calórico do produto final e teores de vitaminas lipossolúveis como, por exemplo, a vitamina A, que está associada aos glóbulos de gordura do leite<sup>3,8,9</sup>.

Dimenstein<sup>10</sup>, com base em diversos autores, ressaltou que a vitamina A está envolvida em vários processos de importância biológica, como a reprodução, o ciclo visual e a diferenciação celular, que por sua vez afetam processos fisiológicos como o crescimento, o desenvolvimento fetal e a integridade do sistema imunológico. Esta vitamina lipossolúvel é encontrada na natureza na forma livre ou esterificada. Nos produtos de origem animal é encontrada no fígado, gema de ovo e laticínios – como queijos, bebidas lácteas e requeijões. E nos vegetais, sob a forma de carotenóides (frutas e vegetais de coloração verde-escura, amarela ou laranja)<sup>11,12</sup>.

A deficiência de vitamina A ocasiona a cegueira noturna, descamação e aspereza da pele, ressecamento das membranas mucosas, inibição no crescimento, diminuição da resistência a infecções, defeito no desenvolvimento e

modulação dos ossos<sup>11</sup>.

Para que isso seja evitado, deve-se manter uma adequada ingestão diária de alimentos que contenham esse micronutriente. A *DRI* (Ingestão Dietética Recomendada) recomenda um consumo diário de 900µg e 700µg para homens e mulheres, respectivamente<sup>13</sup>.

Em razão da importância desse micronutriente na dieta e de sua relevante concentração em produtos de origem animal, o presente trabalho objetivou avaliar a concentração de retinol em duas marcas de requeijão comercializadas na cidade de Natal/RN, comparando os níveis encontrados em ambas as marcas e entre as suas versões integral e desnatada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção e preparação das amostras de requeijão

Para obtenção das amostras, foi realizado um levantamento em supermercados da cidade de Natal/RN das marcas de requeijão mais consumidas pela população. Entre seis marcas disponíveis, três se destacaram pelo volume de vendas. Porém, uma foi excluída do estudo por se tratar de especialidade láctea a base de requeijão, pois continha gordura hidrogenada na sua composição e de acordo com a legislação brasileira a denominação requeijão está reservada ao produto no qual a base láctea não contenha gordura e/ou proteína de origem não láctea. Sendo assim, foram incluídas na pesquisa duas marcas de requeijão que serão aqui apresentadas como marca A e marca B. Esses requeijões são provenientes dos estados de São Paulo e Minas Gerais, respectivamente.

As unidades do produto foram obtidas do mesmo lote, dentro do prazo de validade, sendo 3 frascos de requeijão para as versões integral e desnatada de cada marca, totalizando 12 frascos. De cada frasco foi retirada uma alíquota de 10g para análise da concentração de retinol.

### Análises das amostras

A extração foi realizada segundo Giuliano et al. modificado<sup>14</sup>. Em alíquotas de 10 g de requeijão preparou-se homogenado com 10 mL de solução salina 0,9%, 10mL de Etanol 95% e 20 mL de Hidróxido de Potássio a 50%. As soluções foram homogeneizadas utilizando-se um processador (*mixer*) e transferidas para provetas de 250mL.

A etapa de saponificação aconteceu em banho-maria a 45°C por 2 horas. Após essa etapa, foram adicionados em cada recipiente 50mL de hexano para recuperação do retinol nas amostras. Em seguida foram agitadas por 2 minutos e reservadas para obtenção do precipitado e sobrenadante. O sobrenadante ou extrato hexânico foi retirado e novamente foram adicionados 50mL de hexano, repetindo-se o mesmo processo extrativo.

O extrato de cada amostra foi separado em provetas, tendo como volumes finais superiores a 93mL para os tipos integral e desnatado da marca A e B.

Do conteúdo total de extrato hexânico foram retiradas

alíquotas de 4mL para a evaporação sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 37°C. Após a evaporação, as amostras foram ressuspensas em 1mL de etanol absoluto para então, ser analisada a concentração de etanol.

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um Detector SPD-10 A Shimadzu UV-VIS e Integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu com uma coluna LC Shim-pack CLC-ODS (M) 4,6mm x 25cm.

O cromatograma evoluiu nas seguintes condições: fase móvel metanol 100% e fluxo 1,0mL/min. A identificação e quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com o tempo de retenção e a área do respectivo padrão (Figura 1). A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico ( $\epsilon$  1%, 1cm = 1850) em etanol e comprimento de onda de 325nm<sup>15</sup>.

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação da extração, obtendo-se 100% de recuperação do retinol acetato (padrão interno) adicionado às amostras, as quais sofreram o mesmo processo de extração que as demais amostras elaboradas, exceto a etapa de saponificação, para evitar a hidrólise alcalina do padrão interno. A linearidade do método foi confirmada pela curva de calibração, feita com soluções padrões obtidas a partir do padrão all-trans-retinol (Sigma) em concentrações entre 4 a 64ng/20 $\mu$ L (Figura 2).

#### Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão e as diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ , através da análise por teste T de Student.

## RESULTADOS

Os valores de retinol no requeijão da marca A foram  $40,5 \pm 0,7$  e  $14,3 \pm 4,5$   $\mu$ g/100g para integral e desnatado, respectivamente (Figura 3). A análise da marca B apresentou resultados superiores aos encontrados na marca A ( $p < 0,05$ ), consistindo em  $75,7 \pm 3,5$   $\mu$ g/100g para o integral e  $26,3 \pm 2,5$   $\mu$ g/100g para desnatado.

As análises demonstraram que houve diferença significativa entre as versões de requeijão integral e desnatado em ambas as marcas, sendo superiores os níveis de retinol presentes no tipo integral ( $p < 0,05$ ). Isso ocorre pela maior presença de lipídeos no primeiro tipo de requeijão e conseqüentemente, uma maior quantidade de vitamina A por sua característica lipossolúvel, concentrando-se nos glóbulos de gordura no leite<sup>11,12</sup>. Tendo em vista que o requeijão do tipo desnatado deve ter um decréscimo mínimo de 25% de gorduras totais em relação ao produto integral<sup>7</sup>, a diminuição da quantidade de vitamina A é considerada normal pela menor quantidade de gordura ( $14,3$   $\mu$ g/100g e  $26,3$   $\mu$ g/100g, marcas A e B respectivamente).

Como foi observado, o requeijão da marca A apresentou

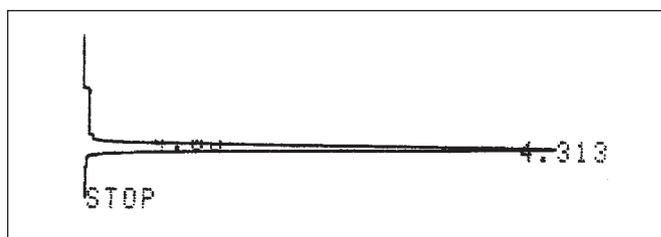


Figura 1. Cromatograma do padrão de all-trans-retinol, 24mg/20 $\mu$ L e tempo de retenção 4,3 minutos

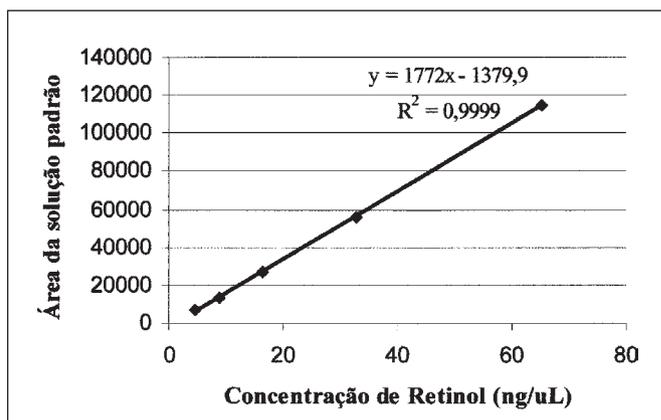


Figura 2. Determinação gráfica da linearidade do método

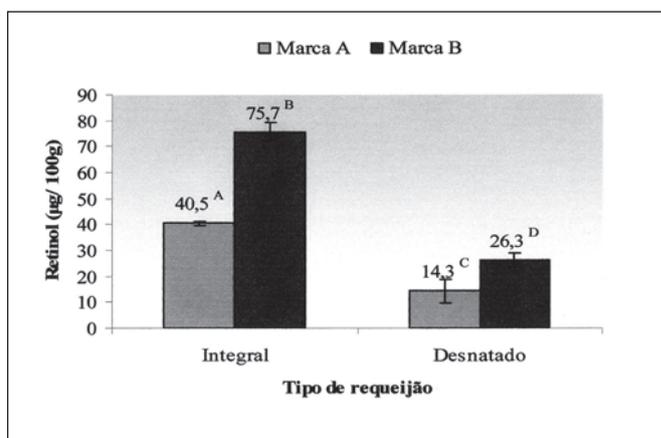


Figura 3. Níveis de retinol das marcas A e B nas versões integral e desnatada.

<sup>AB</sup> Diferença significativa ( $p < 0,001$ )

<sup>CD</sup> Diferença significativa ( $p < 0,05$ )

<sup>AC</sup> Diferença significativa ( $p < 0,05$ )

<sup>BD</sup> Diferença significativa ( $p < 0,0001$ )

concentração inferior de retinol quando comparado à marca B nas duas versões trabalhadas. Essa diferença pode ocorrer provavelmente por perdas durante o processamento e acondicionamento, o que ocasionaria oxidação da vitamina A. Outra hipótese seria a diferença na concentração de retinol do leite utilizado para fabricação do requeijão. Silva<sup>9</sup> referiu que diferenças no tratamento bovino, principalmente no tocante à alimentação, e conseqüentemente, a procedência do leite que será usado na fabricação, podem ser determinantes nos níveis de retinol encontrados em requeijões. Os locais de fabricação de requeijão das marcas analisadas são distintos, São Paulo e Minas Gerais, o que pode influenciar na concentração final de retinol no produto.

Em geral, os níveis de retinol das duas marcas estão abaixo dos apresentados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)<sup>16</sup> e na Tabela do United States Department of Agriculture (USDA)<sup>17</sup>, onde os valores são de 195µg/100g e 366 µg/100g de requeijão, respectivamente, para produtos integrais. Essa diferença pode ser explicada provavelmente pela variação de retinol do próprio leite, visto que trabalhos realizados com o leite bovino relatam valores de retinol de 22,7µg/100g a 507µg/100g (1691,6UI/ 100g), demonstrando grande variação na composição em retinol desses produtos<sup>18,19</sup>.

Apesar da variação encontrada, o requeijão pode fornecer uma contribuição importante para atingir a recomendação nutricional de vitamina A, já que se trata de um alimento de fácil acesso para a população em geral. Sugerimos mais estudos que investiguem as perdas deste nutriente durante o processo de fabricação e acondicionamento.

## CONCLUSÃO

Uma diferença considerável nas concentrações de retinol foi verificada entre as marcas e versões de requeijão trabalhadas, tendo a versão integral concentração superior à versão desnatada, e destes com os achados da literatura.

## REFERÊNCIAS

1. Munck AV, Campos WA. Requeijão: um produto brasileiro. *Inf Agropec*.1984; 10:35-8.
2. Rodrigues, F. Requeijão Crioulo. Queijos no Brasil. Disponível em: <<http://www.queijosnobrasil.com.br/queijo/tipos/requeijao.htm>>. Acesso em 2 jul. 2008.
3. Baroni AF, Freitas IC, Cunha RL, Hubinger MD, Menegalli FC.

- Caracterização reológica de requeijão cremoso tradicional e com teor reduzido de gordura: viscosidade extensional e em cisalhamento. *Braz J Food Technol*. 1999; 2: 21-9.
4. Soares FM, Fonseca LM, Martins RT, Machado EC, Pereira Jr FN, Fonseca CSP. Influência do concentrado protéico de soro na composição do requeijão em barra com teor reduzido de gordura. *Arq Bras Med Vet Zootec*.2002; 54(6): 643-7.
5. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Requeijão. Disponível em: <[http://anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/82\\_96.htm](http://anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/82_96.htm)>. Acesso em 2 jul. 2008.
6. FOODBASE. Base de dados em CD-ROM da Legislação Brasileira. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos, 1996.
7. Brasil. Portaria n.27 SVS/MS, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional complementar. *Diário Oficial da União*. 1998 16 jan; (11-E):1; Seção 1.
8. Castro AF, Prestes MM, Ribeiro L, Imianovsky U, Reiter MGR. Qualidade sensorial e microbiológica do requeijão tradicional e *light*. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*.2002; 57(327):160-2.
9. Silva PHF. Leite: Aspectos de Composição e Propriedades. *QNEsc*. 1997; 6:3-5.
10. Dimenstein R. Estudo da transferência materno fetal de vitamina A e carotenóides sob condições adequadas e sub-adequadas do estado nutricional materno em vitamina A [Tese de doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1999.
11. Combs GF. Vitaminas. In: Mahan LK, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia, 10ª ed., São Paulo: Ed. Roca; 2002. p. 67-71.
12. Almeida-Muradian LB, Penteadó MVD. Vitamina A. In: Penteadó MVD. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. São Paulo: Manole; 2003. p. 55-72.
13. IOM (Institute of Medicine). Vitamin A. In: Food and Nutrition Board. IOM (Institute of Medicine). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, cooper, iodine, iron, manganase, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. 1st ed. Washington, DC: National Academy Press. 2001: 82-161.
14. Giuliano AR, Neilson EM, Kelly BE, Canfield LM. Simultaneous quantitation and separation of carotenoids and retinol in human milk by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol*. 1992; 213:391-9.
15. Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr*. 1992; 56:417-26.
16. TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA-UNICAMP- Versão II. 2.ed. - Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p
17. U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. 2007. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnr/ndl>. Acesso em 13 abr. 2008.
18. Soares FB, Sousa JM, Dimenstein R. Avaliação da concentração de retinol em leite UHT (“Ultra High Temperature”) comercializado em Natal, Rio Grande do Norte. *Quim Nova*.2008; 31(2):268-9.
19. Bianchini R, Penteadó MD. Teores de retinol, b-caroteno e a-tocoferol em leites bovinos comercializados na cidade de São Paulo. *Ciênc Tecnol Aliment*.1999;19(3): 349-55.