UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

MARYANE MACHADO BERTELLI
(Dissertação de Mestrado)

**Inspeção de conteúdos vitamínicos em amostras de
farinha láctea por eletroforese capilar**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data de depósito na SPG: 03/07/2013

MARYANE MACHADO BERTELLI

**Inspeção de conteúdos vitamínicos em amostras de
farinha láctea por eletroforese capilar**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Química)*

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo

2013

“Inspeção de conteúdos vitamínicos em amostras de farinha láctea por eletroforese capilar”

MARYANE MACHADO BERTELLI

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestra em Ciências – Programa: Química.

Aprovado (a) por:

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira
IQ – USP

Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantu
IQ – UNICAMP

SÃO PAULO

08 de agosto de 2013

Dedicatórias

A Deus, por estar sempre ao meu lado, iluminando meu caminho, por me dar forças para vencer todos os obstáculos e por conceder a serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos mudar; coragem para mudar aquelas que podemos e sabedoria para distinguir umas das outras.

Aos meus pais, Célia e Mário, pois de vocês recebi o dom mais precioso, a vida. Já por isso sou infinitamente grata.

A minha irmã, Marycelle, por ser minha maior referência de coragem e perseverança.

Ao meu sobrinho, Danilo, por ser minha maior alegria dos últimos tempos.

Aos meus familiares e amigos, pelo amor e pelo incentivo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Marina Franco Maggi Tavares, pela orientação; muito obrigada pela oportunidade, pela confiança e pelo respeito.

Ao professor Dr. João Pedro Simon Farah, pelas vezes em que me fez chorar, mas também pelas tantas gargalhas que me proporcionou, em meio a tanto conhecimento transmitido.

Ao professor Dr. Claudimir Lúcio do Lago, pela colaboração durante o afastamento por licença sabática da professora Dra. Marina Tavares, por presidir a banca de qualificação e pelos conselhos oferecidos.

Aos professores Dra. Ursula Lanfer e Dr. Pedro Vitoriano, por participarem da banca de qualificação e por todas as contribuições.

Às professoras Dra. Nina Coichev e Dra. Maria Encarnación Suárez, pelos ensinamentos em Química Analítica.

Aos amigos do laboratório do professor Dr. Massuo, pela presteza ao permitirem o uso da infraestrutura do laboratório.

Aos colegas do grupo LACE, Aline Klassen, Aline Vitor, Claudinei, Daniel Polesel, Edgar, Gisele, Grazi, Karina, Lucas, Talita e Tati, pelos ensinamentos e pela troca de experiência.

Aos professores do Instituto de Química, pelo conhecimento transmitido.

Ao técnico especialista Daniel Rossado, por estar sempre prontificado a ajudar, obrigada pela colaboração e pela paciência. À técnica Simone, pelo auxílio na rotina do laboratório.

Aos funcionários do Instituto de Química.

Ao professor Dr. Marcone, pela confiança e pelo incentivo desde a fase da graduação.

Ao Fernando e à Manoela, pela paciência, pelo carinho e por me ensinarem a dar os primeiros passos na eletroforese capilar em Juiz de Fora.

À amiga Aline Klassen, pelo carinho, pela atenção e pela amizade.

Ao Roberto, pelas colaborações no laboratório e pela amizade.

À querida Alininha, pelas palavras de força e ânimo, por não deixar a peteca cair, mesmo nos momentos mais difíceis; obrigada pelos momentos alegres e também pelos tristes, por sempre estar ao meu lado.

À amiga Grazi, pelo companheirismo nos últimos tempos.

À amiga Polly, pelo companheirismo e pelos tantos momentos que estivemos juntas e que ainda vamos estar.

À Luana, pelo carinho, pelo incentivo e pela amizade, mesmo distante.

Ao amigo e irmão Felipe, pelas palavras de força, por ter me incentivado e me levantado tantas vezes, por nunca se esquecer de mim, mesmo na correria do dia a dia.

À querida Natália, pela amizade e pela acolhida.

Aos amigos da UFJF, Victor, Clarinha, Mafrão, Diego, Delmárcio, Marluce, Luis e Gislaine, pelos momentos felizes e por terem contribuído para o meu amadurecimento.

Aos amigos João e Alexandre, pelo incentivo na nova caminhada.

Ao amigo Luiz Augusto, pelas conversas, pelo apoio e pelo carinho.

Ao Juarez, pela colaboração, pelo apoio e pela amizade.

Aos queridos Shira e Patrícia, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao meu cunhado Felipe, pelo carinho e pela acolhida.

À minha irmã Marycelle, pelo amor dedicado a mim, por ter me ajudado a construir os meus sonhos. Sem você teria sido mais difícil!

Aos meus pais, Célia e Mário, “que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigada. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilha-se sem medo e cheia de esperanças, não bastaria um muito obrigada. A vocês, que se doaram inteiros e

renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudessem realizar os meus. Pela longa espera e pela compreensão durante minhas longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigada. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente por uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês!”

Às agências de fomento, Capes e Fapesp, pelo apoio financeiro.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para o meu crescimento científico e moral.

“Sem saber que era impossível, ele foi lá e fez.”

Jean Cocteau

*"Não conheço ninguém que conseguiu realizar seu sonho, sem sacrificar feriados e domingos pelo menos uma centena de vezes.
Da mesma forma, se você quiser construir uma relação amigável com seus filhos, terá que se dedicar a isso, superar o cansaço, arrumar tempo para ficar com eles, deixar de lado o orgulho e o comodismo.
Se quiser um casamento gratificante, terá que investir tempo, energia e sentimentos nesse objetivo.
O sucesso é construído à noite!
Durante o dia você faz o que todos fazem.
Mas, para obter um resultado diferente da maioria, você tem que ser especial.
Se fizer igual a todo mundo, obterá os mesmos resultados.
Não se compare à maioria, pois, infelizmente, ela não é modelo de sucesso.
Se você quiser atingir uma meta especial, terá que estudar no horário em que os outros estão tomando chope com batatas fritas.
Terá de planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão.
Terá de trabalhar enquanto os outros tomam sol à beira da piscina.
A realização de um sonho depende de dedicação; há muita gente que espera que o sonho se realize por magia, mas toda magia é ilusão, e a ilusão não tira ninguém de onde está; em verdade, a ilusão é combustível dos perdedores pois...
Quem quer fazer alguma coisa, encontra um MEIO.
Quem não quer fazer nada, encontra uma DESCULPA."*

Roberto Shinyashiki

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
 Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
 CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.....	20
1 Introdução.....	20
1.1 Fortificação de alimentos.....	20
1.2 Farinha láctea.....	25
1.3 Vitaminas.....	26
1.3.1 Características gerais.....	26
1.3.2 Funções bioquímicas e aspectos nutricionais.....	27
1.3.3 Características físico-químicas.....	36
1.3.4 Deficiência de vitaminas.....	40
1.3.5 Estabilidade das vitaminas em alimentos.....	49
1.3.6 Suplementação e megadoses.....	53
1.4 Análise de vitaminas em alimentos.....	57
1.4.1 Eletroforese capilar na análise de vitaminas.....	63
2 Justificativa.....	67
3 Objetivo geral.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

CAPÍTULO 2 – ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DE VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS EM FARINHA LÁCTEA POR ELETROFORESE CAPILAR.....	74
1 Introdução.....	74
2 Objetivos.....	80
3 Parte experimental.....	81
3.1 Soluções e reagentes.....	81
3.2 Instrumentação.....	82
3.3 Preparo de amostra.....	83
4 Resultados e discussão.....	84
4.1 Otimização da separação por CE.....	84
4.2 Figuras de mérito.....	100
4.3 Avaliação da composição vitamínica em amostras de farinha láctea...111	
4.3.1 Vitaminas do grupo B.....	111
4.3.2 Vitamina C.....	117
5 Conclusões.....	120
REFERÊNCIAS.....	121
 CAPÍTULO 3 – SEPARAÇÃO DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO.....	 123
1 Introdução.....	123
2 Objetivo.....	126
3 Parte experimental.....	127
3.1 Soluções e reagentes.....	127
3.2 Instrumentação.....	127
4 Resultados e discussão.....	129
4.1 Otimização da separação.....	129
4.2 Avaliação da separação cromatográfica.....	140
5 Conclusões.....	142
REFERÊNCIAS.....	143
 CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES GERAIS.....	 145

CAPÍTULO 5 – PERSPECTIVAS.....	146
SÚMULA CURRICULAR.....	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Efeitos da ingestão insuficiente de vitaminas.....	41
Figura 2.1 – Estruturas das vitaminas hidrossolúveis estudadas.....	75
Figura 2.2 – Eletroferograma resultante do teste inicial com CZE. Eletrólito de corrida: 20 mmol L ⁻¹ de TBS (pH 9,2). Tensão: +20 kV. Injeção: 0,5 psi/ 3 s. Detecção direta: 200 nm. Concentração das vitaminas: 25 mg L ⁻¹ , exceto vitamina B ₅ (50 mg L ⁻¹). Identificação dos picos: 1- tiamina (B ₁), 2- cianocobalamina (B ₁₂), 3- piridoxina (B ₆), 4- biotina (B ₈), 5- riboflavina (B ₂), 6- pantotenato de cálcio (B ₅), 7- ácido ascórbico (C), 8- niacina (B ₃), 9- ácido fólico (B ₉).....	84
Figura 2.3 – Espectros de absorção no UV-Vis das vitaminas.....	86
Figura 2.4 – Eletroferograma referente ao primeiro teste por MEKC. Eletrólito: 20 mmol L ⁻¹ de TBS e 30 mmol L ⁻¹ de SDS (pH 9,2). Demais informações ver Figura 2.2.....	87
Figura 2.5 – Avaliação da influência da concentração de SDS na separação das vitaminas. Demais condições idênticas à Fig. 2.2.....	88
Figura 2.6 – Gráfico sobre o estudo da variação do fator de retenção das vitaminas em função da concentração de SDS.....	93
Figura 2.7 – Gráfico de distribuição de confôrmeros (fração molar) em água em função da distância da ligação de hidrogênio (linha pontilhada) do ácido fólico (vitamina B ₉), pelo programa Spartan v4.0. A figura mostra a conformação encurvada da vitamina, deixando clara a formação da ligação de hidrogênio entre o carboxilato (em vermelho) de uma extremidade e os –NH e –NH ₂ (em azul) da outra extremidade. A análise conformacional mostra que em todas as situações a molécula encontra-se encurvada fazendo ligação de H intramolecular.....	93
Figura 2.8 – Triângulo de misturas utilizado na otimização da separação das vitaminas.....	95
Figura 2.9 – Resultado para influência dos solventes do triângulo de misturas na separação. As concentrações de SDS e TBS foram mantidas (ambas 20 mmol L ⁻¹). Demais informações idênticas à Fig. 2.2.....	96
Figura 2.10 – Eletroferograma obtido pelo método otimizado. Eletrólito de corrida: 20 mmol L ⁻¹ de TBS, 20 mmol L ⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Demais informações idênticas à Fig. 2.2.....	97
Figura 2.11 – Resultado preliminar para extração com metanol das vitaminas em farinha láctea. Eletrólito de corrida: 20 mmol L ⁻¹ de TBS, 20 mmol L ⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Tensão: +20 kV. Detecção direta: 200 nm. PI = ibuprofeno de sódio.	

O asterisco (*) indica interferentes das vitaminas B₁ e B₂.....110

Figura 2.12 – Heterogeneidade da amostra de farinha láctea. Eletrólito de corrida: 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Voltagem: +20 kV. Detecção direta: 200 nm.....112

Figura 2.13 – Resultado para as três alíquotas retiradas do conteúdo de uma lata inteira após homogeneização. Eletrólito de corrida: 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Tensão: +20 kV. Detecção direta: 200 nm. Picos: 1 = B₆, 2 = PI, 3 = B₅, 4 = B₃.113

Figura 2.14 – Modificação no método para eliminação de interferência. Eletrólito de corrida: 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Tensão: +15 kV. Detecção direta: 200 nm. Picos: 1 = B₆, 2 = PI, 3 = B₅, 4 = B₃.....114

Figura 2.15 – Determinação da vitamina C em amostra de farinha láctea. Eletrólito de corrida: 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Tensão: +20 kV. Detecção direta: 270 nm.....116

Figura 3.1 – Estruturas das vitaminas lipossolúveis estudadas.....123

Figura 3.2 – Gráfico referente à retenção dos compostos frente à variação da força do solvente (ACN) para determinação do intervalo ótimo para a retenção, onde A₁ = retinol, A₂ = acetato de retinol, D₃ = colecalciferol, E₁ = acetato de α-tocoferol, E₂ = α-tocoferol, E₃ = δ-tocoferol, K₁ = filoquinona.....129

Figura 3.3 – Corridas com eluições isocráticas para verificar a separação no intervalo otimizado para k através do gráfico: (a) ACN 77% e (b) ACN 86%. Vazão: 1 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Temperatura da coluna: 30°C. Detecção: λ = 280 nm. Identificação dos picos: (1) retinol; (2) acetato de retinol; (3) δ-tocoferol; (4) colecalciferol; (5) α-tocoferol; (6) acetato de α-tocoferol; (7) filoquinona.130

Figura 3.4 – Triângulo utilizado para otimização da separação em cromatografia por fase reversa através da seletividade pela mistura de acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e tetraidrofurano (THF). Todas as fases móveis possuem a mesma força de solvente.....131

Figura 3.5 – Cromatogramas resultantes para as fases móveis do triângulo de misturas. Demais informações ver Figura 3.3.....133

Figura 3.6 – Comparação entre o cromatograma obtido pelo simulador e o obtido experimentalmente nas condições de gradiente sugeridas pelo *software*. FM: A – água pura e B – acetonitrila. Gradiente de eluição: 5 - 65% B em 0,5 min, 65 - 90% B em 1 min, 90 - 100% B até 10 min de corrida. Vazão: 2 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Temperatura da coluna: 30°C. Detecção: λ = 280 nm. Identificação dos picos: (1) retinol; (2) acetato de retinol; (3) δ-tocoferol; (4) colecalciferol; (5) α-tocoferol; (6) acetato de α-tocoferol; (7) filoquinona.....135

Figura 3.7 – Espectros de absorção no UV-Vis dos padrões de: **A)** retinol, **B)** acetato de retinol, **C)** δ – tocoferol, **D)** colecalciferol, **E)** α – tocoferol, **F)** acetato de α – tocoferol, **G)** filoquinona. Condições cromatográficas de obtenção dos espectros: gradiente de eluição: 5 - 65% B em 0,5 min, 65 – 90% B em 1 min, 90 – 100% B até 10 min de corrida. Vazão: 2 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Temperatura da coluna: 30°C.....137

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.1 – Características físico-químicas das vitaminas hidrossolúveis.....	36
Quadro 1.2 – Características físico-químicas das vitaminas lipossolúveis.....	38
Quadro 1.3 – Resumo das doenças e principais sintomas associados à deficiência de vitaminas.....	47
Quadro 1.4 – Resumo das condições de estabilidade das vitaminas.....	50
Quadro 1.5 – Métodos por CLAE utilizados para determinação de vitaminas em alimentos.....	59
Quadro 1.6 – Métodos de análise de vitaminas por eletroforese capilar.....	64
Tabela 1.1 – Valores de IDR utilizados para declaração nutricional pela legislação brasileira.....	24
Tabela 2.1 – Propriedades de acidez e solubilidade das vitaminas hidrossolúveis..	75
Tabela 2.2 – Tempos de migração das vitaminas e micela para fins de estudo da retenção.....	89
Tabela 2.3 – Fatores de retenção das vitaminas para as diferentes concentrações de SDS.....	91
Tabela 2.4 – Dados estatísticos das regressões de k vs [SDS].....	92
Tabela 2.5 – Valores de CV% para o tempo de migração e área relativa.....	100
Tabela 2.6 – Parâmetros de avaliação da linearidade do método de separação....	102
Tabela 2.7 – Limites de detecção e quantificação das vitaminas estudadas.....	104
Tabela 2.8 – Resultados para recuperação (%) das vitaminas em amostras de branco da farinha adicionadas de padrões.....	106
Tabela 2.9 – Avaliação da robustez do método de separação otimizado.....	108
Tabela 2.10 – Comparação das concentrações encontradas com aquelas descritas no rótulo da lata.....	115
Tabela 2.11 – Comparação da concentração de vitamina C encontrada com aquela descrita no rótulo da lata.....	117
Tabela 3.1 – Variação da força de eluição da fase móvel para fins de resultados preliminares.....	128
Tabela 3.2 – Tempos de retenção de cada vitamina obtidos através da separação otimizada.....	138

Tabela 3.3 – Parâmetros cromatográficos: tempo de retenção e fator de retenção.....	139
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

AOAC – *Association of Analytical Communities*

AOT – Dioctil Sulfosuccinato de Sódio

ATP – Adenina Trifosfato

CEC – Eletrocromatografia Capilar, do inglês *Capillary Electrochromatography*

CV – Coeficiente de Variação

CZE – Eletroforese Capilar por Zona, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DRI – *Dietary Reference Intakes*

FAD – Flavina Adenina Dinucleotídeo

FDA – *Food and Drug Administration*

FE – Fase Estacionária

FM – Fase Móvel

FMN – Flavina Mononucleotídeo

GC – Cromatografia a Gás, do inglês *Gas Chromatography*

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IDR – Ingestão Diária Recomendada

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MEEKC – Cromatografia Eletrocinética de Microemulsão, do inglês *Microemulsion Electrokinetic Chromatography*

MEKC – Cromatografia Eletrocinética Micelar, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*

MeOH – Metanol

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

NACE – Eletroforese Capilar em Meio Não-Aquoso, do inglês *Non-Aqueous Capillary Electrophoresis*

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

PL – Piridoxal

PLP – Fosfato de Piridoxal

PM – Piridoxamina

PN – Piridoxina

RPM – Rotação por Minuto

SDC – Desoxicolato de Sódio

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SPE – Extração em Fase Sólida

TBS – Tetraborato de Sódio

THF – Tetraidrofurano

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

RDA – *Recommended Daily Allowances*

RF – Riboflavina

RESUMO

Bertelli, M. M. **Inspeção de conteúdos vitamínicos em amostras de farinha láctea por eletroforese capilar**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

Neste trabalho, é proposto um método de separação e determinação das vitaminas hidrossolúveis utilizando-se eletroforese capilar na modalidade cromatografia eletrocinética micelar (MEKC). MEKC pode ser empregada para separar ambas moléculas carregadas ou neutras, individual ou simultaneamente. O método desenvolvido consistiu-se de 20 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio (TBS), 20 mmol L⁻¹ de dodecilsulfato de sódio (SDS) e metanol 15% (v/v). As soluções foram introduzidas no sistema eletroforético sob pressão de 0,5 psi por 3 s. A separação foi conduzida em um capilar de sílica fundida de 50 cm, sob potencial de 20 kV, à temperatura de 22°C e monitorada em 200, 254 e 270 nm. O método analítico apresentou-se seletivo com separação em linha de base, preciso com áreas relativas no intervalo de 1,0 a 11%, apresentou baixos limites de detecção (entre 1,6 e 27,7 µmol L⁻¹) e quantificação (entre 5,0 e 92,2 µmol L⁻¹), além de ser simples e com alta frequência analítica, possibilitando separar as nove vitaminas hidrossolúveis em 15,50 min. Ele foi aplicado em amostra de farinha láctea, na qual foi possível determinar 4 vitaminas (B₃, B₅, B₆ e C). Um método de separação para as vitaminas lipossolúveis, utilizando cromatografia a líquido, também foi proposto. Foi possível obter a separação em linha de base de sete vitaminas desta classe. A validação e a aplicação do método ainda devem ser investigadas.

Palavras-chave: vitaminas, eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência, farinha láctea, fator de retenção.

ABSTRACT

Bertelli, M. M. **Inspection of vitamin content in milk flour samples by capillary electrophoresis.** 2013. Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry Biochemistry. Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, Sao Paulo.

In this paper, we propose a method for separation and determination of water-soluble vitamins using capillary electrophoresis method in micellar electrokinetic chromatography (MEKC). MEKC can be employed to separate both charged and neutral molecules, individually or simultaneously. The method consisted in 20 mmol L⁻¹ sodium tetraborate (TBS), 20 mmol L⁻¹ sodium dodecyl sulfate (SDS) and 15% methanol (v / v). The solutions were introduced into the electrophoretic system under pressure of 0.5 psi for 3 seconds. The separation was performed in a fused silica capillary of 50 cm under potential of 20 kV at a temperature of 22 ° C and monitored at 200, 254 and 270 nm. The analytical method was presented with selective separation line basis with precise relative areas in the range of 1.0 to 11%, showed low detection (1.6 to 27.7 µmol L⁻¹) and quantification (from 5.0 to 92.2 µmol L⁻¹) limits, besides being simple and high sampling rate, allowing to separate nine water-soluble vitamins in 15.50 min. The method was applied to a sample of milky flour, which it was possible to determine 4 vitamins (B₃, B₅, B₆ and C). A method for separating soluble vitamins using liquid chromatography has also been proposed. It was possible to obtain a baseline separation of seven vitamins this class. The validation and application of the method must still be investigated.

Keywords: vitamins, capillary electrophoresis, chromatography, high performance liquid, milky meal, retention factor.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fortificação de alimentos

Muitas pesquisas na área de desnutrição, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, continuam a indicar que uma fração considerável da população, particularmente crianças, adolescentes, idosos e mulheres em idade fértil, pode sofrer de deficiência de nutrientes em nível limítrofe ou patológico. Para assegurar que a ingestão de vitaminas e minerais atinja os níveis recomendados, a utilização de fortificação de alimentos tem sido realizada (OTTAWAY, 1993).

A fortificação, definida como a adição de um ou mais nutrientes aos alimentos, é uma maneira de corrigir uma deficiência de nutriente, balancear o perfil nutricional de um alimento ou restaurar os nutrientes perdidos no processamento e, assim, suprimir deficiências nutricionais de uma população ou de grupos específicos. A adição de nutrientes é realizada utilizando-se técnicas de fortificação ou enriquecimento, restauração, padronização e suplementação:

- **fortificação e enriquecimento** referem-se especificamente à adição de nutrientes acima do nível normalmente encontrado naquele alimento, a ponto de transformá-lo de fonte boa para fonte superior de nutrientes adicionados. Isso pode incluir a adição de nutrientes que normalmente não estão

associados ao alimento ou a adição de nutrientes já existentes para níveis superiores aos que o alimento processado possui (FENNEMA *et al.*, 2010);

- **restauração** refere-se à substituição de nutrientes cujas perdas não podem ser evitadas durante manuseio, processamento e estocagem dos alimentos (OTTAWAY, 1993);
- **padronização** refere-se à adição de nutrientes a alimentos para compensar variações naturais (OTTAWAY, 1993);
- **suplementação**, um termo mais geral, refere-se à adição de nutrientes os quais não são normalmente contidos naquele alimento ou somente em quantidades diminutas (OTTAWAY, 1993).

A preocupação da sociedade moderna com a saúde física, associada aos novos conceitos de prevenção de doenças crônicas, resulta no aumento na produção e na comercialização de alimentos fortificados. No entanto, na prática de fortificação, devem ser consideradas as formas biologicamente ativas das substâncias, assim como os níveis de toxicidade causados pela ingestão excessiva. Portanto, a adequação da legislação para produtos fortificados torna-se fundamental para que os objetivos nutricionais possam ser alcançados.

No Brasil, a portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, tem como objetivo fixar a identidade e as características mínimas de qualidade dos alimentos adicionados de nutrientes essenciais. Segundo suas definições, considera-se alimento fortificado/enriquecido/adicionado de nutriente “todo alimento ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo ou prevenir ou corrigir deficiência(s)

demonstrada(s) em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma”. E define alimento restaurado ou com reposição de nutrientes essenciais “todo alimento ao qual for(em) adicionado(s) nutriente(s), com a finalidade de repor, quantitativamente, aquele(s) reduzido(s) durante o processamento e/ou armazenamento do alimento”. Sendo considerado nutriente essencial “toda substância normalmente consumida para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e que não é sintetizada pelo organismo ou é sintetizada, porém em quantidade insuficiente”. A portaria permite a sobredosagem dos alimentos para garantir a dosagem especificada na rotulagem, desde que seja justificada tecnologicamente. E ainda estabelece que as características sensoriais e físico-químicas devam obedecer aos padrões de identidade e qualidade dos alimentos.

Os critérios fixados pela portaria 31 para adição de nutrientes essenciais levam em conta aspectos de segurança de consumo, biodisponibilidade e níveis de adição. O nutriente deve estar em concentrações que não impliquem ingestão excessiva ou insignificante do nutriente adicionado, consideradas as quantidades derivadas de outros alimentos da dieta e as necessidades do consumidor a que se destina. A adição do nutriente deve considerar a probabilidade de interações negativas com nutrientes ou outros componentes do alimento. Nos alimentos simplesmente adicionados de nutrientes, a adição de vitaminas e de minerais poderá fornecer no máximo 7,5% da IDR (Ingestão Diária Recomendada) em 100 ml do produto pronto, no caso de alimentos líquidos, e 15% da IDR em 100 g do produto pronto, no caso de alimentos sólidos. Essa adição só poderá ser declarada na lista de ingredientes ou na Tabela de Informação Nutricional, se o alimento fornecer, no mínimo, 5% da IDR por 100 g ou 100 mL do produto pronto para consumo. O

produto poderá conter a alegação “fonte” em seu rótulo se fornecer no mínimo os níveis de IDR estabelecidos para os alimentos simplesmente adicionados de nutrientes. Alimentos enriquecidos/fortificados devem conter, no painel principal do rótulo, a designação do alimento convencional e uma das seguintes expressões: “Enriquecido (Fortificado) com Vitamina(s)...”, “Vitaminado”, “Enriquecido (Fortificado) com Minerais”, “Enriquecido (Fortificado) com Vitaminas e Minerais”, “Enriquecido (Fortificado) com...”, “Rico em... (especificando o nome da(s) vitamina(s) e ou mineral(is)”, “Rico em Minerais”, “Rico em Vitaminas e Minerais”, “Com Vitaminas...” ou “Contém Vitaminas...”. Para os alimentos restaurados, é opcional o uso dos termos “Restaurado com...” ou “Com Reposição de...” (especificando sempre o nutriente adicionado).

As RDA (*Recommended Daily Allowances* – Recomendações Nutricionais Diárias), estabelecidas em 1941, pela Comissão de Alimentos e Nutrição da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos, foram originadas a partir da descoberta de que determinadas doenças ocorriam devido à carência de micronutrientes. As RDA possuíam uma abordagem inicial, que se manteve ao longo das cinco décadas em que foram utilizadas, de evitar a desnutrição e as doenças relacionadas à deficiência de nutrientes. Nos últimos anos, essas recomendações foram reformuladas, objetivando, a partir de então, reduzir o risco de doenças crônicas não transmissíveis, tais como os diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose, demência e doença de Alzheimer. Nesse sentido, durante a década de 1990, foram então estabelecidas as assim denominadas DRI (*Dietary Reference Intakes* – Ingestão Dietética de Referência), sucessoras das RDA, levando-se em conta o conceito de prevenção de doenças crônicas (PENTEADO, 2005).

A Tabela 1.1 traz os valores de IDR (Ingestão Diária Recomendada – termo utilizado no Brasil) para declaração nacional de vitaminas, publicados na Resolução RDC no. 269, de 22 de setembro de 2005.

Tabela 1.1- Valores de IDR utilizados para declaração nutricional pela legislação brasileira

<u>Nutriente</u>	<u>Unidade</u>	<u>IDR</u>
Vitamina A	µg RE*	600
Vitamina D	µg	5
Vitamina C	mg	45
Vitamina E	mg	10
Tiamina	mg	1,2
Riboflavina	mg	1,3
Niacina	mg	16
Vitamina B ₆	mg	1,3
Ácido fólico	µg	240
Vitamina B ₁₂	µg	2,4
Biotina	µg	30
Ácido pantotênico	mg	5
Vitamina K	µg	65

*RE = Retinol

A concentração de micronutrientes expressa em relação a valores de referência apresenta maior significado na rotulagem de alimentos. No formato atual da rotulagem nutricional, o conteúdo de vitaminas é expresso nas porcentagens da IDR, sendo listada em rótulos como “% de valor diário” (FENNEMA *et al.*, 2010).

1.2 Farinha láctea

A farinha láctea é um tipo de mingau desenvolvido por Henri Nestlé. Primeira fórmula de alimento infantil, ela foi lançada há 130 anos, na Suíça, com a intenção de resolver os problemas de desnutrição, muito frequentes em circunstâncias adversas – guerras, agricultura sem produção por mau tempo ou pragas, epidemias combinadas a carnes, leite e seus derivados (http://www.nestle.com.br/site/marcas/farinha_lactea.aspx).

Produzida a partir de cereais hidrolisados e leite, a farinha láctea é muito utilizada nos dias de hoje como parte da dieta de crianças com idade entre 6 meses e 3 anos. O produto é de preparo instantâneo misturado ao leite. A farinha láctea é obtida por um processo de cozimento dos grãos de cereais selecionados, moídos e extrusados, que combina alta temperatura e pressão, sendo submetida à moagem.

Sendo um alimento bastante consumido durante a fase de desenvolvimento da criança, a farinha láctea passa pelo processo de fortificação de nutrientes, incluindo vitaminas e minerais. São adicionadas, de acordo com o rótulo deste produto, as vitaminas lipossolúveis A, D e E e as vitaminas hidrossolúveis B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉, B₁₂ e C.

1.3 Vitaminas

1.3.1 Características gerais

O termo *vitamina*, atualmente uma palavra comum da linguagem cotidiana, surgiu de uma revolução de ideias em torno da inter-relação entre dieta e saúde que ocorreu no começo do século XX. Tal revolução envolveu o surgimento de dois fenômenos que são agora bem entendidos até por leigos no assunto: uma boa dieta possui nutrientes muito importantes e baixos índices de nutrientes específicos podem causar certos problemas à saúde (COMBS, 2008).

Bioquimicamente, vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o funcionamento normal do organismo e agem em pequenas doses. Estes compostos possuem extensa variação nas funções químicas e fisiológicas e se encontram distribuídos em fontes naturais de alimentos. As vitaminas reconhecidas na nutrição humana são normalmente classificadas em dois grupos, de acordo com suas solubilidades. As vitaminas lipossolúveis são: retinóis (A), tocoferóis (E), colecalciferol ou ergocalciferol (D) e filoquinona ou menaquinona (K); também estando incluídos os carotenoides que possuem graus variados da atividade da vitamina A. As hidrossolúveis compreendem o ácido ascórbico (vitamina C) e os membros do grupo B: tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina ou ácido nicotínico e nicotinamida (B₃), piridoxina ou piridoxamina e piridoxal (B₆), ácido pantotênico (B₅), ácido fólico (B₉) e cobalamina (B₁₂). As propriedades de solubilidade refletem a biodisponibilidade das vitaminas, também se relacionam a sua distribuição em vários grupos de alimentos e têm relação direta com os métodos analíticos empregados (BALL, 1998).

A maioria das vitaminas é absolutamente essencial na dieta humana, porque o organismo não é capaz de sintetizá-las. Duas exceções são as vitaminas D e B₃. A síntese cutânea da vitamina D depende de exposição adequada da pele à luz do sol

e a síntese da B₃ depende de uma quantidade suficiente do seu aminoácido precursor, triptofano, ligado a uma proteína. Plantas têm a capacidade de sintetizar vitaminas, exceto a vitamina B₁₂, e servem como fontes primárias desses componentes essenciais (BALL, 1998; PENTEADO, 2005).

1.3.2 Funções bioquímicas e aspectos nutricionais

As vitaminas estão entre os nutrientes requeridos para muitas funções fisiológicas essenciais para a vida. Diferentes de outras classes de nutrientes, as vitaminas não possuem funções estruturais, nem o seu catabolismo fornece energia em quantidade significativa. Em vez disso, as suas diversas utilizações tendem a ser específicas e, por esta razão, as vitaminas são requeridas em quantidades pequenas na dieta (COMBS, 2008).

Embora as vitaminas compartilhem essas características gerais, elas apresentam pouca similaridade química ou funcional. Enquanto várias vitaminas possuem função como cofatores de enzimas (vitaminas A, K, C, B₁, B₃, B₂, biotina, ácido pantotênico, folato e B₁₂), nem todos os cofatores de enzimas são vitaminas (COMBS, 2008). Ocorrendo falta de vitamina, a coenzima não pode ser formada, bloqueando a via metabólica, com consequente acúmulo de substrato e utilização de via metabólica alternativa, provocando desequilíbrio do metabolismo (BALL, 1998).

Algumas vitaminas possuem funções como antioxidantes biológicos (vitaminas E e C) e têm outras várias funções como cofatores em reações metabólicas de oxidação-redução (vitaminas E, K, C, B₃, B₂ e ácido pantotênico). As

vitaminas A e D possuem função hormonal, sendo que a vitamina A também serve como um cofator fotorreceptivo na visão (COMBS, 2008).

Vitaminas hidrossolúveis

A tiamina (vitamina B₁) é fundamental para o metabolismo normal de carboidratos, aminoácidos e ácidos nucleicos. Ela também participa na síntese da acetilcolina, um neuro-transmissor primário (NOLLET, 2004).

As formas ativas conhecidas da tiamina são o éster difosfato e o trifosfato de tiamina. Estes compostos são formados por fosforilação da tiamina pela adenina trifosfato (ATP) em uma reação catalisada pela enzima tiamina pirofosfoquinase (OTTAWAY, 1993).

Os fosfatos de tiamina, com exceção do monofosfato, que é biologicamente inativo, são cofatores em pelo menos 20 reações enzimáticas diferentes envolvidas no metabolismo de carboidratos, gorduras e álcoois (OTTAWAY, 1993).

A vitamina B₂ existe em três formas principais: riboflavina (RF) e suas formas fisiologicamente ativas de coenzimas, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). As coenzimas da vitamina B₂ agem como cofatores ou coenzimas para um arranjo de enzimas respiratórias; a riboflavina é essencial para produção de energia (NOLLET, 2004).

As formas ligadas de FAD e FMN são liberadas das proteínas nas condições ácidas do estômago e hidrolisadas enzimaticamente, no intestino delgado, à

riboflavina livre, que é absorvida por processo de transporte ativo dependente de sódio. O fígado é o principal órgão de estocagem, com até um terço do total de flavinas do organismo, seguido dos rins e do coração, com 70 a 90% da vitamina sendo estocada na forma de FAD. A excreção ocorre, principalmente, através da urina, podendo também ocorrer através da bile e do suor (OTTAWAY, 1993).

A vitamina B₃ (ácido nicotínico ou niacina) age fisiologicamente como um carregador de hidrogênio e como um cofator para um número de deidrogenases. Ela participa em sistemas de oxidação e redução e funciona como um carregador de elétrons na respiração intracelular (NOLLET, 2004).

A importância da vitamina B₃ deve-se ao fato de seus dois vitâmeros (ácido nicotínico e nicotinamida) serem convertidos no organismo a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP). Estes compostos atuam como carreadores de elétrons em grande número de reações de óxido-redução do metabolismo (OTTAWAY, 1993).

De maneira geral, o NAD e o NADP estão envolvidos em reações de liberação de energia dos carboidratos, dos ácidos graxos e dos aminoácidos, bem como na síntese de aminoácidos, ácidos graxos e pentoses e na síntese e no reparo de DNA (OTTAWAY, 1993).

O organismo é capaz de sintetizar niacina a partir do triptofano, sendo necessários 60 mg de triptofano para obtenção de 1 mg de niacina. O triptofano é absorvido no intestino após digestão de proteínas (OTTAWAY, 1993).

A maior parte da vitamina PP, como também pode ser chamada, presente na dieta, está na forma de nicotinamida nucleotídeos, que são hidrolisados, no intestino

delgado, a nicotinamida, absorvida por difusão simples. Após absorção, a nicotinamida é levada ao fígado juntamente com ácido nicotínico e triptofano, onde parte é utilizada e o restante é hidrolisado a amida livre, que é liberada na circulação junto com o ácido nicotínico não metabolizado. Estes compostos são utilizados, pelos tecidos, para síntese intracelular de NAD e NADP. O excesso de niacina é metilado no fígado e excretado pela urina (OTTAWAY, 1993).

O ácido patotênico (vitamina B₅) tem importância na nutrição humana por se incorporar à acetil coenzima A, participando na transferência do grupo acetil e na doação ou na recepção de hidrogênio. A coenzima A funciona como carreadora de grupos acila nas reações enzimáticas envolvidas na síntese de ácidos graxos, esteróis e colesterol; na oxidação de ácidos graxos, piruvato e cetoglutarato; e na acetilação biológica (PENTEADO, 2005). Esta vitamina é fundamental para defesa celular frente às doenças, pois ajuda no funcionamento dos linfócitos B, células responsáveis pela produção de anticorpos (PENTEADO, 2005).

A vitamina B₆ está envolvida na biossíntese e no catabolismo de α -aminoácidos como uma coenzima para as transaminases (aminotransferases) (NOLLET, 2004). A forma ativa da vitamina B₆ é o fosfato de piridoxal ou piridoxal-5-fosfato (PLP) e qualquer forma da vitamina é rapidamente convertida a PLP no organismo, resultando em atividade biológica semelhante para os seis vitâmeros (BALL, 1998; OTTAWAY, 1993). O PLP forma o grupo prostético dos sistemas enzima-coenzima nos processos metabólicos gerais e particularmente no metabolismo de proteínas, sendo necessário para a formação de mais de 60 enzimas (OTTAWAY, 1993).

Quando a vitamina B₆ é ingerida, o ácido gástrico provoca sua dissociação e, já no lúmen intestinal, após hidrólise enzimática, as formas livres da vitamina são absorvidas por processo de difusão passiva no jejuno. A estocagem da vitamina ocorre principalmente no músculo esquelético e o excesso é excretado pela urina como ácido 4-piridóxico, refletindo a utilização metabólica *in vivo* da vitamina B₆ (OTTAWAY, 1993).

A biotina (vitamina H, B₇ ou B₈) tem participação como grupo prostético de enzimas responsáveis por reações de carboxilação (OTTAWAY, 1993). Essas reações ocupam posições-chave em processos bioquímicos vitais, tais como a síntese de ácidos graxos, a glucogênese e o catabolismo de vários aminoácidos de cadeia ramificada (COMBS, 2008).

A vitamina B₉ (ácido fólico ou folato) tem função de carregador de uma unidade de carbono e age como uma coenzima em um número de reações bioquímicas, incluindo a síntese de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas. A habilidade do folato reduzir níveis de homocisteína no plasma e reduzir potencialmente o risco de doenças vasculares e coronárias tem sido estudada, mas a relação exata entre alta ingestão de folato e incidência de apoplexia e doença cardiovascular tem ainda que ser determinada. A associação entre deficiência de folato e risco aumentado de certos cânceres está também sob investigação. A suplementação de folato tem mostrado reduzir a incidência de defeitos no tubo neural para aquelas mulheres que são geneticamente predispostas a esta doença. O mecanismo causador desta doença não está claro (NOLLET, 2004).

A vitamina B₁₂ é conhecida como cobalamina ou fator antianemia perniciosa. As principais cobalaminas em humanos e animais são a hidroxicobalamina, a

adenosilcobalamina e a metilcobalamina, sendo as duas últimas formas coenzimáticas ativas. A cianocobalamina, uma forma sintética da vitamina B₁₂, que é largamente utilizada por sua disponibilidade e estabilidade, é transformada em fatores ativos após ingestão (PENTEADO, 2005).

A vitamina B₁₂ é um importante intermediário no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, sendo essencial para degradação de ácidos graxos e aminoácidos. É encontrada em tecidos animais, que requerem a vitamina para divisão celular e crescimento. Alguns tecidos animais podem estocar a vitamina em quantidades bastante apreciáveis, que são suficientes para suprir as necessidades por longos períodos – até mesmo anos de privação. A vitamina é raramente encontrada em alimentos de origem vegetal, sendo que pessoas que consomem dietas estritamente vegetarianas apresentam, geralmente, ingestão insuficiente de vitamina B₁₂, que, se prolongada e não corrigida, leva à anemia e à neuropatia periférica (PENTEADO, 2005).

A vitamina C, nome genérico dado ao ácido ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel, sintetizada por plantas e por quase todos os animais, exceto os humanos, os primatas, alguns roedores e os pássaros. Assim, para esses, ela deve ser adquirida a partir da dieta (PENTEADO, 2005).

Quando há deficiência prolongada dessa vitamina na dieta dos humanos, pode ocorrer uma doença conhecida como escorbuto. Ela normalmente resulta da falta de frutas frescas que, juntamente com os vegetais verdes, são ricas fontes de vitamina C (PENTEADO, 2005). Essa falta se dá porque, sob condições fisiológicas, o ácido ascórbico é reversivelmente oxidado a ácido deidroascórbico, que, por sua vez, é irreversivelmente hidrolisado para a vitamina inativa, ácido dicetogulônico. Ela

é de grande importância em nutrição, tanto para manutenção da saúde humana, como na indústria de alimentos, na qual é usada como aditivo em alimentos processados. Tanto o ácido ascórbico como o deidroascórbico são substâncias com atividade antiescorbútica, podendo ser envolvidos na prevenção e no tratamento de doenças (PENTEADO, 2005).

O mecanismo bioquímico da vitamina C está ainda sendo observado; entretanto, o sistema redox parece ser a base da atividade fisiológica primária dessa vitamina e suas aplicações técnicas (PENTEADO, 2005).

Vitaminas lipossolúveis

A vitamina A foi a primeira vitamina a ser identificada. É também conhecida como retinol, vitamina anti-infecciosa ou antixeroftálmica. Essa vitamina lipossolúvel só se apresenta em alimentos de origem animal e é encontrada na natureza na forma livre ou esterificada. Nos alimentos de origem vegetal, são encontradas as pró-vitaminas A ou os carotenoides, cujo principal exemplo é o β -caroteno (PENTEADO, 2005).

As vitaminas A têm várias funções, sendo importantes para visão normal, expressão de genes, reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e função imune (PENTEADO, 2005).

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel formada por um grupo de compostos que possuem atividade antirraquitismo, sendo os principais o ergocalciferol (vitamina D₂) e o colecalciferol (vitamina D₃). O ergocalciferol, um esteroide encontrado em

vegetais, é derivado do ergosterol, por ação dos raios ultravioleta. O coлекаlCIFerol é sintetizado pela ação da luz solar sobre a pró-vitamina D₃, o 7-deidrocolesterol, encontrado na pele de animais (BALL 1998; PENTEADO, 2005).

A vitamina D propriamente dita é biologicamente inativa e deve ser metabolizada a 1 α ,25-di-hidroxivitamina D [1 α ,25(OH)₂D], a qual age como um hormônio no controle da homeostase do cálcio e regula o crescimento de vários tipos de célula (BALL, 1998).

As principais funções da vitamina D são a manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo no organismo e a mineralização dos ossos. Essa vitamina também atua em outros tecidos-alvo, não relacionados com a homeostase de cálcio (PENTEADO, 2005).

A vitamina E, assim como outros componentes da dieta (vitamina C, carotenoides, entre outros) tem sido colocada em evidência nas ciências médicas e nutricionais devido ao seu poder oxidativo e consequente aplicação no controle de muitas doenças crônicas. A vitamina E tem despertado maior interesse devido a sua disponibilidade, o forte potencial no mercado, o impacto global na saúde e o papel central na prevenção da oxidação em nível celular (EITENMILLER e LEE, 2004). Embora esta vitamina seja extensivamente estudada quanto às suas funções e metabolismo, alguns afirmam que ainda há muito que se entender quanto ao seu papel fisiológico (PENTEADO, 2005).

A atividade antioxidante da vitamina E é sua função mais divulgada. Diversos estudos em sistemas biológicos já demonstraram os efeitos nocivos dos radicais livres, frequentemente associados ao desenvolvimento de doenças degenerativas como câncer, doença de Alzheimer, artrite e catarata, já que são compostos

altamente reativos e produzidos em diferentes processos no organismo. Além disso, um indivíduo exposto à radiação, a poluentes, a herbicidas, a pesticidas etc., está sujeito à ação de quantidade adicional destes radicais (PENTEADO, 2005).

A vitamina K atua como uma coenzima durante a síntese de várias proteínas envolvidas na coagulação sanguínea e no metabolismo ósseo. A sua descoberta foi casual, devido à ocorrência de hemorragias e lenta coagulação em pintinhos, em 1929, por Henrik Dam. O nome vitamina “K” deriva da palavra “*Koagulation*” (PENTEADO, 2005).

A vitamina K é formada por um grupo de compostos. A filoquinona (vitamina K₁) é de origem vegetal. As menaquinonas (vitamina K₂), formadas por um grupo de compostos com diferentes unidades isoprênicas, são sintetizadas nos animais pelas bactérias e, conseqüentemente, encontradas em carnes, peixes e produtos fermentados. A menadiona (vitamina K₃) não ocorre normalmente na natureza, mas possui atividade em vertebrados, pois é convertida a menaquinona MK-4 por bactérias, sendo biologicamente ativa (PENTEADO, 2005).

1.3.3 Características físico-químicas

Os Quadros 1.1 e 1.2 apresentam o resumo das principais características físico-químicas das vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, respectivamente.

Quadro 1.1 - Características físico-químicas das vitaminas hidrossolúveis (BALL, 1998; PENTEADO, 2005; NOLLET, 2004)

Vitamina	Principais formas	Aspecto físico	Aspecto estrutural	Solubilidade	Observações
B₁	cloridrato de tiamina e mononitrato de tiamina	pó branco ou quase branco, cristalino	Formada por duas moléculas: uma pirimidina substituída e um anel tiazol, ligados por um metileno. Em tecidos animais estão presentes na forma fosforilada.	Solúvel em água, etanol e glicerol.	Em meio alcalino e presença de oxidantes é convertida a tiocromo, composto fluorescente.
B₂	flavina mononucleotídeo (FMN) ou riboflavina-5'-fosfato e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ou riboflavina-5'-adenosil-difosfato	pó cristalino amarelo-alaranjado, com certo odor	Formada por um anel isoaloxazina com uma cadeia ribitol.	Pouco solúvel em água, insolúvel em álcool, clorofórmio e éter.	Devido a baixa solubilidade da riboflavina em água, utiliza-se a riboflavina-5'-fosfato na adição a alimentos.
B₃	ácido nicotínico (niacina) e nicotinamida	substância cristalina em forma de agulhas brancas	Apresentam anel piridínico.	Solúvel em água e etanol. O ácido é insolúvel em acetona e éter dietílico enquanto a amida apresenta leve solubilidade nestes solventes.	Ambos apresentam propriedades básicas e formam sais de amina quaternária em soluções ácidas, e devido ao seu caráter anfótero, o ácido nicotínico em soluções básicas forma sais de ácido carboxílico.

Quadro 1.1 – Continuação

Vitamina	Principais formas	Aspecto físico	Aspecto estrutural	Solubilidade	Observações
B₅	ácido pantotênico e pantotenato de cálcio	O ácido é um óleo viscoso amarelo-claro e o sal é um pó microcristalino incolor.	Composto por um derivado do ácido pantoico (butírico) ligado por uma ligação peptídica ao aminoácido β -alanina.	O sal é bem mais solúvel em água; enquanto o ácido é mais solúvel em solventes orgânicos como acetona, acetato de etila, éter etílico.	O sal de cálcio do ácido pantotênico é a forma mais utilizada como suplemento alimentar.
B₆	piridoxina ou piridoxol (PN), piridoxal (PL), piridoxamina (PM) e os seus fosfatos	pó branco cristalino e inodoro	Todos os vitâmeros são derivados do 3-hidróxi-2-metilpiridina.	Solúvel em água, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em clorofórmio.	O cloridrato de piridoxal é forma utilizada na fortificação de alimentos.
B₈	ácido 2'-ceto-3,4-dimidazolido-2-tetraidrotiofenil valérico	pó branco cristalino	Possui três carbonos assimétricos e oito formas opticamente ativas.	Pouco solúvel em água, mas é mais solúvel em água quente e álcali diluído.	Soluções aquosas são estáveis por vários meses se forem fracamente ácidas ou alcalinas.
B₉	ácido pteroilmonoglutâmico	pó amarelo	Compreende uma pteridina, um ácido para-aminobenzoico e um ácido glutâmico.	Levemente solúvel em água na forma ácida, mas bastante solúvel na forma de sal.	Os folatos estão disponíveis com uma ou mais cadeias laterais: mono-, oligo- e poliglutamatos, juntos conhecidos como folatos totais.
B₁₂	cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina e adenosilcobalamina	sólido cristalino vermelho escuro	A molécula de cobalamina é constituída de um átomo de cobalto central rodeado por anéis substituídos com radicais metil, acetamida e propionamida.	Solúvel em água e pouco solúvel em álcoois, fenol e outros solventes hidroxilados.	Produto sintético utilizado em preparações farmacêuticas devido à sua grande estabilidade.

Quadro 1.2 - Características físico-químicas das vitaminas lipossolúveis (BALL, 1998; PENTEADO, 2005; NOLLET, 2004)

Vitamina	Principais formas	Aspecto físico	Aspecto estrutural	Solubilidade	Observações
A	retinol, acetato e palmitato de retinol	sólido cristalino amarelo	Contém o anel β -ionona ligado a uma estrutura terpênica.	Solúvel em solventes orgânicos: metanol, acetonitrila, álcoois.	Na natureza aparece na forma esterificada. As formas comerciais obtidas por síntese têm melhor estabilidade e solubilidade que o retinol e aparecem na forma de acetato e palmitato.
D	ergocalciferol e colecalciferol	sólido cristalino de coloração branca a amarela.	Possui um anel ciclopentano peridrofenantreno, estrutura derivada do colesterol.	Insolúvel em água e solúvel em óleos e gorduras.	A pró-vitamina D é sintetizada nas glândulas sebáceas, secretada na superfície da pele e se transforma em vitamina D através de absorção de radiação UV.
E	tocoferóis e tocotrienóis	óleo viscoso amarelo-claro, inodoro	Possui um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral de natureza isoprênica, constituída por 16 átomos de carbono.	Insolúvel em água e solúvel em óleos vegetais e solventes orgânicos.	Os diferentes isômeros destes compostos (α -, β -, γ -, δ -) diferem entre si pelo número e pela posição de grupos metil no anel cromanol.
K	filoquinona e menaquinona	óleo viscoso amarelo	Estrutura de naftoquinona, diferindo entre si na cadeia lateral do carbono na posição 3.	Insolúvel em água, solúvel em solventes orgânicos, óleos e gorduras.	Os produtos resultantes da sua redução, as hidronaftoquinonas, são fluorescentes.

1.3.4 Deficiência de vitaminas

De acordo com Combs (COMBS, 2008), “a deficiência de vitamina é a escassez da oferta de uma vitamina relacionada à sua necessidade por um organismo particular”.

Várias são as causas de deficiência de vitaminas: ingestão, absorção ou utilização inadequadas, excreção ou destruição do nutriente.

As doenças associadas com baixa ingestão de vitaminas tipicamente representam manifestações clínicas de uma sequência progressiva de lesões resultantes de perturbações bioquímicas. Assim, os sinais clínicos da deficiência de uma vitamina são, na verdade, o resultado final de uma cadeia de eventos que começa com a diminuição da forma metabolicamente ativa da vitamina em células e tecidos (Figura 1.1) (COMBS, 2008).

Figura 1.1 - Efeitos da ingestão insuficiente de vitaminas (adaptado de COMBS, 2008).

Vitaminas hidrossolúveis

A deficiência de vitamina B₁ (tiamina) em crianças frequentemente causa edema e insuficiência do lado direito do coração, acompanhados de aumento nos batimentos do pulso e da pressão sanguínea. Pode haver mau funcionamento gastrointestinal, com perda de apetite, vômito, diarreia e convulsões (NOLLET, 2004).

A patologia clássica associada à deficiência de tiamina é o beribéri, prevalente no Oriente em populações cuja dieta é baseada em arroz polido. Os sintomas variam com as circunstâncias – idade, dieta, duração e severidade da doença – podendo o beribéri ser classificado em três tipos: seco ou neurítico, úmido ou edematoso e infantil ou agudo (BALL, 1998; OTTAWAY, 1993).

A deficiência da vitamina B₂ ocorre principalmente em indivíduos com dietas nutricionais pobres durante prolongado período de tempo, em casos de anorexia e alcoolismo crônico. Nestes casos, os sintomas podem não ser característicos da deficiência de riboflavina, mas da falta de vários nutrientes na dieta (BALL, 1998; OTTAWAY, 1993; NOLLET, 2004).

Sinais clínicos de deficiência de vitamina B₆ em humanos são raros, pois a vitamina está amplamente distribuída na natureza. Contudo, algumas condições são reconhecidas, nas quais a deficiência relativa dessa vitamina é causada por diversos fatores, tais como formação de complexos inativos entre a vitamina e outras drogas, além de má absorção (NOLLET, 2004).

A pelagra é uma doença nutricional endêmica em comunidades pobres, cuja dieta é baseada em cereais de milho e sorgo, consequência da deficiência da niacina. O prognóstico da doença é dificultado pela má nutrição proteico-energética e por absorção desbalanceada de aminoácidos, com redução da absorção de triptofano e aumento da absorção de leucina. Como a nicotinamida é o componente ativo da NAD e da NADP, coenzimas envolvidas nos sistemas de óxido-redução, sua deficiência resulta em distúrbios fundamentais do metabolismo intermediário, podendo levar à morte (BALL, 1998; PENTEADO, 2005).

A deficiência de vitamina B₆ causa efeitos e manifestações não específicos. Casos graves causam convulsões, neurite periférica, anemia, reações na pele similares às presentes em casos de deficiência de niacina, mal-estar e depressão (BALL, 1998; OTTAWAY, 1993).

Por causa da sua ampla distribuição em alimentos, a deficiência do ácido pantotênico (vitamina B₅) é rara, sendo somente observada em casos de desnutrição severa ou intoxicação etílica. Sua carência pode causar queimação nos calcanhares – que piora com o calor (PENTEADO, 2005).

A deficiência espontânea de biotina ocorre raramente; no entanto, quando condições de deficiência são induzidas experimentalmente, têm-se, como resultado, sérias desordens patológicas. Existem algumas evidências de que a nutrição inadequada de biotina pode ser um fator para morte súbita de crianças. Estudos mostraram que o conteúdo de biotina no fígado de crianças que morreram de causa desconhecida correspondia a aproximadamente 75% do conteúdo de biotina em crianças que haviam morrido de causa conhecida (PENTEADO, 2005).

No caso de deficiência de folato (vitamina B₉), todas as reações do metabolismo do carbono estarão comprometidas em vários graus, dependendo das afinidades relativas das enzimas às respectivas moléculas de folato envolvidas. Quando essas reações são afetadas pela deficiência de folato, vários substratos e intermediários metabólicos vão se acumular e podem ocorrer consequências negativas. Por exemplo, níveis elevados de homocisteína plasmática estão associados ao aumento significativo de risco de

inúmeros tipos de doenças vasculares. Os mecanismos patológicos envolvidos são ainda ativamente debatidos (PENTEADO, 2005).

Clinicamente, a deficiência severa de folato leva a um tipo específico de anemia megaloblástica. Megaloblastos são células grandes, anormais e nucleadas, precursoras dos eritrócitos; sob deficiência de folato, elas se acumulam e são encontradas na medula óssea (PENTEADO, 2005).

A dose ótima de folato necessária para obter proteção contra a má-formação do tubo neural permanece indefinida. Entretanto, o Centro para Controle de Doenças (*Centers for Disease Control*, EUA) recomendou a ingestão de 400 µg/dia. Estes níveis de ingestão devem ser garantidos no momento da concepção e imediatamente depois – um período no qual as mulheres não estão cientes da gravidez. A *Food and Drug Administration* (FDA) ordenou que, desde janeiro de 1998, toda a farinha e todos os grãos de cereais não cozidos nos EUA deveriam ser fortificados até a concentração de 140 µg de ácido fólico por 100 gramas do produto. Estima-se que isso aumente a ingestão diária de folato pelas mulheres, que normalmente ingerem quantidades pequenas de folato dietético, em média 100 µg por dia (PENTEADO, 2005).

A deficiência da vitamina B₁₂ é raramente causada por uma dieta deficiente e mais comumente se origina de um defeito na absorção da vitamina. A deficiência é manifestada por mudanças hematológicas e neurológicas. As manifestações clássicas são a anemia perniciosa, que é uma anemia megaloblástica (caracterizada por glóbulos vermelhos grandes e imaturos) idêntica à observada na deficiência de folato, além de severas e

frequentemente irreversíveis doenças neurológicas. Perdas de memória e demência têm sido observadas. Embora o desenvolvimento da anemia frequentemente preceda a doença neurológica e permita a detecção e o tratamento da deficiência da vitamina B₁₂ antes do desenvolvimento de danos neurológicos, o processo não acontece sempre desta forma e alguns pacientes apresentam doença neurológica na ausência de anemia. Os sintomas neurológicos aparecem em 75 a 90% dos pacientes com deficiência clínica da vitamina (PENTEADO, 2005; NOLLET, 2004).

Na deficiência da vitamina B₁₂, existe perigo de danos neurológicos irreversíveis se suplementos de ácido fólico são ministrados sem a inclusão de vitamina B₁₂, uma vez que os sintomas da anemia podem ser reduzidos pelo tratamento com folato, mas a degeneração nervosa permanecerá. Por esta razão, a suplementação profilática sempre inclui a vitamina B₁₂ e o ácido fólico (PENTEADO, 2005).

A deficiência do ácido ascórbico (vitamina C) causa escorbuto e distúrbios neurológicos, como hipocondria, histeria e depressão. Os sintomas da deficiência da vitamina C desaparecem rapidamente com a administração de doses terapêuticas; estes sintomas incluem hiperqueratose folicular, amolecimento e perda de dentes, gengivas inflamadas, perda de cabelo, secura de boca e olhos, pele seca e dores musculares (BALL, 1998; PENTEADO, 2005).

Vitaminas lipossolúveis

A carência de vitamina A é a principal causa de cegueira nas crianças não escolarizadas nos países em desenvolvimento. O olho é um dos primeiros órgãos a sofrer com a avitaminose A, pois essa vitamina desempenha importante papel nos mecanismos de visão, participando da formação da púrpura retiniana (rodopsina), o receptor da luz de baixa intensidade (visão crepuscular). A falta de vitamina A determina a diminuição na taxa de rodopsina e a visão noturna é alterada (PENTEADO, 2005).

Xeroftalmia ou olho seco é uma doença ocasionada pela falta da vitamina A e é caracterizada pela não produção de lágrimas e por dificuldades de visão, principalmente durante a noite (PENTEADO, 2005).

A deficiência de vitamina D pode resultar de irradiação inadequada na pele, ingestão insuficiente ou falhas na ativação metabólica da vitamina (COMBS, 2008). A necessidade dessa vitamina é dependente da concentração de cálcio e fósforo na dieta, do desenvolvimento fisiológico, da idade, do sexo, do grau de exposição solar e da pigmentação da pele (PENTEADO, 2005).

O aparecimento de doenças, tais como raquitismo em crianças e osteomalacia (enfraquecimento e desmineralização dos ossos) em adultos, é resultado da insuficiência de vitamina D no organismo, que também resulta em absorção intestinal inadequada e reabsorção renal de cálcio e fósforo (PENTEADO, 2005).

A deficiência de vitamina E em humanos não é comum e a ingestão insuficiente na dieta não é o principal fator (EITENMILLER e LEE, 2004). Os principais fatores estão associados à anemia hemolítica (em bebês com peso abaixo de 1.500 g); ao aumento da suscetibilidade dos eritrócitos à hemólise peroxidativa; e à neuropatia (PENTEADO, 2005). Condições envolvendo má absorção de lipídeos pode também levar à deficiência de vitamina E (COMBS, 2008; EITENMILLER e LEE, 2004).

Diversos outros sinais de deficiência de vitamina E já foram verificados em estudos em animais, como necrose no fígado de ratos e porcos, fibrose pancreática em camundongos e frangos e degeneração testicular em porcos, frangos e bezerros (PENTEADO, 2005).

A deficiência da vitamina K é comum em crianças recém-nascidas. A ampla distribuição de vitamina K nos tecidos vegetais e animais e na flora microbológica de intestinos normais contribui para manutenção dos níveis normais de vitamina K em adultos (PENTEADO, 2005).

A deficiência da vitamina K em recém-nascidos pode causar a sua morte. Logo que nascem, os bebês apresentam problemas nos níveis de vitamina K, pois a transmissão dessa vitamina através da placenta é insuficiente. O fígado de recém-nascidos é imaturo para síntese de protrombina; o leite materno tem baixos teores de vitamina K e o intestino é estéril durante os primeiros dias de vida. Devido a esses fatores, o sinal clínico predominante é o desenvolvimento de doenças hemorrágicas dos recém-nascidos (PENTEADO, 2005; COMBS, 2008). Por isso, a administração da vitamina K intravenosa em crianças recém-nascidas tem sido recomendada (PENTEADO, 2005).

O Quadro 1.3 apresenta um resumo dos sintomas associados às deficiências de vitaminas.

Quadro 1.3 - Resumo das doenças e principais sintomas associados à deficiência de vitaminas (BALL, 1998; OTTAWAY, 1993; PENTEADO, 2005)

Doença associada		Principais sintomas
B₁	Beribéri	perda de apetite, distúrbios digestivos, comprometimento cardíaco, fraqueza muscular
B₂	-	lesões nos lábios e canto da boca, dermatite seborreica ao redor do nariz, língua fissurada e com coloração magenta, dermatite na vulva e escroto, problemas oculares
B₃	Pelagra	lesões na boca e lábios, distúrbios gastrointestinais – dor abdominal, estomatite, diarreia e perda de apetite; sintomas neurológicos – depressão, tremor, irritabilidade, ansiedade, delírio.
B₅	-	queimação nos calcanhares
B₆	-	lesões na pele, mal-estar, anemia, convulsões, neurite periférica, depressão
B₉	Anemia megaloblástica	dores abdominais, enjoos e diarreia, desenvolvimento de úlceras na boca e na faringe, cansaço, má formação do tubo neural – nas crianças, o crescimento pode ser retardado e a puberdade atrasada
B₁₂	Anemia perniciosa	perda de memória e demência
C	Escorbuto	amolecimento e perda de dentes, gengivas edemaciadas e inflamadas, queda de cabelos, secura de boca, olhos e pele
A	Xeroftalmia	cegueira noturna, olhos secos, perda de transparência da conjuntiva com mascaramento parcial do sistema vascular, pigmentação fina, difusa e acúmulo de resíduos
D	Raquitismo e osteomalácia	pernas tortas, tronco largo, desmineralização de dentes e dentina
K	-	doenças hemorrágicas

1.3.5 Estabilidade das vitaminas em alimentos

As vitaminas são componentes minoritários dos alimentos e o interesse principal durante o processamento do alimento é minimizar perdas através de processos químicos, como reações de oxidação ou interações com outros componentes. Embora se saiba muito sobre estabilidade e propriedades das vitaminas, o conhecimento de seu comportamento no meio alimentar complexo é limitado (FENNEMA *et al.*, 2010).

Sabe-se que o processamento é de grande importância na conservação de alimentos, principalmente no que diz respeito a sua segurança microbiológica, além de permitir o consumo de produtos sazonais durante todo o ano e possibilitar o transporte dos produtos para lugares distantes da sua área de produção. No entanto, ao ser processado, o alimento é submetido a uma série de fatores que podem afetar a estabilidade dos nutrientes e, conseqüentemente, a composição nutricional do produto (ABRANCHES, 2008).

Os principais fatores que afetam a estabilidade de nutrientes, especialmente das vitaminas, são: temperatura, umidade, presença de oxigênio, luz e pH do meio. A presença de agentes redutores ou oxidantes e de íons metálicos também influencia na estabilidade das vitaminas (ABRANCHES, 2008).

A estabilidade de cada vitamina frente às condições de processamento e estocagem varia muito (Quadro 1.4), com algumas vitaminas muito estáveis,

como a vitamina B₃, até compostos relativamente instáveis, como vitamina C ou B₁₂ (OTTAWAY, 1993).

O uso da irradiação como método de preservação de alimentos é aceito em muitos países e tem vários objetivos: redução da carga microbiana, aumento do tempo de vida do produto, retardando seu amadurecimento, eliminação de insetos, em caso de infestação (OTTAWAY, 1993).

As perdas nutricionais devidas ao processo de irradiação dependem da dose utilizada, enquanto que o comportamento das vitaminas frente à irradiação varia muito, sendo a niacina, a riboflavina e a vitamina D consideradas muito estáveis e as vitaminas A, E e K as mais sensíveis; os resultados obtidos para vitamina C ainda são contraditórios (OTTAWAY, 1993).

O Quadro 1.4 apresenta um resumo da estabilidade das vitaminas diante da exposição a alguns fatores.

Quadro 1.4 – Resumo das condições de estabilidade das vitaminas (OTTAWAY, 1993)

	Calor	Luz (UV)	Oxigênio atmosférico	pH <7 >7		Agentes oxidantes	Agentes redutores	Íons metálicos	Radiação ionizante	Informações adicionais
Vitamina A		i	m i	i				i	i	Suscetível à isomerização
β-caroteno		i	i	i						
Vitamina D		i	i							Suscetível à isomerização
Vitamina E (tocoferóis)	i (na presença de ar)	i							i	Ésteres de vitamina E são muito estáveis
Vitamina K			i (pouco)		i				i	Suscetível à isomerização
Vitamina B₁ (tiamina)	i (em pH alto)				i	i	i		i	
Vitamina B₂ (riboflavina)		m i	m i		i pH alto		i			

i = instável; m i = muito instável

Quadro 1.4 – Continuação

	Calor	Luz (UV)	Oxigênio atmosférico	pH		Agentes oxidantes	Agentes redutores	Íons metálicos	Radiação ionizante	Informações adicionais
				<7	>7					
Vitamina B₃ (niacina)										Normalmente muito estável
Vitamina B₆ (piridoxol)		i								
Ácido pantotênico (como pantotenatos)				i (pH baixo)	i (pH alto)					Os ácidos livres são muito instáveis
Ácido fólico		m i		i (abaixo de pH 5)		I	I			
Vitamina B₁₂ (cianocobalamina)		i		i (pH baixo)	i (pH alto)	I	I			
Biotina		i								
Vitamina C			I	i				m i (Cu e Fe)	i ?	Instável com O ₂ dissolvido nas soluções

i = instável; m i = muito instável

1.3.6 Suplementação e megadoses

Tem se observado grande aumento no interesse da população pelo uso de suplementos e terapias com vitaminas, principalmente devido a evidências de que vitaminas teriam ação protetora contra diversos tipos de doenças crônicas não transmissíveis, tais como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata (PENTEADO, 2005). Além disso, a prática de fortificação de diversos tipos de alimentos, não somente com vitaminas, mas também com outros nutrientes, tem se tornado cada vez mais comum (OTTAWAY, 1993).

A adição de nutrientes requer atenção cuidadosa às regulamentações alimentares, à rotulagem, ao custo, à aceitabilidade do produto pelos consumidores e à avaliação de limitações técnicas e analíticas para o cumprimento das declarações do rótulo (OTTAWAY, 1993).

Como um grupo, as vitaminas são os únicos nutrientes normalmente declarados no rótulo, os quais podem exibir mudanças quantitativas significantes na estocagem, tanto as vitaminas de ocorrência natural quanto aquelas adicionadas para enriquecimento ou fortificação (OTTAWAY, 1993).

Estudos têm sido executados sobre a cinética de degradação de vitaminas em alimentos, na tentativa de prever perdas durante estocagem, mas não há muitas publicações a respeito. Como a composição de cada alimento é diferente, e até mesmo alimentos de composição similar podem diferir em umidade e conteúdo mineral, não é possível contar com previsões gerais sobre a vida de prateleira de vitaminas, e testes controlados de

estocagem têm que ser executados com o produto na embalagem proposta em uma gama de condições de estocagem (OTTAWAY, 1993).

Cada vitamina em um produto irá degradar em velocidade diferente. Para garantir que o conteúdo vitamínico no produto não atinja valores inferiores aos desejados e mencionados no rótulo, é necessário adicionar quantidades superiores às indicadas no rótulo. A diferença entre os níveis declarado e formulado, conhecida como “*overage*”, irá variar de acordo com a estabilidade inerente de cada vitamina, as condições sob as quais o alimento é preparado e embalado e a vida de prateleira do produto (OTTAWAY, 1993).

No entanto, a prática de adição excessiva de vitaminas deve ser realizada de forma atenta e controlada, uma vez que, no caso de indivíduos saudáveis, a ingestão de vitaminas em doses elevadas pode levar a problemas potenciais de saúde, que podem se manifestar na forma de efeitos tóxicos e de interação com outros nutrientes e fármacos, além de interferir em testes laboratoriais (PENTEADO, 2005). Além disso, é importante que o perfil toxicológico de cada vitamina seja estabelecido, pois muito pouco se conhece a respeito dos efeitos da suplementação com essas substâncias em doses acima das recomendações nutricionais. Estabelecendo-se este perfil, é possível avaliar os prós e os contras do uso farmacológico desses micronutrientes (PENTEADO, 2005).

Em relação às vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), que são armazenadas no organismo, o consumo de doses elevadas pode resultar em efeitos tóxicos ao longo do tempo e, inclusive, em morte. Em se tratando de vitaminas hidrossolúveis, que normalmente não se acumulam no organismo,

embora geralmente doses elevadas sejam excretadas na urina, efeitos tóxicos não devem ser descartados. Além disso, o consumo de doses elevadas pode interferir na absorção de outros nutrientes (PENTEADO, 2005). Casos de toxicidade por vitaminas são quase sempre associados ao consumo de suplementos nutricionais. A toxicidade potencial também ocorre a partir de fortificações excessivas e inadvertidas. Casos de intoxicação por vitaminas endógenas dos alimentos são extremamente raros (FENNEMA *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que a hipervitaminose aguda ocorre após a administração de quantidades muito elevadas da vitamina, geralmente em uma dose única. Hipervitaminose crônica, por sua vez, é observada quando a suplementação é realizada com doses de reduzida a moderada concentração por longo período de tempo (PENTEADO, 2005).

Classicamente, a hipervitaminose A causa hepatotoxicidade. A toxicidade dessa vitamina pode ocorrer quando o indivíduo recebe, durante vários meses, doses diárias maiores do que dez vezes a dose diária recomendada (PENTEADO, 2005).

A ingestão excessiva da vitamina A causa uma síndrome tóxica denominada hipervitaminose A, caracterizada por anorexia, alopecia, fadiga, irritabilidade, insônia, gengivite, perda de peso, alterações hepáticas, hemorragia, toxicidade para o sistema nervoso central e coma (PENTEADO, 2005).

Com relação à dosagem, observou-se que a dose diária de 10.000 UI (1 UI de vitamina A equivale a 0,3 µg de retinol) em humanos corresponde à dose inicial capaz de causar teratogenicidade. Estudos epidemiológicos posteriores

em humanos não estabeleceram a dose a partir da qual essa vitamina se torna teratogênica. Entretanto, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, a suplementação não poderia exceder a 3.000 µg/dia (PENTEADO, 2005).

A dose de vitamina D capaz de causar efeitos tóxicos varia muito de um indivíduo para o outro; sugere-se que a ingestão diária continuada de 150.000 UI (1 UI de vitamina D equivale a 0,025 µg de colecalciferol) possa resultar em toxicidade (PENTEADO, 2005).

A maior parte das síndromes acarretadas pela hiperdosagem de vitamina D se deve, provavelmente, a distúrbios do metabolismo do cálcio. Megadoses de vitamina D podem resultar em hipercalcemia e calcificação dos tecidos moles, vômito, náusea, cefaleia, osteoporose, diminuição da função renal e hipertensão (PENTEADO, 2005).

Doses muito acima da RDA de vitamina E podem levar a uma síndrome denominada hipervitaminose E, constada quando da administração de megadoses. Os sintomas observados são: distúrbios gastrointestinais, coagulopatias, hepatotoxicidade, fraqueza muscular e alterações das funções reprodutoras. Doses elevadas podem resultar em redução da agregação plaquetária e alteração da coagulação sanguínea (PENTEADO, 2005).

Com relação às vitaminas hidrossolúveis, sintomas como alterações cardiovasculares, arritmias cardíacas, vômitos, diarreia, desenvolvimento de ataxia, entre outros, estão associados à ingestão excessiva das vitaminas B₁, B₃, B₆, B₁₂ e C (PENTEADO, 2005).

A tiamina apresenta baixa toxicidade quando administrada oralmente em humanos, devido à excreção do excesso pela urina. Entretanto, altas doses parenterais por longo período de tempo podem gerar manifestações clínicas e, em alguns casos, provocar até a morte devido à depressão centrorrespiratória. Apesar desta toxicidade, há larga margem entre teor terapêutico e doses tóxicas (OTTAWAY, 1993).

Não há evidências de efeitos tóxicos causados por altas doses de riboflavina – até 20 mg por dia via oral – provavelmente devido a sua baixa solubilidade e limitada capacidade de absorção intestinal (OTTAWAY, 1993).

Doses de 50 mg a 6 g por dia de vitamina B₆, ingeridas durante vários meses, podem levar a neuropatia periférica, perda de mielina e degeneração de fibras nervosas. Outros sintomas de toxicidade por vitamina B₆ são fotossensibilidade, náuseas e baixa sensibilidade ao toque (OTTAWAY, 1993).

Observou-se que doses de niacina próximas a 100 mg por dia provocam vasodilatação periférica, enquanto doses maiores competem com ácido úrico na excreção, podendo aumentar a incidência de artrite. Doses de 750 mg por dia durante três meses parecem causar danos ao fígado e icterícia (OTTAWAY, 1993).

1.4 Análise de vitaminas em alimentos

Os requisitos básicos de um método analítico são confiabilidade e robustez. Durante a validação, deve ser demonstrado que o analito permanece

estável durante todo processo de extração e que a exatidão e a reprodutibilidade dos resultados obtidos sejam aceitáveis, apresentando baixa incerteza.

A etapa de extração é a mais importante do método e depende da natureza da matriz, da forma de ocorrência da vitamina (natural ou adicionada), das substâncias interferentes presentes e da estabilidade dos vitâmeros. Na maioria dos métodos para vitaminas, são utilizadas hidrólises ácidas ou alcalinas, seguidas ou não de digestão enzimática (BALL, 1998).

Algumas técnicas de purificação de amostra são utilizadas, como desproteinização, extração com solventes, cromatografia em coluna aberta ou em permeação em gel, diálise ou extração em fase sólida (BALL, 1998).

Várias técnicas são aplicadas na análise de vitaminas, sendo a de microbiologia uma das mais tradicionais. A cromatografia em fase gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) tem sido utilizada para determinação das vitaminas B₁, B₃ e B₆, enquanto o maior desenvolvimento tem sido observado na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). Recentemente, métodos utilizando a técnica de eletroforese capilar têm sido desenvolvidos para determinação de vitaminas, além de técnicas bioespecíficas, como radioensaio, radioimunoensaio e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (BALL, 1998).

Métodos microbiológicos para determinação de vitaminas são adequados e disponíveis para todos os alimentos, além de responderem a todos os vitâmeros presentes. As desvantagens são a infraestrutura e os

analistas treinados necessários para sua execução, além de os métodos serem tediosos e propensos a interferentes (OTTAWAY, 1993).

A cromatografia líquida de alta eficiência continua a ser a técnica mais popular para determinação de vitaminas. HPLC em fase reversa é particularmente bem apropriada para separação e quantificação de analitos não voláteis, solúveis ou não em água, tais como as vitaminas.

A literatura contém muitas referências sobre separação e quantificação de vitaminas por HPLC em diversos tipos de matrizes, como formulações farmacêuticas, vários tipos de alimentos e também matrizes biológicas.

As características de hidrofobicidades destes compostos possibilitam o uso tanto da cromatografia em fase reversa como em fase normal, embora a primeira seja mais comumente utilizada.

O Quadro 1.5 apresenta um resumo das condições de análise por HPLC dos métodos encontrados no levantamento bibliográfico realizado.

Quadro 1.5 – Métodos por HPLC utilizados para determinação de vitaminas em alimentos

Vitamina	Matriz	Preparação da amostra	Coluna	Fase móvel	Compostos analisados	Deteção	Referência
A, E	Fórmulas infantis	Extração líquido-líquido com etanol absoluto e n-hexano	C ₁₈ 5 µm, 250 x 4,6 mm	Isocrática, Metanol 100%	Acetato de retinol, δ-, α-, γ-tocoferol e acetato de α-tocoferol	Retinol UV (arranjo de diodos) λ= 325nm, Tocoferóis UV λ= 292 nm	MENDOZA <i>et al.</i> , 2003
A, E	Carne e leite	Extração por fluido supercrítico, seguida de hidrólise alcalina e extração da fração insaponificável com éter de petróleo	RP-18 5 µm, 250 x 4 mm e RP-60 5µm, 250 x 4 mm	Isocrática, Metanol:Água (96:4, v/v)	Retinol, α-tocoferol	Retinol UV (arranjo de diodos) λ= 325nm e fluorescência λ= 325/475 nm, α-tocoferol UV λ= 295 nm e fluorescência λ= 295/330 nm	BERG <i>et al.</i> , 2000
A, D, E	Fórmulas infantis fortificadas	Hidrólise enzimática com takadiastase seguida de hidrólise alcalina com KOH	Nucleosil 100-5, 250 x 4,6 mm	Isocrática, Hexano:Dioxano:2-Propanol (96,3:3:0,3 v/v/v)	All- <i>trans</i> -retinol, ergocalciferol, colecalciferol e α-tocoferol	MS, Retinol <i>m/z</i> 269,1; colecalciferol <i>m/z</i> 367,2; ergocalciferol <i>m/z</i> 379,1; tocoferol <i>m/z</i> 431,2	HEUDI <i>et al.</i> , 2004

Quadro 1.5 – Continuação

Vitamina	Matriz	Preparação da amostra	Coluna	Fase móvel	Compostos analisados	Deteção	Referência
D, E	Leite, suco de fruta e vegetais	Hidrólise alcalina com KOH em etanol e subsequente extração com hexano	C ₁₈ 5 µm, 150 x 4,6 mm	Isocrática, ACN:MeOH (90:10, v/v)	Colecalciferol e ergocalciferol, δ-, α-, γ-tocoferol	UV λ = 265 nm, para todos	BARBA <i>et al.</i> , 2011
A, D, E, K, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉, B₁₂, C	Suplementos e ração	Hidrossolúveis: extração ultrassônica com água. Lipossolúveis: extração ultrassônica com metanol:clorofórmio (1:1)	Hidrossolúveis: Acclaim PA 3 µm, 150 x 3,0 mm. Lipossolúveis: Acclaim C ₁₈ 3 µm, 150 x 3,0 mm.	Hidrossolúveis: Gradiente: A-tampão fosfato 25 mM (pH 3,6); B- ACN:Fase A (7:3, v/v) Lipossolúveis: Gradiente: A-MeOH:ACN(8:2, v/v); B- MTBE	Retinol, acetato e palmitato de retinol, colexcalciferol, ergocalciferol, α-tocoferol e acetato de α-tocoferol, filoquinona, tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido nicotínico, ácido pantotênico, piridoxina, cianocobalamina, ácido fólico e ácido ascórbico	UV (arranjo de diodos), λ _{max} de cada uma	DIONEX, 2010
B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂, B₉, inosina	Fórmulas infantis, cereais infantis	Hidrólise ácida com HCl seguida de hidrólise enzimática com Takadiastase	RP-AmideC ₁₆ 5 µm (Supelco)	Gradiente: A-tampão fosfato 10 mM (pH 6,0); B- ACN grau HPLC	Tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido nicotínico, piridoxol, piridoxal, ácido fólico, cianocobalamina, inosina	UV (arranjo de diodos) em λ = 249, 266, 326, 361 nm	VINÃS <i>et al.</i> , 2003
B₁, B₂	Cereais	Hidrólise ácida com H ₂ SO ₄ , seguida de hidrólise enzimática com diástase, α-amilase e papaína	STAR RP-18e 5 µm, 250 x 4 mm	Isocrática; acetato de 12,5 mM em uma mistura de MeOH:Água (25:75, v/v) mais heptanosulfonato de sódio 2,5 mM	Tiamina, riboflavina	UV em λ = 268 nm	RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2012

Quadro 1.5 – Continuação

Vitamina	Matriz	Preparação da amostra	Coluna	Fase móvel	Compostos analisados	Deteção	Referência
A, E, C, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉	Legumes e vegetais	Extração ultrassônica com acetato de amônio e MeOH, centrifugação e evaporação com nitrogênio. Para as lipossolúveis o resíduo sólido foi re-extraído com acetato de etila em ultrassom sendo levado a centrifugação e evaporação do solvente	Lipossolúveis: YMC C ₃₀ 5 µm, 250 x 4,6 mm. Hidrossolúveis: ACE 100 C ₁₈ 3 µm, 100 x 2,1 mm	Lipossolúveis: gradiente: A- MeOH:Água:TEA (90:10:0,1, v/v/v) e B- MTBE: MeOH:Água:TEA (90:6:4:0,1, v/v/v/v) Hidrossolúveis: A- Acetato de amônio 10 mM, pH 4,5, B- MeOH com 0,1% ácido acético, C- MeOH com 0,3% ácido acético	β-caroteno (provitamina A), α-tocoferol, timina, riboflavina, nicotinamida, pantotenato de cálcio, piridoxina, ácido fólico, ácido ascórbico	Lipossolúveis: UV (arranjo de diodos) λ = 295, 450 nm. Hidrossolúveis: MS/MS	SANTOS <i>et al.</i> , 2012
B₆	Alimentos em geral	Extração em autoclave (121°C por 30 min para alimentos de origem animal e 5 min para vegetais) com HCl, ajuste de pH com acetato de sódio, centrifugação, filtração, hidrólise enzimática “overnight”, adição de HCl, filtração	C ₁₈ 3 µm, 150 x 4,6 mm	Isocrática: Tampão fosfato:ACN (93:7, v/v). Ajuste de pH da fase móvel após saída da coluna pela adição de tampão fosfato.	Piridoxina, piridoxamina, piridoxal	Fluorescência em λ _{exc.} = 333 nm e λ _{em.} = 375 nm	KALL, 2003

1.4.2 Eletroforese capilar na análise de vitaminas

A aplicação da eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) na análise de alimentos possui grande potencial (FRAZIER e PAPADOPOULOU, 2003; VALLEJO-CORDOBA E GONZÁLEZ-CÓRDOVA, 2010; YOSHIKAWA *et al.*, 2011; HERRERO *et al.*, 2010). Em suas diversas modalidades a eletroforese capilar oferece alta resolução e alta eficiência de separação. Estas propriedades permitem separar, por esta técnica, componentes variados de amostras em uma única corrida. Estes fatores, aliados à rapidez, à facilidade de automação e ao baixo consumo de solventes, fornecem à eletroforese capilar vantagem considerável sobre as técnicas tradicionais. Por esta razão, a eletroforese capilar tem sido introduzida como metodologia alternativa ou complementar à HPLC e à GC em diversas aplicações.

Muitos trabalhos com desenvolvimento analítico para determinação de vitaminas utilizam eletroforese capilar. No entanto, a maioria dos trabalhos apresenta aplicação em matrizes pouco complexas como medicamentos. Devido à deficiência de métodos validados e aplicados a matrizes alimentícias, comparados a outras aplicações, a análise de vitaminas em alimentos é pouco citada em artigos de revisão desta técnica. O desafio encontrado é detectar os baixos teores de vitaminas nas diferentes matrizes de alimentos. Diferentes estratégias podem ser aplicadas com a finalidade de aumentar a detectabilidade das vitaminas, como detecção por fluorescência, espectrometria de massas, métodos de pré-concentração *online*, entre outras.

Há trabalhos na literatura que utilizam ambas as modalidades de eletroforese: eletroforese capilar por zona (CZE) e cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).

A MEKC apresenta vantagens em relação à CZE, principalmente devido às propriedades heterogêneas das vitaminas, no que diz respeito às suas cargas e hidrofobicidades. Assim, a interação diferenciada das vitaminas com as micelas, adicionada aos efeitos eletrocinéticos, apresenta-se como um fator positivo na seletividade destes analitos. Alguns trabalhos encontram aplicações em amostras de sucos e refrigerantes e somente poucas em amostras de alimentos sólidos.

O Quadro 1.6 traz uma compilação da aplicação de métodos por eletroforese capilar para análise de vitaminas.

Quadro 1.6 – Métodos de análise de vitaminas por eletroforese capilar

Vitamina	Matriz	Preparação da amostra	Modalidade	Eletrólito	Compostos analisados	Deteção	Referência
A, D, E	Formulações farmacêuticas	Extração ultrassônica com metanol, centrifugação, evaporação do solvente	MEKC	Borato - 80 mmol L ⁻¹ , SDC - 60 mmol L ⁻¹ , AOT - 20 mmol L ⁻¹ , Brij 35 - 2 mmol L ⁻¹ (pH 8,5)	Palmitato de retinol, ergocalciferol, α-tocoferol	UV (arranjo de diodos) em λ = 290 nm	LIU <i>et al.</i> , 2010
A, D, E, K, B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂, C	Padrões	-	MEEKC	Borato – 40 mmol L ⁻¹ (pH 8,5), SDS - mmol L ⁻¹ , octano 1% (v/v), butanol 5% (v/v) e propanol 15% (v/v).	Palmitato de retinol, colecalciferol, acetato de α-tocoferol, tiamina, riboflavina fosfato, nicotinamida, piridoxina, cobalamina, ácido ascórbico	UV em λ = 254 nm	SÁNCHEZ e SALVADÓ, 2002
B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, C	Formulações farmacêuticas	Dissolução em solução de NaOH, homogeneização, filtração	MEKC	Tampão fosfato-borato 20 mmol L ⁻¹ (pH 9,0), SDS 50 mmol L ⁻¹	Tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido nicotínico, piridoxina, ácido fólico, ácido ascórbico	UV (arranjo de diodos) em λ = 265 nm	GOMIS <i>et al.</i> , 1999
B₁, B₂, B₃, B₆	Bebida enriquecida com vitamina	Diluição em tampão borato pH 8,0	MEKC	Tampão borato (pH 8,0), SDS 150 mmol L ⁻¹	Tiamina, riboflavina fosfato, nicotinamida, piridoxina	UV (arranjo de diodos) em λ = 210 nm	OKAMOTO <i>et al.</i> , 2003
B₃, B₆, C	Formulações farmacêuticas e bebidas (um tipo de bebida saudável)	Dissolução no eletrólito de corrida	MEKC	Tampão fosfato 20 mmol L ⁻¹ – tampão borato 5 mmol L ⁻¹ (pH 8,8) contendo SDS 30 mmol L ⁻¹	Nicotinamida, piridoxina, ácido ascórbico	Amperométrica	HU <i>et al.</i> , 2001

Quadro 1.6 – Continuação

Vitamina	Matriz	Preparação da amostra	Modalidade	Eletrólito	Compostos analisados	Deteção	Referência
B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₈, B₉, B₁₂, C	Milho	A amostra foi incubada em metanol (-20°C) por 30 min. Foi centrifugada e o sobrenadante filtrado e evaporado. O resíduo foi reconstituído em 1 mL de água deionizada	CEC (coluna monolítica de sílica-ODS)	Tampão fosfato 4 mmol L ⁻¹ (pH 2,5) em água:MeOH (74:26, v/v)	Tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, nicotinamida, pantotenato de cálcio, piridoxina, piridoxal, piridoxamina, biotina, ácido fólico, cianocobalamina, ácido ascórbico	UV em λ = 210 nm	JIA <i>et al.</i> , 2007
B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂, C	Formulações farmacêuticas	Dissolução em água ultrapurificada	MEKC	Tampão borato 20 mmol L ⁻¹ (pH 8,0), SDS 50 mmol L ⁻¹	Tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, cianocobalamina, ácido ascórbico	UV (arranjo de diodos) em λ = 214 nm	SIMIONATO <i>et al.</i> , 2007
E	Óleo vegetal	Dissolução em hexano, seguida de SPE em cartucho de sílica, sem condicionamento. Eluição dos tocoferóis com dietil éter, evaporação com N ₂ , sendo o resíduo tratado com eletrólito:hexano:etanol (60:20:20, v/v/v), seguindo para agitação e centrifugação	NACE	Tampão borato 12 mmol L ⁻¹ , colato de sódio 60 mmol L ⁻¹ , NaOH 12 mmol L ⁻¹ em metanol	α -, β -, γ - e δ -tocoferol	UV (arranjo de diodos) em λ = 200 nm. Fluorescência em $\lambda_{exc.}$ = 297 nm e $\lambda_{em.}$ = 320 nm	GALEANO-DÍAZ <i>et al.</i> , 2012
B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂, C e E	Formulações comerciais	Dissolução em 2-propanol e diluição com tampão da microemulsão, seguida de sonicação por 30 min e filtração em papel de filtro	MEEKC	82,7% (m/m) de tampão tetraborato 10 mmol L ⁻¹ (pH 9,2), 15%(v/v) de 2-propanol, 0,6% de SDS, 1,2% (m/m) de 1-butanol, 0,5% (m/m) de acetato de etila	Tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, ácido fólico, cobalamina, ácido ascórbico e acetato de α -tocoferol	UV em λ = 214 nm	AURORA-PRADO <i>et al.</i> , 2010

2 JUSTIFICATIVA

Como mencionado anteriormente, a adição de vitaminas aos produtos industrializados tornou-se prática comum para as indústrias de alimentos. No entanto, os teores adicionados devem obedecer à legislação durante toda a vida de prateleira dos produtos. Sabendo da sensibilidade das vitaminas a fatores como oxigênio, luz e calor, é essencial conhecer o comportamento destes compostos no alimento frente aos fatores críticos. Informações confiáveis sobre teores de vitaminas somente podem ser obtidas com métodos analíticos validados.

A fim de garantir que os produtos oferecidos aos consumidores atendam a legislação vigente e não ofereçam riscos à saúde da população, tornam-se necessários o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para determinação do teor de vitaminas nos alimentos, eventuais perdas durante o processamento, bem como o conhecimento destes teores durante toda a vida de prateleira do produto. Os métodos de análise devem ser confiáveis e robustos, reprodutíveis, seletivos e exatos, além de serem capazes de extrair e identificar todos os seus vitâmeros.

Como não há trabalhos na literatura sobre a determinação de vitaminas em farinha láctea, propõe-se a investigação do conteúdo vitamínico neste tipo de amostra. Devido às características de solubilidade em água e formação de espécies com cargas das vitaminas hidrossolúveis, elas se tornam facilmente acessadas pela técnica de eletroforese capilar. No caso das lipossolúveis, por

se tratarem de compostos hidrofóbicos, a determinação se torna mais simplificada por cromatografia líquida em fase reversa.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é desenvolver e aplicar metodologia de análise de conteúdos vitamínicos em amostras de farinha láctea, utilizando, como técnicas analíticas a eletroforese capilar, para determinação das vitaminas hidrossolúveis e a cromatografia líquida de alta eficiência, para determinação das vitaminas lipossolúveis.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, M.V.; DELLA LUCIA, C.M.; SARTORI, M.A.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Perdas de vitaminas em leite e produtos lácteos e possíveis medidas de controle. *Alimentos e Nutrição*, v. 19, p. 207-217, 2008.
- AURORA-PRADO, M.S.; SILVA, C.A.; TAVARES, M.F.M.; ALTRIA, K.D. Rapid determination of water-soluble and fat-soluble vitamins in commercial formulations by MEEKC. *Chromatographia*, v. 72, p. 687-694, 2010.
- BALL, G. Bioavailability and analysis of vitamins in foods. London: Chapman & Hall, 1998.
- BARBA, F.J.; ESTEVE, M.J. Determination of vitamins E (α-, γ- and δ-tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage. *European Food Research and Technology*, v. 232, p. 829-836, 2011.
- BRASIL. Portaria no. 31, de 13 de janeiro de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde.
- BRASIL. Resolução RDC no. 269, de 22 de dezembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova regulamento técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. *Diário Oficial da União*, Brasília.
- BERG, H.; TURNER, C.; DAHLBERG, L. Determination of food constituents based on SFE: applications to vitamins A and E in meat and milk. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 43, p. 391-491, 2000.
- COMBS, G.F. *The Vitamins - Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. New York, USA. Academic Press: 2008.
- DIONEX CORPORATION. Application Note 251. Determination of water- and fat-soluble vitamins in nutritional supplements by HPLC with UV detection. Sunnyvale, CA, 2010.

- EITENMILLER, R.; LEE, J. Vitamin E - Food Chemistry, Composition, and Analysis. New York, USA. Marcel Dekker: 2004.
- FENNEMA, O.R; DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L. Química de Alimentos de Fennema. São Paulo, SP. Artmed, 2010.
- FRAZIER, R.A.; PAPADOPOULOU, A. Recent advances in the application of capillary electrophoresis for food analysis. *Electrophoresis*, v. 24, p. 4095-4105, 2003.
- GALEANO-DÍAZ, T.; ACEDO-VALENZUELA, M.I.; SILVA-RODRÍGUEZ, A. Determination of tocopherols in vegetable oil samples by non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) with fluorimetric detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 25, p. 24-30, 2012.
- GOMIS, D.B.; GONZÁLEZ, L.L.; ÁLVAREZ, D.G. Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of water-soluble vitamins. *Analytica Chimica Acta*, v. 396, p. 55-60, 1999.
- HERRERO, M.; SIMÓ, C.; GARCÍA-CAÑAS, V.; FANALI, S.; CIFUENTES, A. Chiral capillary electrophoresis in food analysis. *Electrophoresis*, v. 31, p. 2106-2114, 2010.
- HEUDI, O.; TRISCONI, M.J.; BLAKE, C.J. Simultaneous quantification of vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1022, p. 115-123, 2004.
- HU, Q.; ZHOU, T.; ZHANG, L.; LI, H.; FANG, Y. Separation and determination of three water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations and food by micellar electrokinetic chromatography with amperometric electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 437, p. 123-129, 2001.
- JIA, L.; LIU, Y.; DU, Y.; XING, D. Pressurized capillary electrochromatographic analysis of water-soluble vitamins by combining with on-line concentration technique. *Journal of Chromatography A*, v. 1154, p. 416-422, 2007.

- KALL, M.A. Determination of total vitamin B6 in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. *Food Chemistry*, v. 82, p. 315-327, 2003.
- LIU, Q.; JIA, L.; HU, C. On-Line concentration methods for analysis of fat-soluble vitamins by MEKC. *Chromatographia*, v. 72, p. 95-100, 2010.
- MENDOZA, B.R.; PONS, S.M.; BARGALLÓ, A.I.C.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, v. 1018, p. 197-202, 2003.
- NESTLÉ: http://www.nestle.com.br/site/marcas/farinha_lactea.aspx. Acessado em janeiro de 2013.
- NOLLET, L.M.L. *Handbook of Food Analysis*. New York, USA: Marcel Dekker, 2004.
- OKAMOTO, H.; NAKAJIMA, T.; ITO, Y. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in a vitamin enriched drink by an in-capillary enzyme reaction method. *Journal of Chromatography A*, v. 986, p. 153-161, 2003.
- OTTAWAY, P.B. *The Technology of vitamins in food*, 1 ed. London; New York, NY: Blackie Academic & Professional, 1993.
- PENTEADO, M.D.V.C. *Vitaminas: Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. Barueri, SP: Manole, 2005.
- RODRIGUEZ, RSJ.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M.; SÁNCHEZ-MATA, M.C. Simultaneous determination of vitamin B1 and B2 in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV. *Journal of Cereal Science*, v. 55, p. 293-299, 2012.
- SÁNCHEZ, J.M.; SALVADÓ, V. Comparison of micellar and microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of water- and fat-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*, v. 950, p. 241-247, 2002.

- SANTOS, J.; MENDIOLA, J.A.; OLIVEIRA, M.B.P.P.B.; IBÁÑEZ, E.; Herrero, M. Development of a HPLC-DAD- MS/MS method for simultaneous determination of fat- and water- soluble vitamins in green leafy vegetables. *Journal of Chromatography A*, v.1261, p. 179-188, 2012.
- SIMIONATO, A.V.C.; LANÇAS, F.M.; RUGGIERO, M.A. Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography in pharmaceutical samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 29, p. 349-363, 2007.
- VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F. Capillary electrophoresis for the analysis of contaminants in emerging food safety issues and food traceability. *Electrophoresis*, v. 31, p. 2154-2164.
- VINÃS, P.; LÓPEZ-ERROZ, C.; BALSALOBRE, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods. *Journal of Chromatography A*, v. 1007, p. 77-84, 2003.
- YOSHIKAWA, K.; SAITO, S.; SACURAGAWA, A. Simultaneous analysis of acidulants and preservatives in food samples by using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry*, v. 127, p. 1385-1390, 2011.

CAPÍTULO 2 – ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DE VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS EM FARINHA LÁCTEA POR ELETROFORESE CAPILAR

1 INTRODUÇÃO

As vitaminas hidrossolúveis constituem um grupo diverso de compostos que desempenham atividades vitais no organismo humano e possuem diferentes graus de solubilidade em água. Elas devem ser obtidas de fontes exógenas, pois sua ausência da dieta resulta em problemas potenciais de saúde. Estas vitaminas estão presentes em diversos tipos de alimentos, como grãos integrais, vegetais folhosos, ovos, frutas em geral, óleo de soja, legumes entre outros (NOLLET, 2004). As estruturas das vitaminas hidrossolúveis estudadas estão ilustradas na Figura 2.1. Em seguida, na Tabela 2.1, são apresentadas algumas propriedades destes compostos.

Figura 2.1 - Estruturas das vitaminas hidrossolúveis estudadas

Tabela 2.1 – Propriedades de acidez e solubilidade das vitaminas hidrossolúveis

Vitamina	pKa	LogP *	LogS **
B ₁	5,54	-2,1	-4,3
	15,5		
B ₅	-2,8	-1,1	-0,56
	4,35		
B ₃	2,79	0,36	-0,84
	4,19		
B ₆	5,58	-0,57	-1
	9,4		
B ₂	0,68	-0,78	-2,8
	1,57		
B ₉	2,09	-0,04	-3,8
	3,37		
B ₁₂	1,84	1,87	-4,5
	8,77		
C	-3,0	-1,6	0,14
	4,36		
B ₈	-1,9	0,17	-2,3
	4,4		

* P é definido como a razão das concentrações de um composto nas fases orgânica e aquosa de um sistema formado por octanol-água em condições de equilíbrio. É um descritor quantitativo da hidrofobicidade.

**S é a solubilidade do composto em água.

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais popular para determinação das vitaminas. Contudo, a eletroforese capilar está, cada vez mais, ampliando seu campo de aplicação na determinação destes compostos. Algumas vantagens desta técnica tornam-na cada vez mais popular no campo da pesquisa e também da indústria, como a alta eficiência na separação com

baixo consumo de reagentes e solventes, a rapidez consideravelmente maior em relação às separações cromatográficas, o alto poder de resolução e as diferentes modalidades, permitindo a determinação de diferentes espécies químicas em diversas matrizes (SALVADÓ e SÁNCHEZ, 2002).

Alguns trabalhos relatam a determinação de vitaminas hidrossolúveis utilizando CE em diferentes modalidades. A separação de sete vitaminas por CZE foi acessada utilizando-se como eletrólito de corrida tampão teataborato em pH 9,2, com tempo de análise inferior a 10 min (FRANCO *et al.*, 2012). Rápidos métodos para separação simultânea de quatro vitaminas do grupo B foram desenvolvidos por CZE e MEKC (BOONKERD *et al.*, 1994). O eletrólito em CZE era constituído de tampão borato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,0). A separação por MEKC foi estabelecida com acetonitrila 13% (v/v) em tampão borato 20 mmol L⁻¹ (pH 7,0) contendo 100 mmol L⁻¹ de SDS. Os dois métodos apresentaram separação satisfatória. Tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,0) foi eficiente na separação de cinco vitaminas do grupo B, em curto tempo de análise (HUOPALAHTI e SUNELL, 1993). Todos os métodos mencionados foram aplicados em formulações farmacêuticas.

Embora CZE apresente grande aplicação na determinação de vitaminas hidrossolúveis, métodos por MEKC são maioria nos trabalhos da literatura. Quatorze vitaminas e cofatores foram separados por meio micelar. O eletrólito otimizado era composto por tampão fosfato 100 mmol L⁻¹, 500 mmol L⁻¹ de taurina, 75 mmol L⁻¹ de colato de sódio e 2% (v/v) de 1-propanol (pH não ajustado). A separação dos analitos foi alcançada em 25 minutos e foi aplicada a amostras de suco de laranja e polivitamínicos em comprimido (BUSKOV *et*

al., 1998). A separação da vitamina C e duas do grupo B foi alcançada através de meio micelar (HU *et al.*, 2001). O eletrólito de corrida consistiu de tampão fosfato (20 mmol L^{-1}) e borato (5 mmol L^{-1}) pH 8,8 contendo 30 mmol L^{-1} de SDS. A análise foi realizada com detecção amperométrica e aplicada em formulações farmacêuticas e bebidas comerciais.

Também por MEKC, cinco vitaminas do grupo B além do ácido ascórbico foram determinadas em formulações farmacêuticas (SMIONATO *et al.*, 2007). A separação foi obtida em meio contendo tampão borato 20 mmol L^{-1} (pH 9,0) e SDS 50 mmol L^{-1} .

No entanto, nota-se que a maior parte dos trabalhos é aplicada em análise de produtos farmacêuticos. Em alimentos, a determinação de vitaminas hidrossolúveis é pouco demonstrada, principalmente devido à baixa detectabilidade da maioria das vitaminas em matrizes complexas. A baixa detectabilidade em CE, devido ao pequeno volume de amostra injetado e o reduzido caminho óptico do capilar (50 e $75 \text{ } \mu\text{m d. i.}$), tem sido uma limitação para análise de compostos em baixas concentrações em alimentos por detecção UV. Por isso, um tratamento de amostra eficiente deve incluir a eliminação de interferentes (*clean up*) e uma etapa de pré-concentração.

A aplicação de metodologias de análise em amostras de farinha láctea não está registrada na literatura. Oito vitaminas hidrossolúveis são adicionadas neste tipo de alimento. Propõe-se, neste trabalho, um método de separação para essas oito vitaminas (B_1 , B_2 , B_3 , B_5 , B_6 , B_9 , B_{12} e C), além da vitamina B_8 , utilizando meio micelar (MEKC). A modalidade CZE possibilita separar apenas poucas moléculas dessa classe, principalmente porque algumas delas são

neutras em determinados pHs. MEKC permite alcançar a separação de maior número destes compostos.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram desenvolver uma metodologia de análise para as vitaminas hidrossolúveis por eletroforese capilar utilizando meio micelar (MEKC) e avaliar a composição vitamínica em amostras de farinha láctea.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Soluções e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água deionizada foi purificada pelo sistema MilliQ[®] da marca Millipore (modelo Direct-quantum TMEX – Bedford, MA, USA).

Os padrões de vitaminas utilizados foram: hidrocloreto tiamina, riboflavina 5-fosfato, ácido nicotínico, pantotenato de cálcio, hidrocloreto de piridoxina, biotina, ácido fólico, cianocobalamina e ácido ascórbico. Todos os padrões foram obtidos da Sigma Aldrich (P. A., São Paulo, Brasil), com alto grau de pureza. As soluções estoques dos padrões foram preparadas na concentração de 1.000 mg L⁻¹, sendo os padrões dissolvidos em água.

O eletrólito foi preparado diariamente, pela diluição das soluções estoques de 100 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio (TBS) e 100 mmol L⁻¹ de dodecilsulfato de sódio (SDS), sendo o primeiro obtido da Riedel-De Haën (Alemanha) e o segundo da Merck (Darmstadt – Alemanha). Metanol grau HPLC (marca J. T. Backer, Xalostoc, México) também foi utilizado no preparo do eletrólito. O eletrólito otimizado era composto de 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de Metanol.

Acetonitrila (ACN) e tetraidrofurano (THF), ambos da marca J. T. Backer (Xalostoc, México), foram testados na otimização do eletrólito de separação.

O composto ibuprofeno de sódio (Sigma Aldrich, P.A., São Paulo, Brasil) foi utilizado como padrão interno. A solução estoque foi preparada na concentração de 100 mg L^{-1} , através de dissolução em água.

3.2 Instrumentação

A otimização da separação foi realizada em um equipamento de eletroforese capilar da *Beckman Coulter Inc. (Fullerton, CA, USA)* modelo PACE/MDQ, equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD), ajustado em 200, 254 e 270 nm, e um dispositivo de controle de temperatura, ajustado em 22°C por circulação de líquido refrigerante. Um *software* de aquisição e tratamento de dados (32 KaratTM software v 8.0) foi utilizado para análise dos dados. No desenvolvimento do método, os padrões foram introduzidos no capilar (pelo *inlet*) através de injeção hidrodinâmica, aplicando 0,5 psi por 3 s (1 psi = 6894,76 Pa). O instrumento foi operado sob polaridade positiva (injeção) com tensão constante de + 20 kV.

Capilares de sílica fundida, com dimensões de 75 μm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) revestidos com poliimida (*Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA*), foram utilizados nas análises. O condicionamento inicial do capilar foi efetuado através de lavagem com solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (20 psi/30 min) e água deionizada (20 psi/20 min). O condicionamento do capilar no início de cada dia foi realizado através de lavagem com solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (20 psi/5 min), água deionizada (20 psi/2 min) e eletrólito (20

psi/20 min). O condicionamento entre corridas consistiu de lavagem com eletrólito (20 psi/2 min).

3.3 Preparo de amostra

Amostras de farinha láctea foram adquiridas de mercado local e armazenadas sobre refrigeração. Uma amostra de farinha isenta de vitaminas foi obtida por doação da Nestlé Brasil Ltda. Dois métodos foram utilizados para extração das vitaminas, o primeiro para vitamina C e o segundo para as vitaminas do grupo B:

Método 1 – Dez mililitros de água deionizada foram adicionados a 1 g de farinha láctea. Após 5 min de homogeneização através de vortex, a mistura foi centrifugada a 15.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi recolhido para injeção no sistema de eletroforese capilar.

Método 2 – (Adaptado de LIU *et al.*, 2010) Uma massa de 0,4 g de farinha láctea foi homogeneizada em 2 mL de metanol através de vortex por 5 min. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido para evaporação sob fluxo de N₂. O resíduo foi ressuspenso com 100 µL de água deionizada para injeção no sistema de eletroforese capilar.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização da separação por CE

Inicialmente verificou-se o comportamento das nove vitaminas por CZE, sendo o eletrólito de partida composto por tetraborato de sódio (20 mmol L^{-1}) pH 9,2 (Figura 2.2). Através desta corrida, é possível ter ideia sobre a mobilidade das vitaminas no meio eletroforético.

Figura 2.2 – Eletroferograma resultante do teste inicial com CZE. Eletrólito de corrida: 20 mmol L^{-1} de TBS (pH 9,2). Tensão: +20 kV. Injeção: 0,5 psi/ 3 s. Detecção direta: 200 nm. Concentração das vitaminas: 25 mg L^{-1} , exceto vitamina B_5 (50 mg L^{-1}). Identificação dos picos: 1- tiamina (B_1), 2- cianocobalamina (B_{12}), 3- piridoxina (B_6), 4- biotina (B_8), 5- riboflavina (B_2), 6- pantotenato de cálcio (B_5), 7- ácido ascórbico (C), 8- niacina (B_3), 9- ácido fólico (B_9).

Observa-se que a vitamina B₁₂ (pico 2) migra junto com o fluxo eletrosmótico (eof), indicando que, neste pH, ela apresenta-se neutra. Além disso, observa-se a comigração de dois pares de vitaminas, B₆/B₈ (picos 3 e 4) e B₅/B₂ (picos 6 e 5). Cada par apresenta similaridade de carga (apresentam-se negativamente carregadas neste pH) e de raio, o que faz com que a mobilidade eletroforética não seja diferenciada. A identificação dos picos foi realizada através da injeção de cada padrão individualmente nas mesmas condições eletroforéticas anteriores, obtendo-se, assim, o espectro UV-Vis, na região de 200 a 300 nm (Figura 2.3).

Em CZE, os compostos neutros migram por ação exclusiva do fluxo eletrosmótico. A introdução de agentes tensoativos no eletrólito de separação, em condições apropriadas à formação de micelas, torna possível a migração diferenciada dos analitos neutros, ocasionada pelo mecanismo de partição entre a fase aquosa e a fase micelar, que se dá de forma diferente para cada composto (TAVARES, 1997). Neste sentido, a próxima etapa foi verificar a influência da adição de micelas na seletividade da separação eletroforética.

O tensoativo mais utilizado na literatura para separações de vitaminas por MEKC é o SDS. Logo, um teste preliminar foi realizado com a presença de 30 mmol L⁻¹ de SDS no meio de separação (20 mmol L⁻¹ de TBS, pH 9,2). No entanto, como pode ser observado na Figura 2.4, este eletrólito não proporcionou a separação das nove vitaminas estudadas.

Figura 2.3 – Espectros de absorção no UV-Vis das vitaminas estudadas

Figura 2.4 – Eletroferograma referente ao primeiro teste por MEKC. Eletrólito: 20 mmol L⁻¹ de TBS e 30 mmol L⁻¹ de SDS (pH 9,2). Demais informações ver Figura 2.2.

É possível observar o atraso da vitamina B₁₂ (pico 2), que em CZE migrava com o fluxo. Isto indica a interação desta vitamina com a micela, sendo sua velocidade uma combinação da mobilidade do soluto sozinho e do soluto com a micela.

Outro efeito bastante visível é o deslocamento da vitamina B₁ (pico 1) em relação a CZE. Já que possui carga positiva, possivelmente ocorre interação eletrostática entre a vitamina e a micela, que possui superfície negativamente carregada.

No entanto, essa condição não promove a separação de todas as vitaminas. As vitaminas B₆ e B₈ (picos 3 e 4), assim como B₂ e B₅ (picos 5 e 6) ainda não estão resolvidas. Possivelmente a interação com a micela não se dá pela hidrofobicidade. Uma vez que, pelos valores de logP na Tabela 2.1, as hidrofobicidades destas vitaminas apresentam-se diferenciadas.

Para prosseguir com o estudo da separação das vitaminas, foi realizada uma avaliação da influência da concentração de SDS. Para isso, manteve-se a concentração de TBS em 20 mmol L^{-1} e variou-se a concentração de SDS de 20 a 50 mmol L^{-1} . O resultado pode ser observado na Figura 2.5.

Figura 2.5 – Avaliação da influência da concentração de SDS na separação das vitaminas. Demais condições idênticas à Fig. 2.2.

Uma inspeção nas estruturas das vitaminas hidrossolúveis utilizadas mostra que apenas a B₁ apresenta carga positiva sendo um sal quaternário de amônio em pH 9,2 (pKas 15,5 e 5,54). A vitamina B₆ tem estrutura fenólica em anel piridínico e apresenta pKas de 5,58 e 9,4 (<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00165>), apresentando portanto quantidades apreciáveis da espécie neutra e aniônica em pH 9,2. A vitamina C que apresenta estrutura enólica (pKa -3 e 4.6) está totalmente negativa neste pH. As demais vitaminas são compostos derivados de ácidos carboxílicos ou do ácido fosfórico, também negativas nas condições de trabalho. A Tabela 2.2 mostra os tempos de migração com e sem SDS.

Tabela 2.2 – Tempos de migração das vitaminas e micela para fins de estudo da retenção

Concentração de SDS (mmol L ⁻¹)	Tempos de migração para as vitaminas e a micela (minutos)									
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	B ₈	B ₉	B ₁₂	C	t ₀ t _M
20	4,56	6,46	7,76	6,38	5,62	5,62	8,02	4,99	6,80	3,42 10,77
20	4,55	6,45	7,77	6,39	5,63	5,63	8,04	4,98	6,80	3,38 10,82
20	4,56	6,46	7,75	6,39	5,65	5,65	8,04	5,00	6,80	3,42 10,77
Média	4,557	6,457	7,76	6,387	5,633	5,633	8,033	4,99	6,80	
30	5,14	6,54	8,38	6,46	5,68	5,68	8,77	5,03	6,89	3,42 11,37
30	5,14	6,53	8,14	6,46	5,68	5,68	8,77	5,04	6,89	3,38 11,36
30	5,12	6,54	8,16	6,47	5,69	5,69	8,78	5,04	6,91	3,42 11,36
Média	5,133	6,537	8,227	6,463	5,683	5,683	8,773	5,037	6,897	
40	5,74	6,76	8,72	6,67	5,74	5,74	9,77	5,18	7,15	3,43 12,27
40	5,69	6,71	8,65	6,63	5,69	5,69	9,69	5,15	7,12	3,42 12,12
40	5,67	6,69	8,62	6,60	5,67	5,67	9,64	5,14	7,09	3,43 12,03
Média	5,7	6,72	8,663	6,633	5,7	5,7	9,7	5,157	7,12	
50	6,45	7,18	9,37	7,07	6,45	6,45	11,16	5,40	7,60	3,55 13,90
50	6,28	6,98	9,09	6,88	6,28	6,28	10,77	5,30	7,42	3,47 13,37
50	6,28	6,98	9,08	6,88	6,28	6,28	10,75	5,30	7,40	3,5 13,33
Média	6,337	7,047	9,18	6,943	6,337	6,337	10,89	5,33	7,473	
[SDS] = 0	3,33	9,74	11,34	10,05	7,44	7,54	13,9	4,5	9,37	4,5
μ _{ep} /μ ₀	1,35	0,46	0,40	0,45	0,60	0,60	0,32	1,00	0,48	

O fluxo eletrosmótico (eof) medido pelo pico de metanol mostra que a ausência de micelas aumenta o fluxo e que a vitamina B₁ migra antes que eof em meio não micelar.

Para solutos iônicos, o cálculo do fator de retenção (k) pode ser obtido através da equação seguinte. A mobilidade relativa μ_r é a razão de mobilidades

μ_{ep}/μ_{eo} (eletroforética do soluto e fluxo eletrosmótico, respectivamente) na ausência de micelas e supondo que não ocorram interações como par iônico entre o soluto e monômeros do SDS ou tampão (CAMILLERI, 1998). Ainda t_0 , t_{mc} e t_r correspondem aos tempos de migração do marcador de fluxo, micela (antraceno foi utilizado como marcador da micela) e soluto, respectivamente, no meio micelar:

$$k = [t_r (1 + \mu_r) - t_0] / [t_0 (1 - t_r / t_{mc})] \quad \text{Equação 1}$$

Esta equação aplica-se a solutos iônicos (μ_r negativo ou positivo dependendo do sentido da migração do soluto em relação ao fluxo eletrosmótico) ou neutros ($\mu_r = 0$ reduzindo-se à forma usual).

A Tabela 2.3 mostra os valores de k calculados considerando os seguintes valores de μ_r :

Vitaminas	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	B ₈	B ₉	B ₁₂	C
$\mu_r = \mu_{ep}/\mu_{eo}$	1,351	0,462	0,397	0,448	0,605	0,597	0,324	1,000	0,480

Obs.: Valores para ânions migrando no contra-fluxo são menores que a unidade.

Tabela 2.3 – Fatores de retenção das vitaminas para as diferentes concentrações de SDS

Concentração de SDS (mmol L ⁻¹)	Valores de k calculados para as vitaminas								
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	B ₈	B ₉	B ₁₂	C
20	3,703	4,402	7,762	4,173	3,424	3,396	8,241	3,574	5,272
20	3,737	4,432	7,844	4,243	3,488	3,460	8,363	3,607	5,324
20	3,703	4,402	7,722	4,192	3,473	3,446	8,332	3,591	5,272
média	3,714	4,412	7,776	4,203	3,462	3,434	8,312	3,591	5,289
desvio	0,019	0,017	0,062	0,036	0,033	0,034	0,063	0,017	0,030
30	4,624	4,227	9,212	4,017	3,328	3,301	10,471	3,482	5,031
30	4,704	4,291	8,340	4,097	3,394	3,367	10,679	3,563	5,127
30	4,588	4,232	8,281	4,040	3,346	3,319	10,560	3,500	5,082
média	4,639	4,250	8,611	4,051	3,356	3,329	10,570	3,515	5,080
desvio	0,059	0,036	0,521	0,041	0,034	0,034	0,104	0,043	0,048
40	5,515	4,190	8,818	3,978	3,167	3,142	13,598	3,497	4,998
40	5,489	4,186	8,847	3,988	3,148	3,123	13,719	3,498	5,046
40	5,461	4,171	8,856	3,956	3,126	3,101	13,693	3,487	5,016
média	5,488	4,182	8,840	3,974	3,147	3,122	13,670	3,494	5,020
desvio	0,027	0,010	0,020	0,016	0,021	0,021	0,064	0,006	0,024
50	6,105	4,048	8,244	3,833	3,575	3,547	16,038	3,340	4,786
50	6,139	4,061	8,307	3,853	3,591	3,564	15,985	3,404	4,865
50	6,086	4,021	8,229	3,815	3,554	3,527	15,840	3,367	4,787
média	6,110	4,043	8,260	3,834	3,573	3,546	15,954	3,370	4,813
desvio	0,027	0,020	0,041	0,019	0,019	0,019	0,103	0,032	0,045

O estudo do fator de retenção em função da concentração de SDS mostra que apenas o ácido fólico (B₉) e a tiamina (B₁) aumentam a interação com as micelas neste intervalo de concentração (Figura 2.6).

Figura 2.6 – Gráfico sobre o estudo da variação do fator de retenção das vitaminas em função da concentração de SDS.

Tabela 2.4 – Dados estatísticos das regressões de k vs $[SDS]$

Vitaminas	A	B	R^2	F	s^2	p
B ₁	0,0313 ± 0,0007	-0,02	0,995	2264	0,03	0,0001
B ₂	-0,0038 ± 0,0005	2,3	0,84	53	0,02	0,0001
B ₃	0,02 ± 0,07	4,4	0,33	5	0,29	0,05
B ₅	-0,0041 ± 0,0006	2,2	0,84	52	0,02	0,0001
B ₆	0,004 ± 0,003	1,2	0,17	2	0,1	0,18
B ₈	0,004 ± 0,003	1,2	0,17	2	0,1	0,18
B ₉	0,186 ± 0,004	1,5	0,996	2275	0,15	0,0001
B ₁₂	0,0000 ± 0,0004	0,9	0	0	0,01	0,91
C	-0,0050 ± 0,0008	2,8	0,8	40	0,03	0,0001

A tiamina (B_1) tem um nitrogênio quaternário que não pode fazer ligações de hidrogênio, e nem ter sua carga neutralizada com eficiência pelo solvente, como é comum a todo sal quaternário de amônio, onde os grupos são volumosos e hidrofóbicos. A carga positiva residual justifica suas propriedades de adsorção em superfícies polares, especialmente a micelar. São conhecidas as propriedades algicidas, irritante da pele, formação de pares iônicos (catálise por transferência de fase), de neutralização de cargas superficiais (cabelo, por exemplo) e de limpeza em geral. O ácido fólico (B_9) tem estrutura anfifílica (Figura 2.1) sendo que em pH ~ 9 as duas carboxilas estão desprotonadas. A análise conformacional (Figura 2.7) mostra que o ácido fólico apresenta ligação de hidrogênio intramolecular em todas as conformações, tanto em fase gasosa como em fase aquosa. Isto expõe a parte hidrofóbica da molécula a qual interage com a micela na interface entre o miolo hidrofóbico e a superfície carregada.

Figura 2.7 – Gráfico de distribuição de confôrmeros (fração molar) em água em função da distância da ligação de hidrogênio (linha pontilhada) do ácido fólico (vitamina B_9), pelo programa Spartan v4.0. A figura mostra a conformação encurvada da vitamina, deixando clara a formação da ligação de hidrogênio entre o carboxilato (em vermelho) de uma extremidade e os $-NH$ e $-NH_2$ (em azul) da outra extremidade. A análise conformacional mostra que em todas as situações a molécula encontra-se encurvada fazendo ligação de H intramolecular.

A micela é, portanto, determinante na dissolução do ácido fólico. O miolo hidrofóbico da micela mimetiza a fase gasosa, e a superfície apresenta as mesmas propriedades da fase aquosa. As outras vitaminas têm estrutura globular e apresentam carga negativa que dificultam a sua incorporação nas micelas de SDS. Além disso, suas propriedades de hidrofobicidade, descritas quantitativamente por $\log P$ e $\log S$ (Tabela 2.1), mostram que são muito solúveis em água, havendo pouca afinidade com o interior hidrofóbico da micela.

Este estudo mostrou que trabalhar com altas concentrações de SDS não afeta a separação em grandes proporções. Optou-se, então, por trabalhar com a menor concentração de SDS avaliada, 20 mmol L⁻¹, para dar prosseguimento ao estudo.

O comportamento de migração (e, conseqüentemente, a seletividade), em separações por MEKC, pode ser manipulado pela escolha adequada do tipo de tensoativo ou das misturas de tensoativos, tanto quanto pela inclusão de modificadores selecionados ao sistema de eletrólito, tais como ciclodextrinas, ureia e solventes orgânicos. Espera-se que a presença destes últimos influencie tanto as propriedades do fluxo eletrosmótico quanto as propriedades das micelas (número de agregação e concentração micelar crítica). Adicionalmente, a interação soluto-micela pode ser modulada pela presença de solventes orgânicos. Tal interação é dependente da estrutura do soluto e das propriedades dos solventes (acidez, basicidade, constante dielétrica), além das próprias propriedades das micelas (SILVA *et al.*, 2007).

Na etapa seguinte, avaliou-se o efeito dos solventes orgânicos (metanol, acetonitrila e tetraidrofurano) na seletividade das vitaminas. As condições anteriores (20 mmol L^{-1} de TBS e 20 mmol L^{-1} de SDS) foram mantidas. Para este estudo, utilizou-se como modelo o triângulo de misturas da Figura 2.8.

Figura 2.8 – Triângulo de misturas utilizado na otimização da separação das vitaminas.

O resultado de cada condição indicada pelo triângulo está na Figura 2.9, na qual estão apresentados os eletroferogramas de A a G.

Figura 2.9 – Resultado para influência dos solventes do triângulo de misturas na separação. As concentrações de SDS e TBS foram mantidas (ambas 20 mmol L⁻¹). Demais informações idênticas à Fig. 2.2.

Ao se observar os eletroferogramas da figura anterior, nota-se que o par crítico 5-6 se resolve em B, F e C. No entanto, o par crítico 3-4 só se resolve em B. Portanto, o eletrólito que promove a separação total das nove vitaminas é 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de metanol (eletroferograma ampliado na Figura 2.10).

Figura 2.10 – Eletroferograma obtido pelo método otimizado. Eletrólito de corrida: 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Demais informações idênticas à Fig. 2.2.

Em comparação com o resultado obtido para as mesmas concentrações de TBS e SDS só que sem a presença de metanol, ocorre aumento no tempo de corrida devido ao atraso, principalmente, dos picos 5, 6, 7, 8 e 9, mas promove a separação dos nove analitos.

4.2 Figuras de mérito

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004). Para o método de separação proposto, a seletividade foi estabelecida pela separação em linha de base das vitaminas investigadas (Figura 2.8).

Segundo a ANVISA, a precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra. Ela é considerada em três níveis:

- Repetibilidade (precisão intracorrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com mesmo analista e mesma instrumentação. É verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada.
- Precisão intermediária (precisão intercorrida): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes.
- Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologias analíticas.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

Equação 2

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Em que DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. Pela ANVISA o valor máximo aceitável não deve ser superior a 5%.

Neste trabalho, a precisão foi efetuada pela injeção das soluções contendo os padrões em três níveis de concentração, avaliando-se as repetibilidades intra e interdía (preparações diferentes), sendo a última em três dias não consecutivos. Os resultados são apresentados na Tabela 2.5. A repetibilidade intradia do tempo de migração e área relativa do pico foi abaixo de 1,9 e 4,5 CV%, respectivamente. A precisão em dias diferentes para os resultados de tempo de migração foi abaixo de 2,7%. Entretanto, para razões de área de pico, a precisão variou entre 2,0 e 11,0%. Valores mais altos para CV% são esperados para preparações em dias diferentes; no entanto, pode ter havido alteração da superfície do capilar. No caso da vitamina C, a variação foi maior provavelmente devido a grande instabilidade dessa vitamina em solução.

Tabela 2.5 – Valores de CV% para o tempo de migração e área relativa

VITAMINAS	PRECISÃO INTRADIA CV% (n= 6)				PRECISÃO INTERDIA CV% (n= 9)			
	Tempo de Migração	Razão de Área de Pico			Tempo de Migração	Razão de Área de Pico		
		1	2	3		1	2	3
		(níveis*)				(níveis*)		
Tiamina	1,9	3,9	1,8	1,5	2,6	5,7	8,3	6,7
Riboflavina	0,5	3,4	4,5	1,6	1,6	9,2	8,3	3,5
Ácido nicotínico	0,4	1,7	0,9	0,5	1,1	4,3	1,8	5,3
Pantotenato de cálcio	0,3	1,2	1,3	1,2	1,9	3,5	3,1	2,8
Piridoxina	0,9	2,8	3,2	1,1	1,6	4,0	3,5	2,4
Biotina	1,1	2,6	3,0	2,2	1,5	2,1	4,6	4,8
Ácido fólico	1,5	3,1	1,3	2,1	2,0	3,2	2,5	4,5
Cianocobalamina	0,6	2,3	1,9	0,8	2,7	3,4	2,0	6,1
Ácido ascórbico	0,9	3,5	2,6	1,8	1,2	11,0	7,5	8,5

*pontos 2, 3 e 4 da curva

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo especificado. A ANVISA recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados.

A linearidade do método foi determinada pela avaliação dos dados estatísticos apresentados na Tabela 2.6. As curvas analíticas foram construídas em diferentes intervalos de concentração para cada vitamina. A linearidade satisfatória foi alcançada, o que pode ser comprovado pelos altos valores de F, baixos valores de p e valores de coeficientes de determinação (R^2) próximos da unidade.

Tabela 2.6 – Parâmetros de avaliação da linearidade do método de separação

VITAMINAS	FAIXA LINEAR ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	A	B	R ²	F	p	EP
Tiamina	14,8 – 133,5	0,01351 $\pm$ 0,0006	0,0051 $\pm$ 0,0005	0,9996	464	0,00021	0,059
Riboflavina	27,6 – 73,2	0,0035 $\pm$ 0,0002	-0,0392 $\pm$ 0,0011	0,9991	364	0,00031	0,077
Ácido nicotínico	40,2 – 5284,0	0,0062 $\pm$ 0,0009	-0,6134 $\pm$ 0,0023	0,9988	344	0,00980	0,046
Pantotenato de cálcio	19,8 – 923,2	0,0040 $\pm$ 0,0002	-0,1533 $\pm$ 0,0006	0,9954	652	0,00013	0,112
Piridoxina	7,3 – 194,4	0,0123 $\pm$ 0,0003	-0,0068 $\pm$ 0,0004	0,9973	1128	0,00005	0,060
Biotina	67,5 – 143,3	0,0032 $\pm$ 0,0004	-0,0792 $\pm$ 0,0005	0,9968	534	0,00529	0,027
Ácido fólico	4,5 – 18,1	0,0317 $\pm$ 0,0005	-0,0195 $\pm$ 0,0007	0,9941	2536	0,00151	0,067
Cianocobalamina	4,9 – 18,5	0,0239 $\pm$ 0,0006	0,0900 $\pm$ 0,0008	0,9914	1292	0,00369	0,070
Ácido ascórbico	40,4 – 288,7	0,0103 $\pm$ 0,0014	-0,4156 $\pm$ 0,0016	0,9964	530	0,00535	0,236

A e B, coeficientes angular e linear, respectivamente da equação: $y = Ax + B$, onde y = área relativa do pico em unidade arbitrária e x = concentração em $\mu\text{mol L}^{-1}$, R² = coeficiente de determinação (n = 5), F = teste de Fisher e p = probabilidade de casualidade.

Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Pela ANVISA, o LD é estabelecido por meio de análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectado. No caso de técnicas instrumentais, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode, também, ser determinado pela Equação 2:

Equação 3

$$LD = \frac{DPa}{IC} \times 3,3$$

Em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pela ANVISA, o LQ é estabelecido por meio de análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito. A estimativa do limite de quantificação pode ser feita com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base. Pode, também, ser determinado pela Equação 4:

Equação 4

$$LQ = \frac{DPa}{IC} \times 10$$

Em que DPa e IC são idênticos à equação anterior.

Para as vitaminas, os LDs foram obtidos através de diluições sucessivas dos padrões em água até que se obtivesse razão sinal/ruído igual a três. Os LQs foram calculados multiplicando-se os LD por 3,33. Os valores obtidos para LD ficaram entre 1,5 e 27,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os valores de LQ entre 5,0 e 44,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 – Limites de detecção e quantificação das vitaminas estudadas

VITAMINAS	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD* ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ* ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Tiamina	4,9	16,5	0,4	1,2
Riboflavina	9,2	30,6	2,2	6,6
Ácido nicotínico	13,4	44,7	9,9	29,7
Pantotenato de cálcio	27,7	92,2	2,1	6,3
Piridoxina	2,4	8,1	0,4	1,2
Biotina	22,5	74,9	2,1	6,3
Ácido fólico	1,5	5,0	0,2	0,6
Cianocobalamina	1,6	5,4	0,1	0,3
Ácido ascórbico	13,5	44,9	2,9	8,7

LD* = 3,3(desvio padrão do intercepto)/(inclinação da curva)

LQ* = 10(desvio padrão do intercepto)/(inclinação da curva)

Os limites de detecção e quantificação calculados a partir dos dados da regressão (aqueles marcados com asterisco) apresentaram-se bastante diferentes daqueles obtidos experimentalmente, por diluição.

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação; adição de padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

A ANVISA estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo pelo menos três níveis de concentração, sendo cada nível em triplicata, deve ser obedecido. Desta maneira foram conduzidos os estudos de exatidão neste trabalho.

A recuperação foi avaliada apenas para quatro vitaminas hidrossolúveis uma vez que não foi possível realizar a determinação de todas na amostra. As vitaminas B₉ e B₁₂ apresentam concentrações inferiores aos seus limites de quantificação. Já para as vitaminas B₁ e B₂, o problema na sua determinação está relacionado à interferência de componentes da amostra. A biotina (vitamina B₈) não é adicionada em farinha láctea.

Para o cálculo da recuperação, amostras do branco foram adicionadas de padrões em três concentrações conhecidas e tratadas conforme preparo apresentado na parte experimental. As áreas relativas dos picos foram comparadas com as soluções dos padrões em água, tomadas como referência (100%). Foram obtidos valores de recuperação entre 88 e 110% (Tabela 2.8).

Estes valores estão dentro do intervalo aceitável pela AOAC para análise de alimentos, 80 e 115% (AOAC, 2002).

Tabela 2.8 – Resultados para recuperação (%) das vitaminas em amostras de branco da farinha adicionadas de padrões

VITAMINAS	RECUPERAÇÃO (%)		
	1	2	3
	(níveis*)		
Ácido nicotínico	89 ± 4	93 ± 5	90 ± 3
Pantotenato de cálcio	96 ± 1	88 ± 2	92 ± 1
Piridoxina	90 ± 3	93 ± 2	98 ± 4
Ácido ascórbico	99 ± 5	110 ± 3	104 ± 3

*pontos 2, 3 e 4 da curva

De acordo com Ribani e seus colaboradores (RIBANI *et al.*, 2004), a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

A robustez do método de separação foi avaliada para os tempos de migração, através da variação dos parâmetros: porcentagem de metanol (14 e 16%), concentração de SDS (18 e 22 mmol L⁻¹), tensão aplicada (18 e 22 kV) e temperatura do capilar (20 e 24°C). Cada parâmetro foi variado separadamente (Tabela 2.9). Todas as variações provocaram alterações nos tempos de migração em relação ao método otimizado (15% de metanol, 20 mmol L⁻¹ de

SDS, tensão de 20 kV e temperatura 22°C). No entanto, a separação foi afetada em duas situações: porcentagem de metanol igual a 14% e concentração de SDS igual a 22 mmol L⁻¹ (biotina e piridoxina comigraram nas duas situações). Isto indica a necessidade de controlar estes parâmetros.

Tabela 2.9 – Avaliação da robustez do método de separação otimizado

VITAMINAS	ROBUSTEZ PARA O TEMPO DE MIGRAÇÃO (CV%)							
	METANOL (%)		SDS (mmol L ⁻¹)		TEMPERATURA (°C)		TENSÃO (kV)	
	14	16	18	22	20	24	18	22
Tiamina	6,6	6,2	11,3	3,5	1,1	14,3	5,1	17,7
Riboflavina	12,8	7,8	9,5	8,5	1,8	13,0	3,9	17,4
Ácido nicotínico	16,0	9,8	11,9	11,6	3,6	15,2	1,8	19,2
Pantotenato de cálcio	13,6	8,1	10,1	8,9	1,5	13,7	3,6	18,0
Piridoxina	10,4	5,5	7,0	6,2	0,2	10,4	6,4	15,4
Biotina	10,7	5,9	7,5	6,6	0,1	11,0	6,0	15,7
Ácido fólico	17,6	11,4	13,6	12,2	1,7	16,6	0,3	20,1
Cianocobalamina	7,2	3,1	5,5	3,0	2,3	9,4	8,0	14,0
Ácido ascórbico	13,1	7,7	9,5	8,5	1,6	13,0	4,0	17,4

4.3 Avaliação da composição vitamínica em amostras de farinha láctea

4.3.1 Vitaminas do grupo B

Ao considerarmos os procedimentos de extração das vitaminas em matrizes complexas, como determinados alimentos, alguns aspectos devem ser levados em conta: a baixa concentração em que as vitaminas se encontram, a presença de interferentes e se a determinação será feita com base nas formas livres ou não.

Neste trabalho, temos o interesse em quantificar as vitaminas que são adicionadas à farinha láctea. Neste caso, tratam-se dos compostos nas formas livres.

Os métodos para extração em alimentos das vitaminas do grupo B encontrados na literatura geralmente envolvem uma etapa de hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática. A primeira libera as vitaminas das proteínas da matriz, enquanto a segunda converte as formas fosforiladas para as formas livres (no caso das vitaminas endógenas). As vitaminas adicionadas já se encontram nas formas livres (PENTEADO, 2005). As enzimas comumente empregadas são a takadiastase, a claradiastase, a mistura de takadiastase com β -amilase, a mistura de takadiastase com claradiastase e a papaína (PENTEADO, 2005).

Levando em conta que as vitaminas adicionadas não se encontram fortemente ligadas a matriz e que estes compostos são compostos orgânicos

bastante solúveis em metanol, propôs-se um método simples de extração sólido-líquido, utilizando este solvente como extrator. Uma massa de 0,4 g de farinha láctea foi homogeneizada em 2 mL de metanol através de vortex por 5 min. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido para evaporação sob fluxo de N_2 . O resíduo foi ressuspendido com 100 μ L de água deionizada para injeção no sistema de eletroforese capilar.

O primeiro resultado apresentou-se promissor, já que três vitaminas (B_6 , B_5 e B_3) puderam ser identificadas de imediato (Figura 2.11).

Figura 2.11 – Resultado preliminar para extração com metanol das vitaminas em farinha láctea. Eletrólito de corrida: 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Tensão: +20 kV. Detecção direta: 200 nm. PI = ibuprofeno de sódio. O asterisco (*) indica interferentes das vitaminas B_1 e B_2 .

A identificação das vitaminas foi realizada com a ajuda dos espectros UV-Vis e por *spike* dos padrões sobre o extrato.

Ao repetir o procedimento de extração empregado com as finalidades de calcular a recuperação e verificar a eficiência do método, observou-se um perfil bastante diferente no eletroferograma obtido. Não foi possível identificar os picos referentes às vitaminas como no primeiro teste.

Um aspecto importante que deve ser considerado em procedimentos de extração é a homogeneização da amostra, especialmente nos casos de farinhas enriquecidas/adicionadas. Existe variação na concentração dos aditivos dentro da embalagem. Talvez isso ocorra pela diferença de densidade dos componentes desses produtos. Essa heterogeneidade foi confirmada ao se realizar um teste no qual foram retiradas nove porções em diferentes regiões da lata de farinha láctea, seguindo o mesmo procedimento de extração anterior só que sem homogeneização prévia da lata. Os eletroferogramas resultantes estão apresentados na Figura 2.12.

Figura 2.12 – Heterogeneidade da amostra de farinha láctea. Os eletroferogramas representam as porções retiradas em pontos diferentes da lata sem homogeneização prévia. Eletrólito de corrida: 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Voltagem: +20 kV. Detecção direta: 200 nm.

Considerando a homogeneização da amostra uma etapa primordial na extração, realizou-se o procedimento utilizando a lata inteira. Adicionou-se metanol em volume proporcional à massa total e manteve-se o sistema em agitação por 20 minutos. Após decantação do sólido, três alíquotas do sobrenadante (2 mL cada) foram retiradas e levadas para evaporação com fluxo de N_2 . O resíduo foi ressuspensionado com 100 μL de água para injeção no sistema de eletroforese capilar. A Figura 2.13 apresenta os resultados.

Figura 2.13 – Resultado para as três alíquotas retiradas do conteúdo de uma lata inteira após homogeneização. Eletrólito de corrida: 20 mmol L^{-1} de TBS, 20 mmol L^{-1} de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Tensão: +20 kV. Detecção direta: 200 nm. Picos: 1 = B_6 , 2 = PI, 3 = B_5 , 4 = B_3 .

Ao analisarmos a figura anterior, notamos não apenas maior concordância entre os perfis dos eletroferogramas como também diminuição da presença de interferentes, mostrando a importância da etapa de homogeneização. Contudo, constatou-se que, além de B₁ e B₂, a vitamina B₆ apresenta interferência de algum composto. Com a finalidade de tentar eliminar este problema, uma alteração do método inicial foi sugerida. Reduziu-se a tensão de +20 para +15 kV, a fim de retardar os tempos de migração dos solutos. Pode-se observar, na Figura 2.14, a separação em linha de base entre a vitamina B₆ e o interferente. No entanto, B₁ e B₂ não podem ser determinadas já que não foi possível realizar sua separação de componentes da amostra (*).

Figura 2.14 – Modificação no método para eliminação de interferência. Eletrólito de corrida: 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Tensão: +15 kV. Detecção direta: 200 nm. Picos: 1 = B₆, 2 = PI, 3 = B₅, 4 = B₃.

A repetibilidade do procedimento, com base na área relativa de pico, foi avaliada através da injeção de três alíquotas retiradas do sobrenadante, no procedimento realizado para a lata homogeneizada. O ibuprofeno de sódio foi

utilizado como padrão interno. O resultado em CV% para a razão das áreas foi igual a 1,7, 3,5 e 5,5%, para as vitaminas B₆, B₅ e B₃, respectivamente.

Através das equações das curvas de calibração, foi possível quantificar essas vitaminas e comparar com as concentrações indicadas no rótulo (Tabela 2.10). A única que apresentou concordância entre os resultados com 95% de confiança pelo teste t foi a vitamina B₅. A concentração encontrada para a vitamina B₃ foi inferior em relação ao rótulo enquanto a vitamina B₆ apresentou uma concentração extremamente superior.

Tabela 2.10 – Comparação das concentrações encontradas com aquelas descritas no rótulo da lata

VITAMINAS	CONCENTRAÇÃO ROTULADA (m/m)	CONCENTRAÇÃO ENCONTRADA (m/m) (n=3)
B ₃	$7,96 \times 10^{-3}$	$3,17 \times 10^{-3} \pm 0,16 \times 10^{-3}$
B ₅	$3,06 \times 10^{-3}$	$3,20 \times 10^{-3} \pm 0,48 \times 10^{-3}$
B ₆	$0,49 \times 10^{-3}$	$9,76 \times 10^{-3} \pm 0,36 \times 10^{-3}$

4.3.2 Vitamina C

Sabe-se que a vitamina C apresenta grande instabilidade, principalmente em relação à sua oxidação. Este fato torna comum a adição de altas concentrações desse composto aos alimentos fortificados. Por este motivo, a etapa de pré-concentração é dispensada na sua determinação.

Devido à alta solubilidade do ácido ascórbico em água e tendo em vista que o rótulo da farinha láctea indica a presença de grande quantidade dessa

vitamina (0,03 g por 100 g de farinha), propôs-se a investigação de um procedimento simples de extração, o qual envolve mistura da amostra com água, centrifugação e recolhimento do sobrenadante para injeção no sistema eletroforético, como descrito na sessão da parte experimental.

Como pode ser observado na Figura 2.15, a vitamina C se torna facilmente detectável quando analisada em seu comprimento de onda máximo (270 nm).

Figura 2.15 – Determinação da vitamina C em amostra de farinha láctea. Eletrólito de corrida: 20 mmol L⁻¹ de TBS, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 15% (v/v) de MeOH. Tensão: +20 kV. Detecção direta: 270 nm.

Para determinação da vitamina C, utilizou-se, como padrão interno paracetamol, uma vez que o ibuprofeno de sódio tem baixa absorvidade no comprimento de onda de análise desta vitamina (270 nm).

A heterogeneidade da amostra também foi verificada para vitamina C, para nove porções da lata, e foi avaliada através da repetibilidade da razão entre áreas. Não houve variação no perfil do eletroferograma, tendo em vista que, no comprimento de onda avaliado, 270 nm, menos compostos absorvem em relação a 200 nm.

O resultado para repetibilidade das áreas relativas, para nove porções de amostra em diferentes regiões da lata, foi superior a 50% CV, indicando novamente a heterogeneidade da amostra.

Para análise da lata homogeneizada, adicionou-se água em volume proporcional à massa total e manteve-se o sistema em agitação por 20 minutos. Após decantação do sólido, três alíquotas do sobrenadante foram retiradas, centrifugadas, filtradas e levadas para injeção no sistema eletroforético. Para as réplicas da amostra homogeneizada (uma lata), o resultado em termos de CV foi inferior a 10%.

Mesmo com o procedimento de homogeneização, a variação não foi muito pequena. Isso se deve, possivelmente, devido à grande instabilidade desta vitamina.

A quantificação da vitamina C através da curva de calibração resultou em concentração muito superior àquela indicada no rótulo do produto (Tabela 2.11).

Tabela 2.11 – Comparação da concentração de vitamina C encontrada com aquela descrita no rótulo da lata

VITAMINA	CONCENTRAÇÃO ROTULADA (m/m)	CONCENTRAÇÃO ENCONTRADA (m/m)
C	0,03	0,71 ± 0,17

Altas concentrações de vitamina C são geralmente adicionadas. Por se tratar de um composto bastante instável, principalmente frente a agentes oxidantes, adicionam-se grandes quantidades a fim de garantir que o processamento do produto não ocasione a degradação total da vitamina.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi desenvolvido um método simples e rápido para a determinação de vitaminas hidrossolúveis em farinha láctea. O estudo da otimização da composição do eletrólito para separação das vitaminas foi conduzido através da utilização do triângulo de misturas de solventes. A composição do eletrólito otimizado consiste de TBS 20 mmol L⁻¹, SDS 20 mmol L⁻¹ e metanol 15% (v/v).

Figuras de mérito foram avaliadas e o método foi considerado satisfatório para quantificação das vitaminas B₃, B₅, B₆ e C em farinha láctea. Os procedimentos que permitiram a extração destes compostos podem ser considerados simples, rápidos e baratos. As vitaminas B₉ e B₁₂ não puderam ser quantificadas através desta metodologia, pois estão presentes na amostra em concentrações inferiores aos seus limites de quantificação. Já a determinação das vitaminas B₁ e B₂ na farinha láctea não foi possível devido à presença de interferentes. Assim, melhor *clean up* da amostra se torna necessário.

O desempenho da metodologia analítica aplicada foi satisfatório para a inspeção de conteúdos vitamínicos em farinha láctea, podendo ser implementada no controle de qualidade deste tipo de alimento.

REFERÊNCIAS

- AOAC, International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis, 2002.
- BOONKERD, S.; DETAEVERNIER, M.R.; MICHOTTE, Y. Use of capillary electrophoresis for the determination of vitamins of the B group in pharmaceutical preparations. *Journal of Chromatography A*, v. 670, p. 209-214, 1994)
- BRASIL. Resolução RDC no. 899, de 2 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
- BUSKOV, S.; MOLLER, P.; SORESEN, H.; SORESEN, J.C.; SORSEN, S. Determination of vitamins in food based on supercritical fluid extraction prior to micellar electrokinetic capillary chromatographic analyses of individual vitamins. *Journal of Chromatography A*, v. 802, p. 233-241, 1998.
- CAMILLERI, P. Capillary electrophoresis: theory and practice. New York, USA. CRC Press LLC, 1998.
- FRANCO, M.; JASIONOWSKA, R.; SALVATORE, E. Application of CZE method in routine analysis for determination of B-complex vitamins in pharmaceutical and veterinary preparations. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2012, p. 1-7, 2012.
- GOMIS, D.B.; GONZÁLEZ, L.L.; ÁLVAREZ, D.G. Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of water-soluble vitamins. *Analytica Chimica Acta*, v. 396, p. 55-60, 1999.
- HU, Q.; ZHOU, T.; ZHANG, L.; LI, H.; FANG, Y. Separation and determination of three water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations and food by micellar electrokinetic chromatography with amperometric electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 437, p. 123-129, 2001.
- HUOPALAHTI, R.; SUNELL, J. Use of capillary zone electrophoresis in the determination of B vitamins in pharmaceutical products. *Journal of Chromatography*, v. 636, p. 133-135, 1993.
- LIU, Q.; JIA, L.; HU, C. On-Line concentration methods for analysis of fat-soluble vitamins by MEKC. *Chromatographia*, v. 72, p. 95-100, 2010.

NOLLET, L.M.L. Handbook of Food Analysis. New York, USA. Marcel Dekker, 2004.

PENTEADO, M.D.V.C. Vitaminas: Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP. Manole, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v. 27, p. 771-780, 2004.

SALVADÓ, V.; SÁNCHEZ, J.M. Capillary electrophoresis of water-soluble vitamins: an undergraduate experiment. The Chemical Educator, v. 7, p. 23-26, 2002.

SILVA, C. A., PEREIRA, E. A., MICKE, G. A., FARAH, J. P. S., TAVARES, M. F. M. Mixture-designed electrolytes for the MEKC separation of natural and synthetic steroid. Electrophoresis, v. 28, p. 3722, 2007.

SIMIONATO, A.V.C.; LANÇAS, F.M.; RUGGIERO, M.A. Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography in pharmaceutical samples. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 29, p. 349-363, 2007.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. Química Nova, v. 19, p. 173-181, 1997.

CAPÍTULO 3 – SEPARAÇÃO DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

1 INTRODUÇÃO

As vitaminas lipossolúveis possuem funções orgânicas essenciais ao organismo. Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para determinação destes compostos, principalmente em formulações farmacêuticas, fluidos humanos e alimentos (LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2001). As vitaminas A e E são determinadas em alimentos em geral por HPLC com detecção UV e fluorescência, respectivamente, enquanto que a vitamina D é analisada por HPLC-UV, depois de uma etapa de cromatografia preparativa. Contudo, recentemente, tem-se dado ênfase para a análise simultânea das vitaminas lipossolúveis por HPLC, especialmente com detecção UV (HEUDI, 2004).

Nos métodos típicos por HPLC, as vitaminas lipossolúveis são determinadas usando solventes orgânicos como fase móvel e uma fase estacionária pouco polar (cromatografia em fase reversa). Geralmente, utiliza-se uma combinação de um solvente mais polar, como acetonitrila, e um menos polar, como diclorometano, para agir no controle da retenção pelo ajuste da força do solvente; pode-se, ainda, utilizar um terceiro solvente com capacidade de fazer ligação de hidrogênio, como metanol, para otimizar a seletividade (SNYDER, 2010).

Existem numerosos métodos para determinação simultânea das vitaminas lipossolúveis (MENDOZA *et al.*, 2003; BERG *et al.*, 2000, HEUDI *et*

al., 2004; BARBA *et al.*, 2011); no entanto, a maioria deles engloba apenas um dos vitâmeros de cada vitamina. Neste trabalho, foi realizada a separação simultânea de sete vitaminas lipossolúveis, incluindo dois vitâmeros da vitamina A (retinol e acetato de retinol) e três vitâmeros da vitamina E (α -tocoferol, acetato de α -tocoferol e δ -tocoferol), além das vitaminas D₃ (colecalfiferol) e K₁ (filoquinona).

As estruturas das vitaminas estudadas estão apresentadas na Figura 3.1.

Figura 3.1 – Estruturas das vitaminas lipossolúveis estudadas

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método alternativo, rápido, simples e altamente eficiente para análise simultânea das vitaminas lipossolúveis por cromatografia a líquido com detecção UV-DAD.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Os padrões de vitaminas utilizados foram: retinol, acetato de retinol, colecalciferol, α -tocoferol, acetato de α -tocoferol, δ -tocoferol e filoquinona, todos obtidos da Sigma Aldrich (P. A., São Paulo, Brasil), com alto grau de pureza e mantidos em freezer para evitar degradação.

A fase móvel foi composta por água ultrapura (MilliQ[®] - marca Millipore, modelo Direct-quantum TMEX – Bedford, MA, USA) e acetonitrila (ACN) (grau HPLC, J. T. Backer, Xalostoc, México).

Metanol e tetraidrofurano (grau HPLC, J. T. Backer, Xalostoc, México) foram utilizados na otimização da fase móvel.

Soluções estoque dos padrões de vitaminas foram preparadas na concentração de 100 mg L⁻¹, sendo dissolvidas em acetonitrila e estocadas em geladeira a 4°C – até uso por, no máximo, uma semana.

3.2 Instrumentação

A separação cromatográfica foi executada utilizando-se um cromatógrafo a líquido Thermo Electron Corporation (San Jose, CA, USA) equipado com amostrador automático (Finnigan Surveyor), forno de coluna, bombas

quaternárias LC *Pump Plus* (Finnigan Surveyor), detector de arranjo de diodos (Finnigan Surveyor), que operou na faixa de 200 a 600 nm, e *software* para aquisição de dados (Xcalibur).

Utilizou-se uma coluna C18 Phenomenex - Allcrom, 150 x 4,6 mm com partículas de 5 µm, com temperatura mantida constante, pelo forno, a 30°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização da separação

De acordo com Snyder, a retenção, em cromatografia líquida, é determinada pela polaridade dos compostos e pelas condições experimentais: fase móvel, coluna e temperatura. Muito provavelmente, o processo ocorre através de partição (SNYDER, 2010).

O valor da retenção (k) dos compostos é preferencialmente ajustado pela mudança na composição da fase móvel ou *força do solvente*. Esta, por sua vez, depende tanto da escolha do solvente orgânico como da sua concentração na fase móvel: % B, onde B é o solvente orgânico e % é o volume percentual. Um intervalo de retenção de $0,5 < k < 20$ é aceitável para amostras que são separadas em condições isocráticas, embora $1 < k < 10$ seja preferível (SNYDER, 2010).

Recomenda-se usar, a princípio, uma fase móvel forte (100 % de ACN), sugerindo que, dessa forma, o tempo da corrida será curto e os analitos serão todos eluídos. Reduções sucessivas na porcentagem de ACN podem ser necessárias (recomendam-se reduções de 20%), caso a eluição dos primeiros analitos seja tal que o fator de retenção seja inferior a 0,5 (SNYDER, 1997).

Como primeira aproximação, os gráficos de $\log k$ vs. % B são lineares:

$$\log k = \log k_w - S\phi$$

Equação 5

Onde k_w é o valor teórico de k para % B = 0; S é uma constante para um dado composto; e Φ é a fração de volume orgânico na fase móvel (% B/100). As linhas horizontais para $\log 0,5$ e $\log 20$ definem o valor mínimo e o máximo de porcentagem de solvente orgânico para retenções aceitáveis.

Experimentalmente, foram realizadas corridas diminuindo-se as porcentagens de ACN de 100 a 60%, de acordo com a Tabela 3.1:

Tabela 3.1 – Variação da força de eluição da fase móvel para fins de resultados preliminares

% ACN	% H ₂ O	k (primeiro analito)	k (último analito)
100	0	0,2	1,1
80	20	0,85	5,2
60	40	3,3	18,5

Menores concentrações de ACN geraram tempos de eluição muito longos, induzindo a retenções muito acentuadas ($k \gg 20$).

Na Figura 3.2, está representado o gráfico obtido através de valores experimentais para o fator de retenção k .

Figura 3.2 - Gráfico referente à retenção dos compostos frente à variação da força do solvente (ACN) para determinação do intervalo ótimo para a retenção, onde A_1 = retinol, A_2 = acetato de retinol, D_3 = colecalfiferol, E_1 = acetato de α -tocoferol, E_2 = α -tocoferol, E_3 = δ -tocoferol, K_1 = filoquinona.

De acordo com o gráfico e com o auxílio do programa *Microcal Origin*, para manter os valores de retenção dentro do intervalo aceitável ($0,5 < k < 20$), a porcentagem de ACN deve variar entre 74 e 86%. A partir destas informações, foram realizadas corridas isocráticas mantendo a concentração de ACN neste intervalo. No entanto, para valores menores que 82 % de ACN (Figura 3.3a), o tempo total da corrida ultrapassava 45 minutos, se tornando inviável. Já para valores acima de 82% de ACN, a separação dos analitos se torna comprometida (Figura 3.3b), corroborando com o próprio gráfico – que mostra a sobreposição das retas nessa região.

Figura 3.3 – Corridas com eluições isocráticas para verificar a separação no intervalo otimizado para k através do gráfico: (a) ACN 77% e (b) ACN 86%. Vazão: 1 mL min^{-1} . Volume de injeção: $20 \text{ }\mu\text{L}$. Temperatura da coluna: 30°C . Detecção: $\lambda = 280 \text{ nm}$. Identificação dos picos: (1) retinol; (2) acetato de retinol; (3) δ -tocoferol; (4) colecalciferol; (5) α -tocoferol; (6) acetato de α -tocoferol; (7) filoquinona.

É conhecido que a mudança no tipo de solvente orgânico é frequentemente usada para aumentar a seletividade, modificando o espaçamento entre os picos e melhorando a resolução. As propriedades dos solventes que podem afetar a seletividade são acidez, basicidade e dipolaridade. Três solventes miscíveis em água diferem significativamente em suas propriedades de seletividade e são também aceitáveis em termos de absorvidade no UV e viscosidade: acetonitrila, metanol e tetraidrofurano. Por isso, esses três solventes são recomendados para investigações de seletividade pelo tipo de solvente em cromatografia por fase reversa (SNYDER, 2010).

O triângulo de misturas foi escolhido para dar prosseguimento à etapa de otimização da separação, uma vez que é possível obter seletividades intermediárias através da mistura dos solventes. Este triângulo está representado na Figura 3.4:

Figura 3.4 - Triângulo utilizado para otimização da separação em cromatografia por fase reversa através da seletividade pela mistura de acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e tetraidrofurano (THF). Todas as fases móveis possuem a mesma força de solvente.

Para garantir que a força de eluição fosse igual para todas as fases móveis, foram utilizadas as seguintes equações (SCHOENMAKERS *et al.*, 1981):

$$\varphi_{\text{ACN}} = 0,32\varphi_{\text{MeOH}}^2 + 0,57\varphi_{\text{MeOH}} \quad \text{Equação 6}$$

$$\varphi_{\text{THF}} = 0,66\varphi_{\text{MeOH}} \quad \text{Equação 7}$$

Onde φ representa a porcentagem para cada componente nos vértices do triângulo.

A proporção utilizada como base para estes cálculos foi obtida através do estudo anterior, no qual foram realizadas eluições isocráticas, com a finalidade de otimizar os valores para o fator de retenção. Dentro do intervalo mencionado anteriormente, sobre os valores de % ACN nos quais os analitos tinham fatores de retenção aceitáveis, foi escolhida a proporção ACN:H₂O (82:18, v/v).

Este valor de % ACN foi utilizado nas Equações 5 e 6, através das quais foi possível obter os valores das porcentagens de MeOH e THF correspondentes aos vértices do triângulo. Os cromatogramas obtidos nessas condições estão representados na Figura 3.5.

Figura 3.5 – Cromatogramas resultantes para as fases móveis do triângulo de misturas. Demais informações ver Figura 3.3.

Tanto a fase móvel A como a D promovem a separação dos sete analitos. Embora o retinol (pico 1) fique pouco retido na coluna, eluindo muito próximo da banda do solvente, os fatores de retenção estão dentro do intervalo aceitável ($0,5 < k < 20$).

Sugeriu-se trabalhar com o modo gradiente, no qual a força de eluição da fase móvel varia durante a separação cromatográfica, com o intuito de aumentar a retenção do retinol. Se a fase móvel, no começo da corrida, tiver uma força de eluição menor, provavelmente o primeiro analito vai ficar mais tempo retido na coluna.

Uma das formas de otimizar a separação por gradiente é utilizando o *software* DryLab[®] 2000 (LC Resources inc., Walnut Creek, CA), através do qual é possível simular o que ocorre com os picos quando se promovem variações nas rampas do gradiente.

Inicialmente, são realizadas três corridas experimentais prévias, utilizando gradientes de 20, 40 e 60 minutos. Em ambos, a porcentagem de ACN varia de 5 a 100%. Os valores experimentais de tempos de retenção obtidos são adicionados ao *software*. Dados como tipo, comprimento e temperatura da coluna também são inseridos. O simulador gera, então, um cromatograma teórico. Este cromatograma pode sofrer alterações mediante modificações manuais do gradiente. A Figura 3.6 apresenta os cromatogramas obtidos teórica e experimentalmente, sendo o último obtido nas mesmas condições sugeridas pelo *software*.

Figura 3.6 – Comparação entre o cromatograma obtido pelo simulador e o obtido experimentalmente nas condições de gradiente sugeridas pelo *software*. FM: A – água pura e B – acetonitrila. Gradiente de eluição: 5 - 65% B em 0,5 min, 65 - 90% B em 1 min, 90 - 100% B até 10 min de corrida. Vazão: 2 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Temperatura da coluna: 30°C. Detecção: λ = 280 nm. Identificação dos picos: (1) retinol; (2) acetato de retinol; (3) δ -tocoferol; (4) coлекаlçiferol; (5) α -tocoferol; (6) acetato de α -tocoferol; (7) filoquinona.

Como se observa na Figura 3.6, foi possível obter boa separação, em linha de base e em curto tempo de corrida (7 minutos), das sete vitaminas, utilizando as condições de gradiente sugeridas pelo simulador. Nota-se a presença de cauda nos picos 6 e 7 – e também a presença de forte ruído na linha de base próximo aos picos 1 e 3. Possivelmente, isto ocorreu devido a degradação de alguns padrões, pois as soluções utilizadas tinham sido preparadas havia uma semana. O ideal é trabalhar com as vitaminas preparadas no mesmo dia, já que apresentam certo grau de instabilidade.

Tanto o método por eluição isocrática (Figura 3.5-D) quanto o método por eluição gradiente (Figura 3.6) tornam possível a separação das sete vitaminas lipossolúveis estudadas.

A identificação dos picos foi realizada pela injeção dos padrões separados, obtendo-se, assim, o tempo de retenção e o espectro UV-Vis, na região de 200 a 600 nm (Figura 3.7).

Figura 3.7 – Espectros de absorção no UV-Vis dos padrões de: **A)** retinol, **B)** acetato de retinol, **C)** δ – tocoferol, **D)** colecalciferol, **E)** α – tocoferol, **F)** acetato de α – tocoferol, **G)** filoquinona. Condições cromatográficas de obtenção dos espectros: gradiente de eluição: 5 - 65% B em 0,5 min, 65 – 90% B em 1 min, 90 – 100% B até 10 min de corrida. Vazão: 2 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Temperatura da coluna: 30°C.

4.2 Avaliação das separações cromatográficas

Para caracterização das separações obtidas, torna-se necessária a determinação dos parâmetros cromatográficos. A Tabela 3.2 apresenta os valores de k e N (número de pratos).

Tabela 3.2 – Parâmetros cromatográficos para os dois métodos: número de pratos e fator de retenção

Ordem de eluição	Vitamina	k (isocrático)	N (isocrático)	N (gradiente)
1	Retinol	0,5	3292	37706
2	Acetato de Retinol	0,6	2655	44874
3	δ-tocoferol	3,2	5129	33993
4	Colecalciferol	3,3	4481	22410
5	α-tocoferol	4,8	37152	29558
6	Acetato de α-tocoferol	4,5	4221	23596
7	Filoquinona	9,7	4575	24060

O número de pratos e o fator de retenção foram calculados através das Equações 7 e 8, respectivamente (SNYDER, 2010):

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{Equação 8}$$

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 9}$$

Onde t_R é o tempo de retenção do analito, t_0 é o tempo morto da coluna e $W_{1/2}$ a largura da banda à meia altura.

Observa-se que o número de pratos é maior que 2000 para ambos os métodos, indicando boa eficiência da coluna. Os valores para o fator de

retenção para o modo isocrático também está dentro intervalo desejado ($0,5 < k < 20$).

A resolução (R_s) obtida para os pares de picos adjacentes estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Resolução

Vitaminas Adjacentes	R_s (isocrático)	R_s (gradiente)
1 – 2	0,5	4,4
2 – 3	14,6	8,3
3 – 4	1,5	2,5
4 – 5	2,5	2,2
5 – 6	8,4	4,1
6 – 7	3,9	4,6

A resolução foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$R_s = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{W_{\frac{1}{2},1} + W_{\frac{1}{2},2}} \quad \text{Equação 10}$$

Onde, t_1 e t_2 são os tempos de retenção dos picos adjacentes e $W_{1/2, 1}$ e $W_{1/2, 2}$ as larguras à meia altura das bandas adjacentes.

Sendo a resolução um critério para descrever a qualidade da separação, está deve ser maior que 1,5 para garantir que a integração das áreas dos picos seja confiável (SNYDER, 2010). Observa-se que para os picos 1 e 2, no modo isocrático, a resolução apresenta-se abaixo do valor ideal, indicando que a separação não é satisfatória. Portanto, para fins de posterior aplicação do método analítico, o modo por gradiente apresenta-se mais adequado.

5 CONCLUSÕES

A separação de sete vitaminas lipossolúveis por cromatografia a líquido foi alcançada. Para isso, realizou-se primeiramente o estudo da retenção destes compostos e da influência da força de eluição da fase móvel. A seletividade da separação foi investigada através do triângulo de misturas. Uma das condições do triângulo (MeOH:ACN:H₂O, 47:41:12, v/v/v) foi avaliada e comparada com o método por gradiente, desenvolvido através do *software* DryLab. Este simulador é capaz de fornecer o gradiente que promove a separação dos compostos estudados. Isto ocorre através do fornecimento de dados experimentais preliminares, como tamanho e tipo da coluna e tempos de retenção dos compostos, em condições sugeridas pelo próprio *software*. O gradiente fornecido pelo simulador foi testado experimentalmente e apresentou resultado satisfatório no que diz respeito a separação das vitaminas.

Os parâmetros cromatográficos da separação (fator de retenção, número de pratos e resolução) foram avaliados e demonstraram que o método por gradiente é satisfatório, podendo ser aplicado em matrizes que contenham este tipo de vitaminas.

REFERÊNCIAS

- BARBA, F.J.; ESTEVE, M.J.; Determination of vitamins E (α-, γ- and δ-tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage. *European Food Research and Technology*, v. 232, p. 829-836, 2011.
- BERG, H.; TURNER, C.; DAHLBERG, L. Determination of food constituents based on SFE: applications to vitamins A and E in meat and milk. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 43, p. 391-491, 2000.
- HARRIS, D.C. *Análise Química Quantitativa*. 6ª edição. Editora LTC. 2005.
- HEUDI, O.; TRISCONI, M.J.; BLAKE, C.J. Simultaneous quantification of Vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1022, p. 115-123, 2004.
- KIENEN, V.; COSTA, W.F.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E.; OLIVEIRA, C.C. Development of a green chromatographic method for determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplement. *Talanta*, v. 75, p. 141-146, 2008.
- LUQUE-GARCÍA, J.L.; CASTRO, L. Extraction of fat-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*, v. 935, p. 3-11, 2001.
- MENDOZA, B.R.; PONS, S.M.; BARGALLÓ, A.I.C.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, v. 1018, p. 197-202, 2003.
- NOLLET, L.M.L. *Handbook of Food Analysis*. New York, USA. Marcel Dekker: 2004.
- PAIXÃO, J.A.; CAMPOS, J.M. Determination of fat soluble vitamins by reversed-phase HPLC coupled with UV detection: a guide to the explanation of intrinsic variability. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 26, p. 641-663, 2003.

SCHOENMAKERS, P.J.; BILLIET, H.A.H.; GALAN, L.D. Use of gradient elution for rapid selection of isocratic conditions in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 205, p. 13-30, 1981)

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. *Introduction to modern liquid chromatography*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2010.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível desenvolver metodologias analíticas para obtenção da separação dos dois grupos de vitaminas, lipo- e hidrossolúveis, por cromatografia a líquido e eletroforese capilar, respectivamente.

A metodologia para separação das nove vitaminas hidrossolúveis apresentou parâmetros de validação (como linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação) satisfatórios.

A composição vitamínica da farinha láctea pode ser parcialmente acessada através da quantificação de quatro vitaminas hidrossolúveis (B_3 , B_5 , B_6 e C). Somente a vitamina B_5 apresentou concordância entre os valores de concentração rotulada e encontrada. Concentração inferior à indicada no rótulo para a vitamina B_3 foi encontrada. Para as vitaminas B_6 e C, os valores das concentrações obtidos foram superiores aos rotulados. Adição de excesso de vitamina C em alimentos fortificados é habitual devido ao alto potencial de oxidação desta vitamina.

CAPÍTULO 5 – PERSPECTIVAS

Para dar continuidade a este projeto de pesquisa, a extração das vitaminas hidrossolúveis que não foram determinadas neste trabalho deve ser investigada, através de estudos de pré-concentração da amostra. Uma avaliação estatística mais bem apurada deve ser feita, através da análise de vários lotes de farinha láctea.

A metodologia de separação das vitaminas lipossolúveis por cromatografia a líquido poderia continuar a ser desenvolvida, através da validação do método e posterior aplicação em amostras. Estudos aprofundados para extração destas vitaminas em amostras de alimentos se tornam necessários.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Maryane Machado Bertelli

Local e data de nascimento: Bicas (MG) – 04/02/1986

2. EDUCAÇÃO

USP – Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2009 – atual.
Mestrado em Química (Química Analítica).

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, 2005
– 2009. Bacharelado e Licenciatura em Química.

3. OCUPAÇÃO

Técnica de Laboratório, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP,
01/2012 – atual.

Bolsista de Mestrado, CNPq, 08/2009 – 07/2011.

Bolsista de Iniciação Científica, CNPq, 03/2007 – 12/2008.

4. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

BERTELLI, M.M.; TREVISAN, K.; TAVARES, M.F.M. “Determination of vitamin C in a sample of lacteal flour by micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC)”. In, 16 th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, dez/2012.

BERTELLI, M.M.; TREVISAN, K.; TAVARES, M.F.M. "Separation of nine water-soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography". In, 16 th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, dez/2011.

BERTELLI, M.M.; TREVISAN, K.; TAVARES, M.F.M. "Analysis of water-soluble vitamins in beverage by micellar electrokinetic capillary chromatography" In, 16 th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, dez/2010.

BERTELLI, M.M.; TREVISAN, K.; TAVARES, M.F.M. "Determinação de vitaminas lipossolúveis em formulações farmacêuticas de polivitamínicos por CLAE". Em, 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, maio/2010.