UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Teores de vitamina K em hortaliças consumidas
na cidade de São Paulo

Simone Aparecida dos Santos Conceição Faria

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Tit. Marilene De Vuono Camargo
Penteado

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

**Teores de vitamina K em hortaliças consumidas
na cidade de São Paulo**

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Simone Aparecida dos Santos Conceição Faria

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientadora:
Profª. Tit. Marilene De Vuono Camargo
Penteado**

**São Paulo
2013**

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F224t Faria, Simone Aparecida dos Santos Conceição
Teores de vitamina K em hortaliças consumidas na cidade de
São Paulo / Simone Aparecida dos Santos Conceição Faria. -- São
Paulo, 2013.
131p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador : Penteado, Marilene De Vuono Camargo

1. Alimentos : Análise : Ciência dos alimentos 2. Hortaliças :
Ciência dos alimentos 3. Vitamina : Ciência dos alimentos :
Tabelas I. T. II. Penteado, Marilene De Vuono Camargo,
orientador.

641 CDD

Simone Aparecida dos Santos Conceição Faria

Teores de vitamina K em hortaliças consumidas
na cidade de São Paulo

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Marilene De Vuono Camargo Penteadó
Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, ----- de 2013.

“Enquanto houver vontade de lutar haverá esperança de vencer”

Santo Agostinho

Dedico:

Aos meus pais Pedro e Silvia, com amor e respeito, que sempre se fazem presentes em todos os caminhos que percorro e são meus exemplos de força, trabalho, simplicidade, honestidade e acolhimento.

Ao meu esposo Cleber, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, força, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Aos meus filhos Catarina e Davi, com amor, os momentos com eles sempre renovam minhas forças para seguir em frente com alegria de viver.

AGRADECIMENTOS

À Deus, senhor da ciência, luz que ilumina meu caminho, minha fonte de sabedoria, força e esperança.

À Profª Marilene De Vuono C. Penteado, pela orientação, confiança, respeito, oportunidade e pelo aprendizado que me proporcionou.

Ao Centro de Qualidade em Horticultura/CEAGESP – Coordenada pela Engenheira Agrônoma Anita de Souza Dias Gutierrez e sua equipe técnica: Bertoldo Borges Filho e Tiago Oliveira pelas sugestões e auxílio no aperfeiçoamento desta pesquisa.

A Faculdade de Ciências Farmacêutica / USP no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos meus irmãos pelo amor e por serem sempre meu porto seguro.

A todos meus familiares, pelo apoio, suporte, entusiasmo e carinho.

A minha cunhada Claudia Brighenti por me ensinar o caminho.

Ao meu velho amigo Nelson Ishida por me incentivar ao longo dos anos e servir de inspiração para minha formação acadêmica e profissional.

Às amigas Wysllenny Souza e Vanilda Arruda, pelo constante companheirismo, pelas experiências vividas, pelo carinho, por tornarem o “fardo” mais leve e por redescobrir que a verdadeira amizade nasce em coisas simples.

Aos técnicos do laboratório Rosa Maria e Elias Araújo, por seus suportes e valiosos auxílios nas análises. Pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

A todos os alunos do laboratório de análise de alimentos, pelos conhecimentos compartilhados, pelas conversas, pelos momentos de descontração e apoio na pesquisa.

À Mônica, Cléo, Edílson, Roberta, Elaine e Jorge pelo auxílio nas questões acadêmicas.

À Leila Bonadio, Bibliotecária de Referência, pelos serviços de correções.

RESUMO

FARIA, S. A. S. C. **Teores de vitamina K em hortaliças consumidas na cidade de São Paulo**. [Tese de Doutorado] – São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

Estudos sobre a vitamina K têm evidenciado seu papel na manutenção da saúde óssea e vascular. A atuação desta vitamina em tecidos extra-hepáticos não é considerada na recomendação dietética da DRI de 2001, sendo reconhecidas necessidades maiores para função óssea em pessoas acima dos 60 anos e em indivíduos que fazem uso de medicamentos antivitamina K. Visando colaborar com pesquisas futuras, onde o conhecimento do teor de vitamina K₁ é relevante, além de contribuir com dados para Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TBCA –USP, o presente trabalho foi conduzido para determinação do teor de filoquinona (vitamina K₁) de hortaliças consumidas na cidade de São Paulo. As hortaliças analisadas foram escolhidas após a conclusão de um inquérito alimentar realizado, com adultos e idosos, num projeto de pesquisa desenvolvido junto ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP visando a análise da ingestão diária de vitamina K. Desta forma, foram analisadas as hortaliças mais consumidas por esses grupos, submetidas ou não ao processo de cocção. Estas amostras foram adquiridas diretamente na CEAGESP – Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo. As metodologias empregadas na determinação da filoquinona (vitamina K₁) foram extração e purificação pelo método líquido-líquido utilizando solventes orgânicos e quantificação através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os resultados mostraram que as amostras de hortaliças de colorações verdes mais escuras apresentaram os maiores teores da vitamina como: salsa 491,05 µg/100g; espinafre 375,01 µg/100g, quando comparados com as amostras de colorações verdes mais claras as quais como é o caso da alface americana 113,42 µg/100g e a couve-flor 32,55 µg/100g. A maioria das hortaliças analisadas apresentaram variações entre as diferentes épocas do ano e quando comparadas com dados da literatura.

Palavras – chave: Vitamina K₁; hortaliças folhosas; perdas na cocção; cor.

ABSTRACT

FARIA, S. A. S. C. **Levels of vitamin K in vegetables consumed in the city of São Paulo.** [PhD thesis] – São Paulo: School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, 2013.

Studies on vitamin K have shown its role in maintaining bone and vascular health. The role of this vitamin in extrahepatic tissues is not considered in the dietary recommendation of DRI 2001. Increased need for vitamin K intake is recognized for the bone function in people over age 60 and individuals who use anti-vitamin K drugs. Aiming at supporting future research, where knowledge of vitamin K1 is relevant, and contribute data to the Brazilian Table of Food Composition - TBCA-USP, this study was conducted to determine the level of phylloquinone (vitamin K1) of vegetables consumed in the city of São Paulo. The vegetables studied were chosen after completion of a nutrition survey carried out with adults and elderly people, a research project developed by the Department of Food and Experimental Nutrition FCF / USP aimed at analyzing the daily intake of vitamin K. Therefore, we analyzed the most consumed vegetables by these groups submitted or not to the cooking process. These samples were acquired directly at CEAGESP - General Warehouses Company of São Paulo. The methodologies employed in the determination of phylloquinone (vitamin K1) were extraction and purification method using liquid-liquid organic solvents followed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results showed that the samples of darker green vegetables showed the highest levels of vitamin such as parsley (491.05 µg/100g) and spinach (375.01 µg/100g), when compared with samples of lighter coloration (e.g. 113.42 µg/100g lettuce, and 32.55 µg/100g cauliflower). Most vegetables analyzed showed variation in results when compared to the different seasons and the literature data.

Keywords: Vitamin K1, leafy vegetables, cooking loss, color.

LISTA DE QUADROS

	Pag.
Quadro 1– Ingestão dietética de referência para a vitamina K.	12
Quadro 2– Teores de filoquinona de alguns alimentos, na base úmida. . . .	14
Quadro 3– Evolução da participação relativa de alimentos e grupos de alimentos no total de calorias determinado pela aquisição alimentar domiciliar em algumas Regiões Metropolitanas Brasileiras.	18
Quadro 4– Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) em estudo de Análise de Consumo Alimentar Pessoal no Brasil, realizado através de inquérito alimentar, aplicado em indivíduos com 10 anos ou mais de idade, moradores de todas as regiões do país (Norte, Nordeste, Sudestes, Sul e Centro – Oeste) em zonas rurais e urbanas, no período de 2008-2009.	21

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1.1– Estrutura química da filoquinona (vitamina K ₁).	4
Figura 1.2– Estrutura química da menaquinona (vitamina K ₂).	4
Figura 1.3– Estrutura química da menadiona (vitamina K ₃).	4
Figura 2.1– Cromatograma das vitaminas K ₁ e K ₂ dos padrões da marca Sigma.	48
Figura 2.2– Cromatograma da filoquinona (vitamina K ₁) analisada na amostra de couve manteiga.	49
Figura 2.3– Estrutura quinônica da filoquinona (vitamina K ₁) e a estrutura reduzida a hidroquinona.	49
Figura 2.4– Espectro de absorção característico da luteína.	50
Figura 3.1– Curva analítica de determinação da filoquinona	52
Figura 3.2– Intervalos de faixa linear de trabalho, para as massas injetadas da vitamina K ₁	54
Figura 3.3– Curvas analíticas da seletividade dos padrões puros e do padrão com adição da amostra de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	55
Figura 4.1– Limite de Detecção.	56
Figura 4.2– Limite de Quantificação.	57
Figura 4.3– Precisão do método baseado na curva analítica padrão para determinação da filoquinona (vitamina K ₁) em hortaliças folhosas.	60
Figura 4.4– Coeficiente de variação do método baseado na curva analítica padrão para determinação da filoquinona (vitamina K ₁) em hortaliças folhosas.	60

Figura 5.1–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em alface americana (<i>Lactuca sativa capitata</i>) <i>in natura</i> , em diferentes épocas do ano.	71
Figura 5.2–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em alface crespa (<i>Lactuca sativa</i> L.) <i>in natura</i> , em diferentes épocas do ano.	71
Figura 5.3–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em salsa (<i>Petroselinum crispum</i>) <i>in natura</i> , em diferentes épocas do ano.	72
Figura 5.4–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em rúcula (<i>Eruca sativa</i> L.) <i>in natura</i> , em diferentes épocas do ano.	72
Figura 5.5–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) <i>in natura</i> , em diferentes épocas do ano.	72
Figura 5.6–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em agrião (<i>Nasturtium officinale</i>) <i>in natura</i> , em diferentes épocas do ano.	73
Figura 5.7–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em coentro (<i>Coriandrum sativum</i> L.) <i>in natura</i> , em diferentes épocas do ano	73
Figura 5.8–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.) <i>in natura</i> , em diferentes épocas do ano.	73
Figura 5.9–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em hortelã (<i>Mentha longifolia</i>) <i>in natura</i> , em diferentes épocas do ano.	74
Figura 6.1–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em acelga (<i>Beta vulgaris</i> L.var. <i>cicla</i>) <i>in natura</i> e processada, em diferentes épocas do ano.	80
Figura 6.2–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em repolho verde (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>) <i>in natura</i> e processado, em diferentes épocas do ano	81
Figura 6.3–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em espinafre (<i>Spinacea oleracea</i> L.) <i>in natura</i> e processado, em diferentes épocas do ano.	82

Figura 6.4–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em couve manteiga (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>) <i>in natura</i> e processado, em diferentes épocas do ano.	83
Figura 6.5–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em couve-flor (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.) <i>in natura</i> e processada, em diferentes épocas do ano	84
Figura 6.6–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em escarola (<i>Cichorium endivia</i>) <i>in natura</i> e processada, em diferentes épocas do ano.	84
Figura 6.7–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em brócolo ninja (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>itálica</i>) <i>in natura</i> e processado, em diferentes épocas do ano.	85
Figura 6.8–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em chicória (<i>Cichorium intybus</i> L.) <i>in natura</i> e processada, em diferentes épocas do ano.	86
Figura 6.9–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em brócolo Comum (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck) <i>in natura</i> e processado, em diferentes épocas do ano.	86
Figura 6.10–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em almeirão (<i>Cichorium intybus</i> L.) <i>in natura</i> e processado, em diferentes épocas do ano.	88
Figura 6.11–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em catalonha (<i>cicharium inlybus</i>) <i>in natura</i> e processada, em diferentes épocas do ano.	88
Figura 6.12–	Teores médios de filoquinona (vitamina K ₁) em salsão (<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>rapaceum</i>) <i>in natura</i> e processado, em diferentes épocas do ano.	89

LISTA DE GRÁFICOS

	Pag
Gráfico 1– Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K ₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas <i>in natura</i> e o fator a* de intensidade da cor verde.	93
Gráfico 2– Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K ₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas <i>in natura</i> e o fator b* de intensidade da cor amarela.	93
Gráfico 3– Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K ₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas <i>in natura</i> e o fator L* de intensidade da luminosidade.	94
Gráfico 4– Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K ₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas cozidas e o fator a* de intensidade da coloração verde.	96
Gráfico 5– Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K ₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas cozidas e o fator b* de intensidade da coloração amarela.	97
Gráfico 6– Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K ₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas cozidas e o fator L* de intensidade Luminosidade.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Caracterização de Coleta na CEAGESP dos Produtos de Hortaliças Folhosas.	27
Tabela 2–	Umidade determinada em amostras de hortaliças folhosas coletadas na CEAGESP, expressa em %, base úmida.	45
Tabela 3–	Teste de Linearidade da análise da vitamina K ₁	52
Tabela 4–	Ensaio de Recuperação da Filoquinona (vitamina K ₁).	58
Tabela 5–	Recuperação da Filoquinona (vitamina K ₁), expressa em (%).	59
Tabela 6–	Dados de regressão de vitamina K ₁ obtidos pelo método de análise.	61
Tabela 7–	Concentração de filoquinona (vitamina K ₁) em hortaliças <i>in natura</i> , expressa em µg/100g de amostra, base úmida.	63
Tabela 8–	Teores de filoquinona (vitamina K ₁) em hortaliças folhosas <i>in natura</i> em diferentes épocas do ano, expresso em %.	68
Tabela 9–	Comparações múltiplas dos teores de filoquinona (vitamina K ₁) entre coletas para as hortaliças avaliada <i>in natura</i>	70
Tabela 10–	Teores da vitamina K das hortaliças segundo coleta e processamento, expressos em %, em base úmida.	77
Tabela 11–	Médias dos parâmetros de cor de algumas amostras analisadas <i>in natura</i> , em comparação com o teor da filoquinona (vitamina K ₁), expressas em %, material base úmida.	91
Tabela 12–	Médias dos parâmetros de cor de algumas amostras analisadas <i>in natura</i> e processadas por cocção, em comparação com o teor da filoquinona (vitamina K ₁), expressas em %, de material base úmida.	95
Tabela 13	Teores de filoquinona (Vitamina K ₁) das amostras analisadas <i>in natura</i> , comparadas com os teores encontrados na Tabela Americana – USDA, expressos em µg/100g de amostra, base úmida.	98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AI	Ingestão Adequada (<i>Adequate Intake</i>)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEASAS	Centrais Estaduais de Abastecimentos
CEAGESP	Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia a Gás
DMO	Densidade Mineral Óssea
EFS	Extração por Fase Sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FAO	Food and Agriculture Organization/ Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
GLA	Ácido Gama Carboxiglutâmico
GLU	Ácido Glutâmico
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IOM	Institute of Medicine/ Instituto de Medicina
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography
MEFS	Micro-Extração por Fase Sólida
MK	Menaquinona
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
POF	Pesquisa de Orçamento Familiar
UNICAMP	Universidade de Campinas
USP	Universidade de São Paulo
USDA	United States Department of Agriculture/Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UV	Ultra-violeta
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TBCA	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Histórico da vitamina K.	3
2.2	Estrutura química da vitamina K.	3
2.3	Função da vitamina K no metabolismo.	5
2.4	Avanços das pesquisas sobre o metabolismo da vitamina K.	5
2.5	Proteínas dependentes da vitamina K em tecidos ósseos.	6
2.6	Osteoporose.	7
2.7	Vitamina K e saúde cardiovascular.	7
2.8	Antagonistas da vitamina K.	8
2.9	Fontes de vitamina K.	9
2.10	Aspectos nutricionais da vitamina K.	10
2.11	Métodos de análise da vitamina K.	12
2.12	Cromatografia líquida de alta eficiência.	13
2.12.1	Extração da vitamina K de alimentos	14
2.12.2	Deteção da vitamina K.	15
2.13	Validação do método de análise.	16
2.14	Avaliação nutricional da população brasileira.	16
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral.	24
3.2	Objetivos específicos.	24
4	METODOLOGIA	25
4.1	Materiais.	25
4.1.1	Amostras.	25
4.1.1.1	Preparo e armazenamento das amostras.	31
4.1.1.2	Procedimento de cocção das amostras.	32
4.1.2	Padrões e reagentes.	32
4.1.3	Equipamentos.	33
4.2	Métodos.	34

4.2.1	Determinação da umidade.	34
4.2.2	Extração da filoquinona (vitamina K ₁).	35
4.2.3	Condições cromatográficas para a análise da filoquinona.	37
4.2.4	Preparo das soluções para curva padrão da vitamina K ₁	38
4.2.5	Identificação do pico da vitamina K ₁	39
4.2.6	Validação do método cromatográfico.	39
4.2.6.1	Linearidade.	40
4.2.6.2	Faixa linear de trabalho.	40
4.2.6.3	Sensibilidade.	40
4.2.6.4	Seletividade.	41
4.2.6.5	Limite de detecção (LD).	41
4.2.6.6	Limite de quantificação (LQ).	41
4.2.6.7	Exatidão (teste de recuperação).	42
4.2.6.8	Precisão.	42
4.2.7	Análise de cor por transmitância.	42
4.2.8	Análise estatística.	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	45
5.1	Determinação do teor de umidade das amostras.	45
5.2	Avaliação do Método Cromatográfico.	46
5.3	Validação do Método.	51
5.3.1	Linearidade.	51
5.3.2	Faixa linear de trabalho.	53
5.3.3	Sensibilidade.	54
5.3.4	Seletividade.	54
5.3.5	Limite de detecção.	56
5.3.6	Limite de quantificação.	56
5.3.7	Exatidão.	57
5.3.8	Precisão.	59
5.3.9	Sumário dos dados para validação do método cromatográfico.	61
5.4	Teores de filoquinona (vitamina K ₁) em hortaliças folhosas coletadas na CEAGESP.	62

5.4.1	Avaliação dos resultados da quantificação da filoquinona (vitamina K ₁) em amostras coletas na CEAGESP.	66
5.5	Avaliação da cor das amostras coletadas na CEAGESP.	90
5.6	Avaliação dos teores da filoquinona (vitamina K ₁) em amostras coletadas na CEAGESP em comparação aos valores da USDA.	97
6	CONCLUSÕES.	102
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	103

1. INTRODUÇÃO

Vitamina K é o nome genérico dado a diversas substâncias do grupo das quinonas, que são lipossolúveis e conhecidamente necessárias à coagulação normal do sangue. Geralmente a deficiência dessa vitamina está associada à má absorção de lipídeos ou destruição da flora intestinal por terapias antibiótica contínua ou anti-inflamatória. A vitamina K tem sido investigada, também pelo seu possível papel na manutenção da saúde óssea e vascular através de proteínas dependentes de vitamina K (BEULENS et al., 2013; BOOTH et al., 2012; PENTEADO, 2003; BOOTH; SUTTIE, 1998; BOOTH; DAVIDSON; SADOWSKI, 1994).

As formas naturais da vitamina K são: a filoquinona e as menaquinonas, sendo estas últimas sintetizadas por bactérias da flora intestinal, conhecidas como (menaquinona-n) ou vitamina K₂. A filoquinona ou vitamina K₁ é encontrada em alimentos de origem animal e vegetal, mas é o único análogo da vitamina presente em plantas, sendo encontrada em hortaliças e óleos vegetais, fontes predominantes da vitamina (MICHELAZZO; COZZOLINO, 2007).

Diversos questionamentos existem sobre as recomendações das quantidades de ingestão adequada da Vitamina K, determinadas pela *National Academy of Sciences* em 1989 e ainda vigorando nos dias atuais como referência em vários países. Entretanto, estudos epidemiológicos indicam que estas recomendações devem ser reavaliadas, pois os valores estabelecidos não suprem as necessidades diárias de pessoas com idades entre 60-80 anos, que precisam ingerir maiores quantidades da vitamina para boa manutenção da saúde óssea (BOOTH et al., 2003a; BOOTH et al., 2003b, DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001; FERLAND; SADOWSKI, 1992).

Desde 1992, os autores Ferland e Sadowski, já mostravam que a relação entre a ingestão dietética de vitamina K e o estado nutricional de pacientes vem sendo inadequadamente investigada, em função da insuficiência de dados precisos e confiáveis sobre composição da vitamina em alimentos e bebidas.

Atualmente, a utilização de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem facilitado determinações rotineiras dos análogos da vitamina K. A combinação dessa técnica com pré-tratamentos das amostras, pós-coluna de redução e detecção por fluorescência vem sendo utilizados em diversos procedimentos para obtenção de resultados mais confiáveis (KIENEN, et al.; 2008; RETO et al., 2007; PÉREZ-RUIZ et al., 2007; VARDAS et al., 2006; PENTEADO, 2003; JAKOB; EMALFA, 2001).

O levantamento feito pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) através da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) 2008-2009 em estudo de Análise de Consumo Alimentar Pessoal no Brasil constatou insuficiência no consumo de hortaliças e aumento no consumo de óleos e gorduras, na dieta, sendo esses dois grupos as principais fontes de filoquinona (vitamina K₁), juntos totalizam mais de 80% de toda a vitamina ingerida (IBGE, 2011).

No Brasil, ainda não se dispõe de tabelas com a dosagem de filoquinona de alimentos nacionais, havendo a necessidade de recorrer aos dados das literaturas internacionais. Em pesquisas envolvendo a avaliação do estado nutricional do indivíduo, relativo à vitamina, este procedimento pode conduzir a resultados que não refletem nossa realidade, uma vez que estudos têm mostrado as influências geográficas nos teores da filoquinona nos alimentos analisados. Há, portanto a necessidade de análises do teor de vitamina K em alimentos cultivados em solo brasileiro para uma maior precisão dos dados, visando colaborar com pesquisas futuras, além de contribuir com dados para Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA)/USP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico da vitamina K

A vitamina K foi descoberta primeiramente por Henrik Dam em 1929, como um fator anti-hemorrágico, capaz de restabelecer alterações sanguíneas observadas em galinhas, alimentadas com dietas livres de gordura. O nome vitamina “K” deriva da primeira letra da palavra dinamarquesa “*Koagulation*”. Esta vitamina não era descrita como um nutriente essencial antes de meados de 1930 e seu papel metabólico só foram elucidados em 1974, quando o γ -carboxiglutamato (Gla) foi encontrado nas proteínas dependentes de vitamina K, um pequeno grupo de proteínas com propriedades ligantes de cálcio (denominadas proteínas Gla) (MICHELAZZO; COZZOLINO, 2007; PENTEADO, 2003; BOOTH; SUTTIE, 1998; UDAGAWA; NAKAZOE; MURAI et al., 1996; FERLAND; SADOWSKI, 1992).

2.2. Estrutura química da vitamina K

A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel que ocorre em duas formas biologicamente ativas: a vitamina K₁ (filoquinona) e a vitamina K₂ (menaquinona). Os compostos com atividade de vitamina K possuem como principal característica um anel 2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona. Pode ocorrer em plantas como filoquinona forma mais comum, que apresenta a estrutura de um fitilo saturado, com 20 carbonos de cadeia lateral derivado de quatro unidades de isoprenóides (PEREZ-RUIZ et al., 2007). A vitamina K, está presente em legumes de folhas verdes e óleos vegetais ou é sintetizada por bactérias da flora intestinal, como menaquinonas encontradas em produtos de origem animal como, carnes, ovos e queijos (BEULENS; BOTS; AT SMA, 2009). Há várias menaquinonas, e por isso são denominadas MK-n (menaquinonas-n) onde o n representa o número de resíduos isoprenóides na cadeia lateral. As menaquinonas naturais variam de MK₄ a MK₁₃. A menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) ou vitamina K₃ não é um

composto naturalmente encontrado na natureza, mais é facilmente convertida à MK-4 nos tecidos dos animais, tornando-se biologicamente ativa (SHEARER; NEWMAN, 2008; KNAPEN; NSCHURGERS; VERMEER, 2007; MICHELAZZO; COZZOLINO, 2007; PENTEADO, 2003).

As estruturas das fórmulas biologicamente ativas podem ser observadas nas **FIGURAS 1.1., 1.2. e 1.3.**

Figura 1.1- Estrutura química da filoquinona (vitamina K_1)

Figura 1.2- Estrutura química da menaquinona (vitamina K_2)

Figura 1.3- Estrutura química da menadiona (vitamina K_3)

2.3. Função da vitamina K no metabolismo

O papel biológico mais conhecido da vitamina K é de cofator para a reação de carboxilação específica que transforma resíduos seletivos de ácido glutâmico em resíduos de ácido gama carboxiglutâmico (Gla) em um número limitado de proteínas. Essa reação é catalisada pela enzima microsomal, γ -glutamil ou vitamina K-carboxilase dependente (Gla). Estas proteínas no plasma são: protrombina (fator II de coagulação) e pró-coagulantes (fatores VII, IX e X). Como as formas sub- γ -carboxiladas perdem a atividade biológica, na deficiência em vitamina K observa-se aumento do tempo de protrombina e, nos casos mais graves, eventos hemorrágicos (MICHELAZZO; COZZOLINO, 2007; BOOTH; DAVIDSON; SADOWSKI, 1994; ISSHIKI et al., 1988).

2.4. Avanços das pesquisas sobre metabolismo da vitamina K

Além do seu clássico papel associado à coagulação sanguínea, os avanços nas pesquisas sobre o metabolismo da vitamina K permitiram descobertas de atuação da vitamina no metabolismo ósseo e outros tecidos como os dos sistemas cardiovasculares, sendo evidenciado seu importante papel tanto no desenvolvimento precoce do esqueleto, quanto na manutenção do osso sadio, além da atuação na prevenção de doenças crônicas (reduz o risco de doença cardíaca) e propriedades antioxidantes. Estas descobertas levaram a um renovado interesse nos métodos de avaliação do estudo no indicador biológico da vitamina K e suas necessidades (BEULENS et al., 2013; BOXMA et al., 2012; THEUWISSEN et al., 2012; BOUNJOUR et al., 2009; SUMMEREN et al., 2009 e 2008; BOOTH et al., 2008; JOUNGHE et al., 2008; HARRINGTON et al., 2007; O'CONNOR et al., 2007; OTLES; CAGINDI, 2007; ELDER et al., 2006; SHEARER; BOLTON-SMITH, 2000; OSLON, 2000; BOOTH; DAVIDSON; SADOWSKI, 1994; MOUSSA et al., 1994).

Atualmente são bem definidos os papeis de seis proteínas dependentes da vitamina K atuando no bom funcionamento da coagulação sanguínea.

Recentemente descobertos diversos grupos de proteínas dependentes de vitamina K, que não tem conexão com a coagulação sanguínea, mas estão implicados na homeostase do cálcio e na integridade vascular (ALJARALLAH et al., 2012; TROUNG; BOOTH, 2011; OOSTENDE; WIDHALM; BASSET, 2008; INDYK; WOOLLARD, 1997).

2.5. Proteínas dependentes da vitamina K em tecidos ósseos

Proteínas contendo Gla são conhecidas por ocorrerem em um grande número de tecidos e órgãos como ossos, rins, placenta, pâncreas, vesícula e pulmões. Na maioria dos tecidos, essas proteínas ainda não foram totalmente caracterizadas, com exceção a proteína do osso chamada osteocalcina ou proteína Gla do osso. É uma proteína de baixo peso molecular, com três resíduos de Gla, produzida por osteoblastos durante a formação da matriz óssea. É uma das mais abundantes proteínas não colagenosas na matriz extracelular do osso; sua dosagem no sangue constitui importante marcador biológico da atividade osteoblástica. A osteocalcina serve como matriz protéica para nova formação óssea. O ácido gama carboxiglutâmico na osteocalcina liga íons Ca para prover a calcificação normal do osso. Na deficiência em vitamina K, a γ -carboxilação não ocorre e a calcificação do osso fica prejudicada. Uma segunda proteína isolada do osso e estruturalmente semelhante à osteocalcina, a proteína Gla da matriz, também é dependente da vitamina K e seu papel fisiológico não é conhecido. Essas proteínas têm recebido mais atenção ultimamente porque possivelmente têm papel na prevenção da osteoporose e aterosclerose (KNAPEN et al., 2012; THEUWISSEN et al., 2012; TROUNG; BOOTH, 2011; NOVOTNY et al., 2010; O'CONNOR et al., 2010; BONJOUR et al., 2009; SHEA et al., 2008; SUMMEREN et al., 2008; TSUGAUWA et al., 2008; MICHELAZZO; BUGEL et al., 2007; COZZOLINO, 2007; O'CONNOR et al., 2007; DAMON et al., 2005; KAMAO et al., 2005; PENTEADO, 2003; PETERSON et al., 2002; DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001).

2.6. Osteoporose

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada por um defeito na remodelação óssea e na perda dos minerais normalmente presentes na estrutura óssea. A massa óssea máxima é atingida na idade adulta jovem entre 18-25 anos; após os 40 anos se inicia a fase de perda óssea lenta em ambos os sexos e continua a uma taxa de 0,5-1% ao ano com o avanço da idade. Nas mulheres após a menopausa, há uma taxa adicional de perda óssea de aproximadamente 2-3% ao ano por causa da diminuição da concentração do estrogênio associado com o envelhecimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a osteoporose está atrás apenas das doenças cardiovasculares como um problema de saúde mundial. Nos Estados Unidos da América a osteoporose é responsável por 1,2 milhões de fraturas anualmente sendo as mais comuns as de vértebras, rádio e quadril. No Brasil, atualmente, a osteoporose atinge três milhões de pessoas (FENAPCO, 2012). A causa da fratura na osteoporose é a fragilidade do osso, causada por uma redução da densidade óssea. O risco de fratura é determinado pela densidade mineral óssea (DMO) independente da idade. Na ausência de trauma grave, as fraturas não ocorrem até a DMO cair abaixo do linear de fratura 1 g/cm^2 abaixo do topo do pico da densidade óssea que é $1,4 \text{ g/cm}^2$, unidade esta considerada normal para jovens adultos saudáveis. Novas reduções da DMO abaixo do limite de fratura vão aumentar o risco de fratura. DMO inadequada em jovens adultos é uma importante causa futura para se adquirir a doença por combinação genética e fatores nutricionais (ALJARALLAH et al., 2012; OLSON, 2000; LANHAM-NEW, 2008; BINKLEY; SUTTIE, 1995).

2.7. Vitamina K e saúde cardiovascular

O crescente risco de doença cardiovascular associado com a aterosclerose que é uma doença causada em parte pela calcificação da artéria coronária. A proteína da matriz de ácido γ - carboxiglutâmico, dependente de vitamina K, é expressa no músculo liso vascular das células, que estão envolvidos com o

processo de calcificação nas artérias coronárias. Em ratos, o antagonismo da vitamina K com a varfarina inibe a carboxilação da vitamina K-dependente de proteínas da matriz de ácido γ - carboxiglutâmico, o que leva a calcificação arterial. Além disso, foi demonstrado que dietas ricas em vitamina K podem reverter à calcificação da aorta e melhorar a sua elasticidade em ratos tratados com varfarina. Em humanos, o papel potencial da ingestão de vitamina K na proteção contra a calcificação vascular é limitado. Um estudo de ensaio randomizado e controlado em mulheres na pós-menopausa avaliou o efeito da suplementação de filoquinona, cálcio e vitamina D e verificou uma melhoria da elasticidade na artéria carótida e complacência em comparação com a suplementação sem filoquinona. Mecanismos subjacentes de como a suplementação de vitamina K desempenha um papel na redução de doenças cardiovasculares ainda precisam ser elucidados, e outros estudos são necessários para determinar se e como as diferentes formas de vitamina K têm eficiência variável em redução do risco de doença cardiovascular (BEULENS et al., 2013; BOOTH, 2012; TROUNG; BOOTH, 2011; SOUZA, 2011).

2.8. Antagonistas da vitamina K

Como já é conhecido, além da ingestão energética total, os nutrientes que promovem a síntese óssea incluem o cálcio, a vitamina C que é necessária para a produção e manutenção do colágeno participando da hidroxilação da prolina formando a hidroxoprolina (PENTEADO, 2003) e a vitamina D. Entretanto, atualmente diversos estudos epidemiológicos utilizando marcadores biológicos correlacionando o estado nutricional do indivíduo relativo a vitamina K, vem mostrando que dietas pobres nesta vitamina e fatores esporádicos como, tabagismo, alcoolismo, sedentarismo, fatores genéticos, uso de drogas anticonvulsivantes e anticoagulantes, além da ingestão de altas doses de suplementos antagônicos a vitamina K como as vitaminas A e E, estão sendo associados com risco crescente de fraturas nos quadris e perdas minerais ósseas em indivíduos com idade avançada. Distúrbios que exacerbam a osteoporose

incluem doenças como, hipertireoidismo, hiperparatireoidismo, hipogonadismo, e má absorção. (ALJARALLAH et al. 2012; THEUWISSEN et al., 2012; NIMPTSCH et al., 2009; TSUGAWA et al., 2008; TROY et al., 2007; KAMAO et al., 2007; BOOTH et al., 2004; BOOTH et al., 2003a e 2003b; DUMONT et al., 2003; MCKEOWN et al., 2002; SHEARER; BOLTON-SMITH, 2000; OLSON, 2000; BOOTH; DAVIDSON; SADOWSKI. 1994).

2.9. Fontes de vitamina K

A forma predominante de vitamina K nos alimentos é a filoquinona. A vitamina K está amplamente distribuída em alimentos de origem animal e vegetal, variando de 1µg por 100 mL no leite a 400 µg por 100 g no espinafre e outras hortaliças (DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001), sendo que os teores de *filoquinona* em vegetais verdes aumentam durante a maturação da planta. As diferenças nos teores de filoquinona em um dado vegetal de acordo com a localização geográfica sugerem que os teores dessa vitamina podem ser influenciados pelas condições de crescimento, solo e clima (DAMON et al., 2005; BOOTH; SADOWSKI; PENNINGTON, 1995). Raízes, bulbos, tubérculos, cereais e frutas são fontes pobres em vitamina K e os produtos de origem animal, como carne, peixes e produtos lácteos, contêm baixos teores de filoquinona, mas significativos teores de menaquinonas. Alguns óleos vegetais, incluindo a canola, soja e óleo de oliva, são ricos em filoquinona (PENTEADO, 2003).

Quanto à vitamina K sintetizada pelas bactérias, sabe-se que o intestino humano contém grandes quantidades de bactérias produtoras de menaquinona; contudo, sua importância nutricional não é clara. A extensão e o mecanismo de absorção dessas menaquinonas, no intestino grosso, aparentemente são limitados, embora seja conhecido que o fígado humano apresenta quantidades significativas dessa forma de vitamina (BOOTH; SUTTIE, 1998). Binkley e Suttie (1995) relatam que ao contrário do que se conhecia, as menaquinonas são importantes na nutrição humana, porém contribuem relativamente pouco para suprir a necessidade de vitamina K no organismo, sendo essencial a ingestão

desta vitamina através da dieta. Os grupos de alimentos que mais contribuem para suprir as necessidades de vitamina K são os grupos dos óleos e gorduras e das hortaliças, sendo juntos, responsáveis por até 80% da ingestão total. Os vegetais folhosos verdes escuros correspondem a 40-50% da ingestão total de vitamina K sendo que para os indivíduos jovens adultos é de aproximadamente 80µg de filoquinona/dia e para os idosos é de aproximadamente 150µg de filoquinona/dia. Tais vegetais são as principais fontes de vitamina K, podendo suas concentrações chegar a 440µg vitamina K₁/ 100g de alimentos (BOOTH et al., 2012; TROUNG; BOOTH, 2011; BOOTH; SUTTIE, 1998).

2.10. Aspectos nutricionais da vitamina K

O feijão, importante alimento da dieta dos brasileiros, foi identificado como alimento que contribui significativamente para suprir as necessidades de vitamina K (DÔRES et al., 2000). Por outro lado, o fígado de ruminantes como o de vaca é um alimento que contém concentrações elevadas de algumas menaquinonas (MK-_{7,11,12,13}), que parecem ser de significância nutricional (variando de 10-20 µg por 100 gramas), mas em função de ser um alimento de consumo esporádico pela maioria da população, o impacto dessas concentrações na nutrição humana parece ser pequeno. Foi observado que vários queijos contêm entre 39 - 51 µg/100 g de menaquinonas MK-₈ e MK-₉. A MK-₇ é principalmente produzida pela fermentação com bactérias (*bacillus subtilis natto*) e está presente em tradicionais produtos japoneses fermentados a base de soja conhecido como natto que contém quantidades elevadas de MK-₇ (998 µg/100 g) além de MK-₈ (35 - 84 µg/100 g) o que pode ser de importância nutricional para as populações que consomem estes tipos de produtos (BOOTH, 2012; KNAPEN et al., 2012; SUMMEREN et al., 2009). As concentrações de menaquinonas em outros órgãos animais (rim, coração e músculo) são muito baixas, nutricionalmente insignificantes (DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001).

A recomendação de ingestão adequada (*Adequate Intake – AI*), determinada pela *National Academy of Sciences* de filoquinona é de 120 µg/dia para homens com mais de 18 anos e 90 µg/dia para mulheres com mais de 18 anos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001). Porém, estudo realizado por Booth et al.(2003a) mostrou que mulheres com idade entre 60-80 anos necessitam de maior ingestão de vitamina K do que a recomendada. Entretanto, até o momento, as quantidades necessárias para humanos de filoquinona são baseadas somente na sua clássica função de coagulação. Com as descobertas sobre atuação da vitamina K em outros tecidos, pesquisadores foram forçados a estudar o estado nutricional da vitamina sobre nova perspectiva (ALJARALLAH et al., 2012; FERLAND; SADOWSKI, 1992). Em estudos epidemiológicos tem sido demonstrado que as necessidades de vitamina K podem ser suficientes para manter a coagulação sanguínea normal, porém são sub-ótimas para o osso (THEUWISSEN et al., 2012; SUMMEREN et al., 2010; KAMAO et al., 2007). Se, como argumentado por diversos autores, as necessidades de vitamina K para função óssea são maiores, o grande desafio para pesquisadores será determinar se essa demanda “extra” pode ser quantificada precisamente (DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001). No **QUADRO 1** estão apresentados os teores da vitamina K para a Ingestão Adequada / *Adequate Intake (AI)* para cada faixa etária. Esses valores são baseados em seu papel na manutenção da regulação da coagulação sanguínea.

Quadro 1 – Ingestão dietética de referência para a vitamina K

Indivíduos	AI (µg/ dia) homens	AI (µg/dia) mulheres
0 a 6 meses	2,0	2,0
7 a 12 meses	2,5	2,5
1 a 3 anos	30	30
4 a 8 anos	55	55
9 a 13 anos	60	60
14 a 18 anos	75	75
19 a 50 anos	120	90
51 a 70 anos	120	90
Acima de 70 anos	120	90

Fonte: Institute of Medicine (IOM), 2001.

2.11. Métodos de análise da vitamina K

A relação entre a ingestão dietética da vitamina K e o indicador biológico do indivíduo relacionado à vitamina, tem sido inadequadamente investigada em função da falta de bases de dados precisos e confiáveis sobre quantidade da vitamina contida em alimentos e bebidas (FERLAND; SADOWSKI, 1992). A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem facilitando a determinação de vitamina K nos mais diversos alimentos, contribuindo significativamente com as de tabelas de composição de alimentos disponíveis (BOOTH; SUTTIE, 1998, ISSHIKI et al., 1988; JACOB; ELMALDFA, 1996; GAO; ACKMAN, 1995; MOUSSA et al., 1994; ZONTA; STANCHER, 1985); contudo, ainda não se dispõe de tabelas com a dosagem de filoquinona em alimentos brasileiros (DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001).

Os primeiros resultados da vitamina K contidos em alimentos foram obtidos por bioensaios. Entretanto, foram observadas inúmeras variáveis no decorrer destas análises que afetavam nos resultados finais para a estimativa da vitamina K, sendo considerada uma análise mais qualitativa do que quantitativa (DUMONT et al., 2003; BOOTH; DAVIDSON; SADOWSKI. 1994). Métodos analíticos biológicos, químicos e cromatográficos têm sido usados, como a cromatografia em camada delgada e cromatografia a gás (CG) sendo esta usada durante 1960 e 1970, mas tem apresentado longos tempos de retenção acima de 20 minutos e altos limites de detecção acima de 0,1 µg/mL (RETO et al., 2007).

2.12. Cromatografia líquida de alta eficiência

Nesta última década, a vitamina K contida em diversos alimentos tem sido analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este método está sendo considerado mais sensível e preciso e tem contribuído para facilitar o desenvolvimento nas análises rotineiras, determinando as concentrações de filoquinona e menaquinonas em diversos alimentos que contêm quantidades muito pequenas, substituindo bioensaios e outras técnicas menos precisas. Deste modo, tem sido possível a construção de tabelas com teores de vitamina K em alimentos (KIENEN, et al.; 2008; OOSTENDE; WIDHALM; BASSET, 2008; OTLES; CAGINDI, 2007; PÉREZ-RUIZ et al., 2007; RETO et al., 2007; ELDER et al., 2006; VARDAVAS et al., 2006; PENTEADO, 2003; JAKOB; EMALFA, 2000). No **QUADRO 2** estão apresentados dados da literatura internacional sobre os teores de vitamina K de alguns alimentos, determinados pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Quadro 2 – Teores de filoquinona (Vitamina K₁) de alguns alimentos, na base úmida.

Alimentos	Vitamina K₁ µg/100g de alimento
Espinafre	380
Brócolos	180
Couve de bruxelas	177
Repolho	145
Alface	122
Aspargo	60
Feijão verde	33
Couve-flor	20
Cenoura	10
Tomate	6
Batata	1
Óleo de soja	193
Óleo de canola	127
Óleo de algodão	60
Óleo de oliva	55
Óleo de milho	3
Margarina	42
Manteiga	7
Pão	3
Fígado	5
Ovo	2
Carne fresca	<1
Peixe fresco	<1
Leite integral	<1
Molho de salada	100
Maionese	41
Café	38
Laranja	1
Morango	10
Banana	2
Quiabo	40
Ervilha	20
Cenoura	10
Pepino	20

Fonte: BOOTH; SUTTIE, 1998

2.12.1. Extração da vitamina K de alimentos

O método (CLAE) tem sido associado a diversas técnicas de pré-tratamento para isolar, purificar e concentrar a vitamina K retida das matrizes dos alimentos. As técnicas de pré-concentração incluem Extração Líquido-Líquido (ELL), Extração por Fase Sólida (EFS) e Micro-Extração por Fase Sólida (MEFS). O método cromatográfico inclui ainda etapas de derivatização, com detecção por

fluorescência combinada com redução pós-coluna, com a finalidade de melhorar a detecção do sinal e a resolução entre os picos (RETO et al., 2007; ELDER et al., 2006; JAKOB; EMALFA, 2000).

2.12.2. Detecção da vitamina K

A detecção fluorimétrica tem sido amplamente utilizada nas análises da vitamina K, uma vez que permite acompanhamento mais seletivo e sensível, sem a interferência de substâncias que podem ser detectadas por radiação Ultra-violeta (UV) (PÉREZ-RUIZ et al., 2007; INDYK; WOOLLARD, 1995). A filoquinona pode ser detectada fotometricamente, pois o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) é de 19.000 na região 240-270 nm, sendo satisfatória em vegetais verdes e formulações infantis fortificadas com vitamina K. Nenhum dos homólogos naturais da vitamina K apresenta fluorescência. Naturalmente eles têm que sofrer redução que é reversível entre as formas quinona e hidroquinona da filoquinona utilizando diferentes procedimentos de redução pós-coluna. Os produtos de redução das hidroquinonas são altamente fluorescentes. Entre os métodos de redução mais utilizados estão, redução química com zinco metálico, óxido de platina e borohidreto de sódio, redução fotoquímica e colorimétrica (OTLES; CAGINDI, 2007; PÉREZ-RUIZ et al., 2007; KAMAO et al., 2005; PENTEADO, 2003; PÉREZ-RUIZ et al., 1999; MACCREHAN; SCHÖNBERGER, 1995; HAROON; BACON, 1987).

A análise cromatográfica utilizando sistemas de fase normal e coluna de sílica facilita a separação do isômero *cis* (inativo) da filoquinona, do isômero *trans* (ativo). Em formulações infantis, a determinação de ambos os isômeros *cis* e *trans* têm sido realizada, com detecção fotométrica a 254 nm. Os sistemas de cromatografia líquida de fase reversa têm separado picos de vitamina K, porém não separam os isômeros *cis* e *trans* (PENTEADO, 2003).

2.13. Validação do método de análise

O desenvolvimento de um novo método analítico ou a adaptação ou aplicação de um método conhecido envolve um processo de validação que demonstre a sua eficiência em usos de rotina e tem por objetivo assegurar que o método utilizado seja adequado ao que se propõe identificar ou quantificar (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009; LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004, CHASIN et al., 1998).

Vários autores definem validação de método, podendo ser citadas as seguintes: ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado (RIBANI et al., 2004). O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) define validação como a comprovação, através do fornecimento de evidências objetivas, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos (INMETRO, 2008). Esta é a definição que consta na NBR ISO 9000. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera que “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003).

Na validação de métodos cromatográficos, os parâmetros analíticos normalmente determinados são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, faixa linear, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

2.14. Avaliação nutricional da população brasileira

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE realizou um levantamento sobre a evolução da disponibilidade domiciliar de alimentos e do

estado nutricional da população adulta brasileira entre 1974-1975 a 2002-2003, investigada através dos hábitos de consumo. A apresentação dos resultados **QUADRO 3.** indicou padrões diversificados de consumos alimentares, devido a situação urbana ou rural do domicílio, grandes regiões fisiográficas e classes de rendimentos, sendo que o rendimento familiar indicou efeito sobre a maioria dos alimentos da dieta. O estudo aponta como características negativas, dos padrões de consumo alimentar evidenciadas em todo o País e em todas as classes de rendimento, os teores excessivos de açúcar nas dietas e consumo insuficiente de frutas e hortaliças. Nas regiões economicamente mais desenvolvidas (Sul, Sudeste e Centro-Oeste) e, de modo geral, no meio urbano e entre famílias com maior rendimento, além do consumo insuficiente de frutas e hortaliças e do consumo excessivo de açúcar, há consumo excessivo de gorduras em geral e consumo excessivo de gorduras saturadas (IBGE, 2009).

O **QUADRO 3** mostra a evolução da disponibilidade domiciliar de alimentos no conjunto das áreas metropolitanas brasileiras como: Belém, Fortaleza, Salvador, Belo Horizonte, Rio de Janeiro, São Paulo, Curitiba, Porto Alegre, Distrito Federal e Município de Goiânia entre 1974-1975 a 2002-2003.

Quadro 3 – Evolução da participação relativa de alimentos e grupos de alimentos no total de calorias determinado pela aquisição alimentar domiciliar em algumas Regiões Metropolitanas Brasileiras.

Alimentos e Grupos de alimentos	Evolução da participação relativa, por anos da pesquisa (%)			
	1974-1975	1987-1988	1995-1996	2002-2003
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Cereais e derivados	37,26	34,72	35,04	35,34
Arroz polido	19,09	16,20	16,02	14,71
Pão francês	10,03	8,02	8,31	8,76
Biscoitos	1,13	1,94	2,69	3,47
Macarrão	3,25	2,54	2,72	3,26
Farinha de trigo	1,08	2,15	1,83	1,57
Outros	2,68	3,87	3,46	3,56
Feijão e outras leguminosas	8,13	5,87	5,71	5,68
Raízes, tubérculos e derivados	4,85	4,10	3,58	3,34
Batata	1,49	1,25	1,01	0,88
Mandioca	0,21	0,16	0,17	0,20
Outros	3,15	2,69	2,41	2,26
Carnes	8,96	10,46	12,98	13,14
Bovina	4,43	4,94	5,90	5,43
Frango	1,55	2,52	3,39	3,22
Suína	0,97	0,92	0,67	0,86
Peixes	0,82	0,58	0,46	0,48
Embutidos	1,05	1,49	2,54	3,04
Outras	0,12	0,01	0,02	0,10
Leites e derivados	5,93	7,95	8,20	8,09
Leites	4,90	6,26	6,31	5,17
Queijos	0,85	1,09	1,37	1,95
Outros	0,18	0,60	0,52	0,98
Ovos	1,15	1,31	0,90	0,18
Frutas e sucos naturais	2,16	2,66	2,58	2,35
Bananas	0,82	0,92	0,73	0,85
Laranjas	0,62	0,74	0,64	0,28
Outras	0,72	0,99	1,21	1,21
Verduras e legumes	1,14	1,15	1,00	0,92
Tomate	0,24	0,19	0,19	0,19
Outros	0,90	0,96	0,81	0,73
Óleos e gorduras vegetais	11,62	14,61	12,55	13,45
Óleo de soja	8,88	11,43	10,19	1,09
Margarina	2,01	2,54	1,80	2,60
Outros	0,73	0,64	0,57	0,77
Gordura animal	3,04	0,95	0,77	1,08
Açúcar e refrigerante	13,78	13,39	13,86	12,41
Açúcar	13,36	12,55	12,51	10,29
Refrigerantes	0,43	0,85	1,35	2,12
Bebidas alcoólicas	0,30	0,51	0,63	0,62
Oleaginosas	0,10	0,15	0,13	0,21
Condimentos	0,31	0,58	0,57	0,91
Refeições prontas e misturas industriais	1,26	1,59	1,50	2,29
Total de calorias (Kcal/dia <i>per capita</i>)	1700,00	1894,79	1694,66	1502,02

Fonte: IBGE, 2009.

Os alimentos cuja participação na dieta aumentou neste período incluem carnes em geral (aumento de quase 50%), leite e derivados (aumento de 36%), óleos e gorduras vegetais (aumento de 16%), biscoitos (aumento de 400%) e refeições prontas (aumento de 80%). Os alimentos e grupos de alimentos que mostraram tendência inversa incluem arroz (redução de 23%), feijão e demais leguminosas (redução de 30%), raízes e tubérculos (redução de 30%), peixes (redução de quase 50%), ovos (redução de 84%) e gorduras animal (redução de 65%). Açúcar e refrigerantes mostraram tendências opostas no período, com redução do primeiro (23%) e aumento do segundo (400%). A participação na dieta de frutas e verduras e legumes permaneceu relativamente constante durante todo o período (entre 3% e 4%). Estes resultados evidenciam o declínio na qualidade nutricional na dieta da população brasileira principalmente no que se refere a redução de alimentos com importância nutricional como arroz e o feijão. A tendência de evolução dos padrões de consumo alimentar nas últimas três décadas indica persistência de um teor excessivo de açúcar na dieta (com redução no consumo de açúcar refinado e incremento no consumo de refrigerantes) e aumento no aporte relativo de gorduras em geral e de gorduras saturadas, não evidenciando qualquer tendência de superação dos níveis insuficientes de consumo de frutas e hortaliças. Entre as características consideradas positivas está a adequação do consumo proteínas de origem animal com o aumento no consumo de carnes em geral (IBGE, 2009).

O IBGE em parceria com o Ministério da Saúde (MS) divulgou os mais recentemente resultados da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) 2008-2009 em estudo de Análise de Consumo Alimentar Pessoal no Brasil, que teve por objetivo inferir sobre o perfil de consumo da população brasileira com 10 anos ou mais de idade. A apresentação dos resultados **QUADRO 4.** mostra que ainda ocorrem prevalências de inadequação da ingestão de micronutrientes em todas as grandes regiões do país e refletem a baixa qualidade da dieta do brasileiro. A avaliação dos dados de consumo referentes as faixas etárias de 19 a 60 anos ou mais de idade, mostrou que as maiores inadequações foram para os nutrientes cálcio, vitaminas A, E, C e D e magnésio, tanto para os indivíduos moradores das

áreas urbanas como os das áreas rurais. A ingestão adequada desses nutrientes foi estimada com base nas recomendações propostas nos guias alimentares do Ministério da Saúde e nas recomendações do Instituto of Medicine (IOM). A presente pesquisa permitiu concluir que, o consumo alimentar no Brasil é principalmente constituído por grupo de alimentos que possuem em suas composições altos teores energéticos e baixos teores de nutrientes. Neste grupo o biscoito recheado destacou-se como um dos mais importantes marcadores de consumo não saudável, seguidos pelos refrigerantes, doces, pizza e salgadinhos industrializados, configurando uma dieta de risco para déficits em importantes nutrientes, obesidade e para muitas doenças crônicas não transmissíveis. Entretanto, menos de 10% da população atinge as recomendações de ingestão adequada para as frutas, verduras e legumes, o consumo de leite também é muito aquém do recomendado, o que se traduz em elevadas inadequações no consumo de vitaminas e cálcio. A recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Guia Alimentar Brasileiro para o consumo de frutas, legumes e verduras que é de 400 g por dia não é atingida nem em 90% da população, enquanto que as medianas de consumo de sucos somadas ao de refrigerantes são maiores que 120 g diárias. Esse estudo alerta para mudanças imediatas visando correções na dieta brasileira e indica trocar alimentos calóricos e com baixos teores de nutrientes por frutas, verduras, leguminosas, leite, grãos integrais, oleaginosas, vísceras, peixes, todos eles produzidos no País (IBGE, 2011).

O **QUADRO 4** mostra os resultados da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) em estudo de Análise de Consumo Alimentar Pessoal no Brasil, realizado através de inquérito alimentar, aplicado em indivíduos com 10 anos ou mais de idade, moradores de todas as regiões do país (Norte, Nordeste, Sudestes, Sul e Centro – Oeste) em zonas rurais e urbanas, no período de 2008-2009.

Quadro 4 – Prevalência de o consumo alimentar e consumo alimentar médio *per capita*, por Grandes Regiões, segundo os alimentos – Brasil - período 2008-2009.

Alimentos	Prevalência de consumo alimentar (%)					Consumo alimentar médio <i>per capita</i> (g/dia)				
	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro Oeste	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro Oeste
Arroz	76,9	80,3	88,5	78,5	89,8	156,6	142,6	175,6	133,8	194,5
Arroz integral	8,1	4,6	2,5	2,6	5,2	19,4	9,8	6,1	3,7	10,9
Preparações à base de arroz	1,2	0,7	1,2	3,3	1,5	2,2	1,4	1,8	6,0	2,8
Milho e preparações	6,3	28,9	6,7	7,7	6,9	8,1	50,9	7,4	12,8	9,2
Feijão	57,7	67,1	80,4	63,8	83,0	142,2	152,0	218,1	147,4	206,2
Feijão verde/corda	0,9	9,8	0,1		0,1	2,1	22,0	0,2		0,2
Preparações à base de feijão	3,5	6,6	1,6	0,7	1,2	11,4	17,9	4,6	2,8	3,7
Outras leguminosas	0,3	1,2	0,8	1,6	0,9	0,4	2,0	0,7	2,6	0,3
Alface	2,7	2,4	11,8	18,4	11,6	1,1	0,6	3,8	9,2	4,6
Couve	2,5	4,1	8,7	6,6	8,4	1,3	2,2	5,1	3,7	5,9
Repolho	0,5	0,3	1,8	4,5	1,9	0,3	0,1	1,1	2,7	0,8
Salada crua	10,2	10,6	17,8	18,2	27,4	9,6	8,8	16,8	17,0	26,6
Outras verduras	1,1	0,6	3,5	3,5	3,0	0,8	0,4	1,9	2,5	1,6
Abóbora	1,2	2,1	2,3	1,1	3,4	1,9	2,3	2,5	1,0	3,9
Cenoura	0,7	0,6	2,3	3,0	1,9	0,2	0,2	1,3	1,3	1,2
Chuchu	0,2	0,3	1,8	1,7	1,1	0,1	0,2	1,2	1,2	0,6
Pepino	0,6	0,5	1,2	2,5	1,1	0,1	0,1	0,3	2,8	0,4
Tomate	3,6	4,7	12,2	11,8	16,1	2,6	3,3	7,9	8,5	11,
Outros legumes	1,6	1,8	8,5	6,1	7,3	1,4	1,1	7,0	4,1	8,2
Batata-doce	0,2	2,3	0,5	1,8	1,0	0,2	5,9	0,9	2,5	1,2
Batata-inglesa	3,9	3,4	17,2	13,1	6,4	5,3	4,0	23,2	18,6	6,8
Batata-inglesa frita	0,2	0,2	1,2	1,2	1,0	0,2	0,1	0,7	0,9	0,4
Mandioca	3,0	3,4	2,0	4,3	5,4	7,7	7,0	3,8	7,9	11,5
Outros tubérculos	0,3	2,5	0,9	0,0	0,3	0,5	2,5	1,0	0,0	0,3
Abacaxi	0,9	1,1	0,9	0,7	1,0	1,7	1,9	1,1	1,0	1,2
Açaí	9,0	0,4	0,4		0,1	28,4	1,1	1,1		0,1
Banana	14,3	14,6	16,9	17,5	13,9	19,9	18,7	18,5	19,2	15,9
Laranja	5,2	5,9	7,8	9,1	5,7	19,5	16,6	22,1	25,7	17,3
Maçã	4,7	3,7	7,6	11,9	7,7	7,8	6,5	12,5	19,4	13,3
Mamão	1,8	2,6	3,4	4,5	3,0	4,3	5,0	6,9	8,8	6,1
Manga	3,1	4,0	1,4	0,7	2,1	8,5	9,0	2,5	1,1	4,6
Melancia	1,9	2,3	1,2	1,6	1,7	5,7	5,4	3,3	3,8	4,2
Tangerina	1,2	0,5	2,1	4,0	1,3	3,5	1,1	4,2	13,0	3,7
Uva	0,5	0,7	0,8	1,2	0,8	0,5	0,9	1,1	2,4	1,0
Salada de frutas	0,9	0,9	1,1	2,1	1,8	1,8	1,5	1,9	3,9	3,6
Outras frutas	5,6	4,9	5,1	5,9	3,9	9,7	8,3	6,7	9,4	5,6
Oleaginosas	1,0	1,0	0,7	1,4	0,5	1,1	0,4	0,2	0,6	0,2
Farinha de mandioca	45,3	18,2	1,8	0,7	1,3	46,2	11,5	0,8	0,2	0,5
Farofa	8,2	4,3	3,8	1,4	4,1	4,4	2,3	1,5	0,6	2,5
Cereais matinais	0,6	1,2	3,0	2,7	2,1	0,3	0,4	1,1	1,0	0,7
Massas	2,0	1,1	2,2	3,3	1,0	7,4	2,7	4,9	8,5	3,6
Macarrão instantâneo	1,4	1,2	2,1	1,4	2,2	4,1	4,0	6,6	4,3	6,3
Macarrão e preparações à base de macarrão	16,7	22,7	14,8	25,6	15,8	29,9	33,4	33,8	56,5	28,6
Pão de sal	53,4	55,0	66,9	73,6	58,8	44,7	56,1	52,1	59,2	43,1
Pão integral	2,1	1,3	1,5	4,3	1,6	1,0	0,6	0,7	2,3	0,8
Bolos	11,9	11,1	13,5	16,0	17,7	11,2	10,5	14,6	17,3	18,6
Biscoito doce	6,8	9,0	9,1	10,1	8,9	3,9	4,6	3,9	3,1	3,6
Biscoito salgado	16,6	20,0	15,8	10,0	12,1	7,4	8,8	6,8	3,9	4,4
Biscoito recheado	3,8	3,9	4,4	4,8	2,3	4,6	5,9	4,2	4,9	1,9
Pães, bolos e biscoitos <i>diet/light</i>	0,4	0,4	0,9	0,9	0,2	0,1	0,2	0,4	0,5	0,1
Carne bovina	47,4	44,4	49,2	50,2	60,4	68,2	57,1	63,2	60,1	88,1
Preparações à base de carne bovina	1,4	0,9	2,7	2,7	2,9	2,6	1,1	3,9	3,4	4,0
Carne suína	2,3	2,0	5,0	6,1	4,8	6,8	4,7	9,7	12,1	11,1
Aves	26,8	29,7	25,4	26,5	27,6	44,4	41,7	32,7	32,8	39,1
Preparações à base de aves	0,7	0,2	0,3	1,5	1,3	0,9	0,5	0,3	2,9	1,9
Peixes frescos e preparações	21,6	9,8	3,5	2,3	2,3	95,0	35,1	11,4	6,8	8,5
Peixes em conserva	0,9	0,9	0,6	0,1	0,3	0,6	0,6	0,4	0,1	0,2
Peixes salgados	1,9	1,1	1,0	0,3	0,2	6,8	3,8	2,6	0,9	0,6

(Continua)

Alimentos	Prevalência de consumo alimentar (%)					Consumo alimentar médio per capita (g/dia)				
	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro Oeste	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro Oeste
Carnes salgadas	2,6	5,0	0,7	0,7	0,8	4,0	7,7	0,8	0,7	0,9
Outros tipos de carne	1,7	1,0	0,1	0,2	0,3	2,2	2,0	0,0	0,4	0,2
Linguiça	2,9	2,7	7,9	4,4	4,0	2,0	1,6	5,1	2,6	2,1
Salsicha	1,7	2,5	4,3	2,8	1,0	1,1	1,6	3,2	1,5	0,5
Mortadela	2,2	3,5	3,9	8,3	3,0	0,9	1,2	1,4	2,5	0,8
Presunto	1,7	1,4	4,2	7,4	4,4	0,4	0,4	1,3	1,8	1,2
Outras carnes processadas	0,4	1,0	1,5	3,9	0,6	0,2	0,4	0,8	1,6	0,3
Vísceras	2,7	2,7	1,7	2,3	2,1	3,9	4,4	1,7	2,8	2,8
Ovos	16,0	22,4	14,6	12,2	11,3	13,3	16,5	9,9	8,9	8,2
Leite integral	6,9	11,9	12,5	13,8	17,1	18,1	33,7	35,8	36,8	45,5
Leite desnatado	0,9	0,9	2,2	2,5	2,2	2,2	2,5	5,7	6,5	6,1
Leite em pó integral	4,6	2,5	0,1	0,1	0,1	1,2	0,7	0,0	0,0	0,1
Preparações à base de leite	5,9	3,0	2,3	0,9	1,6	15,4	7,8	5,2	2,4	3,0
Vitaminas	3,2	4,8	2,7	1,3	2,5	10,4	16,5	8,1	4,2	7,1
Queijos	6,1	10,0	15,2	20,1	11,2	2,2	5,8	8,2	8,3	4,7
Iogurtes	2,2	3,4	4,5	4,9	4,6	6,0	8,6	10,4	12,0	10,3
Outros laticínios	0,3	0,3	0,8	5,4	0,2	0,2	0,4	0,9	3,0	0,4
Laticínios diet/light	0,2	0,2	1,1	0,9	0,3	0,1	0,4	1,7	1,2	0,7
Chocolates	2,6	2,0	4,7	6,2	3,0	2,8	2,2	3,6	5,5	4,1
Achocolatados	1,7	0,9	3,8	3,0	3,4	0,5	0,3	1,2	0,9	0,8
Doces à base de leite	1,9	3,0	3,7	5,4	4,3	3,2	5,4	5,6	5,8	6,4
Doces à base de fruta	1,5	2,4	1,8	8,8	2,6	1,5	2,8	1,1	5,1	1,9
Sorvete/picolé	4,8	3,4	3,6	2,7	3,5	5,9	4,3	5,0	3,2	4,3
Mel/rapadura/açúcar de mesa e outros adoçantes	0,9	2,1	1,2	5,8	1,2	0,4	1,2	0,3	2,2	0,5
Outras doces	13,0	12,6	11,2	12,8	8,3	8,8	9,3	6,7	7,9	6,3
Doces <i>diet/light</i>	0,4	0,4	0,4	1,0	0,5	0,4	0,3	0,3	0,6	0,4
Óleos e gorduras	36,5	31,9	43,0	39,6	27,1	6,3	5,9	7,4	6,9	4,6
Óleos e gorduras <i>diet/light</i>	0,3	0,4	1,3	1,9	0,7	0,0	0,1	0,2	0,3	0,1
Bebidas destiladas	0,4	0,7	0,5	0,9	0,3	2,1	1,9	0,8	2,1	1,0
Cerveja	1,8	1,9	3,8	3,3	3,2	30,8	25,4	35,8	27,8	31,8
Vinho	0,2	0,1	0,8	1,6	0,6	0,7	0,3	1,6	4,6	1,7
Sucos/refrescos/sucos em pó reconstituídos	41,6	40,0	39,5	39,8	38,6	157,1	134,7	146,8	152,7	145,9
Refrigerantes	19,7	16,1	27,0	25,2	24,0	82,8	59,4	111,7	115,8	98,3
Refrigerantes <i>diet/light</i>	0,6	0,4	2,1	2,5	2,2	1,7	1,2	7,1	10,2	6,7
Bebidas lácteas com sabor e adoçadas	4,6	3,5	9,9	6,9	7,3	12,3	10,1	28,0	19,6	18,1
Bebidas à base de soja	0,3	0,2	1,0	0,3	0,8	1,0	0,4	2,6	0,7	2,2
Café	82,8	83,5	76,9	78,3	72,2	195,1	230,4	215,2	220,1	167,8
Chá	3,3	2,7	4,7	16,7	7,1	11,0	6,8	11,6	146,7	28,4
Outras bebidas não alcoólicas	0,8	1,3	0,7	0,6	0,8	2,2	3,9	2,5	1,4	2,6
Pizzas	1,2	1,0	2,3	3,6	2,8	2,5	2,3	4,7	10,1	6,7
Salgados fritos e assados	12,8	8,1	14,1	12,4	18,9	8,1	6,1	12,6	9,5	13,8
Salgadinhos industrializados	0,4	0,6	0,8	1,3	0,5	0,4	0,6	0,7	1,1	0,3
Sanduíches	5,5	4,4	10,2	12,3	6,7	8,3	6,3	14,3	17,8	9,0
Sopas e caldos	12,7	13,6	9,6	11,6	10,6	57,6	60,1	42,3	58,2	37,1
Molhos e condimentos	0,2	0,2	1,1	1,7	0,3	0,0	0,0	0,7	1,0	0,1
Preparações mistas	2,2	2,2	3,0	4,3	3,1	3,9	4,2	4,8	5,6	5,3

Fonte: IBGE, 2011.

Diante do fato do consumo insuficiente de hortaliças pela população brasileira, e sendo que estas são alimentos fontes predominantes de vitamina K, o presente trabalho será conduzido para a análise de algumas hortaliças consumidas no Estado de São Paulo, com a finalidade de avaliar a concentração de vitamina K nelas contidas e correlacionar estes valores a frequência de consumo, além de contribuir com dados para Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TBCA – USP, uma vez que no Brasil ainda não se dispõe de tabelas com a dosagem de filoquinona de alimentos nacionais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

O presente trabalho foi conduzido para determinação do teor da filoquinona (vitamina K₁) de algumas hortaliças *in natura* e submetidas a cocção, produzidas no Estado de São Paulo.

3.2. Objetivos Específicos:

- Validação da metodologia e análise de *filoquinona* em hortaliças folhosas e florais cruas e submetidas a cocção;
- Verificação da relação do teor da vitamina K₁ com a cor, para algumas amostras de hortaliças analisadas cruas e cozidas.
- Comparação dos resultados obtidos com dados da literatura internacional.

4. METODOLOGIA

4.1. Material

4.1.1. Amostras

Para desenvolver o presente trabalho foram escolhidas hortaliças folhosas e florais, fontes importantes de vitamina K₁ e/ou que são comumente consumidas pela população do Estado de São Paulo. As diferentes hortaliças analisadas foram escolhidas após a conclusão de um inquérito alimentar realizado, com adultos e idosos moradores na cidade de São Paulo, o qual visou à análise da ingestão diária de vitamina K (SOUZA, 2011). Desta forma, pudemos definir e analisar as hortaliças mais consumidas por esse grupo, na sua forma *in natura* e/ou processadas por cocção.

As amostras foram adquiridas no período entre janeiro de 2011 a outubro de 2012 diretamente na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), em cujo terminal afluem hortaliças procedentes, na sua maioria, do Interior e Grande São Paulo, favorecendo assim uma amostragem representativa do Estado de São Paulo. No entreposto, através da colaboração da Engenheira Agrônoma Anita de Souza Dias Gutierrez – Chefe do Centro de Qualidade em Horticultura/CEAGESP e de sua equipe técnica foi possível definir o planejamento amostral. Foram escolhidas, como ponto de coleta, as 10 maiores empresas atacadistas, responsáveis por mais de 80% do volume comercializado de cada hortaliça e coletada aleatoriamente uma amostra constituída de aproximadamente: 10 kg de cada uma das seguintes hortaliças: salsa (*Petroselinum crispum*), alface americana (*Lactuca sativa capitata*), alface crespa (*Lactuca sativa* L.), rúcula (*Eruca sativa* L.), escarola (*Cichorium endivia*), repolho verde (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), brócolo ninja (*Brassica oleracea* var. *italica*), espinafre (*Spinacea oleracea* L.), acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.), couve manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*), cebolinha (*Allium fistulosum* L.), agrião (*Nasturtium officinale*), chicória (*Cichorium intybus* L.), brócolo comum (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck), almeirão (*Cichorium intybus* L.), coentro (*Coriandrum sativum* L.), alho-

poró (*Allium ampeloprasum* L.), salsão (*Apium graveolens* L. var. *rapaceum*), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), hortelã (*Mentha longifolia*) e catalonha (*cicharium inlybus*). Os lotes de amostras para análise foram selecionados segundo a integridade das folhas, tamanho (folhas jovens e adultas), intensidade de coloração verde e que não apresentassem sinais de injúria. Procurou-se formar lotes tão semelhantes quanto possível, com relação às características citadas. Foram coletadas 22 diferentes hortaliças folhosas entre os meses de fevereiro 2011 à outubro de 2012. Com este procedimento foi criado um "pool" das amostras de cada tipo de hortaliça sendo verificados os teores da filoquinona (vitamina K₁) em aferição de 3 réplicas a cada momento de amostragem.

Visando a análise da repetibilidade dos dados gerados, essas mesmas hortaliças foram coletadas em diferentes épocas dos anos de 2011 e 2012, no total de sete coletas, procurando sempre que possível obter a amostragem do mesmo fornecedor e região da primeira coleta e/ou anterior. A cada coleta foram registrados o nome do atacadista, a origem do produto, a data de coleta e detalhes do tipo de cultivo, descritos na **TABELA 1**.

Material e Método

Tabela 1 – Caracterização de Coleta na CEAGESP dos Produtos de Hortaliças Verdes Folhosas.

1ª Coleta – Fevereiro / Março 2011 Verão (2011)					
ALFACE AMERICANA (<i>Lactuca sativa capitata</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade/SP Empresa: Pedro Com. Verdura Contato: Roberto – box 280/282 Coleta: 23/02/2011	ALFACE CRESPA (<i>Lactuca sativa</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Cabreúva/SP Empresa: Pedro Com. Verdura Contato: Roberto – box 280/282 Coleta: 23/02/2011	SALSA (<i>Petroselinum crispum</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibiúna/SP Empresa: Matsusako – Vegetais Frescos Coleta: 04/04/2011	RÚCULA (<i>Eruca sativa</i> L.) Sis. cultivo: hidropônica e estufa Local: Ibiúna / SP Empresa: Matsusako – Vegetais Frescos Coleta: 04/04/2011	ESPINAFRE (<i>Spinacea oleracea</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibiúna/SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 04/04/2011	COUVE MANTEIGA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibugraçu/SP Empresa: Boa Safra Contato: Julandir / box: MLP 96 Coleta: 04/04/2011
ACELGA (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade/SP Empresa: Horita Contato: Kátia – box 360 Coleta: 23/02/2011	REPOLHO VERDE (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade/SP Emp.: Celso Tashiichigi Contato: Thiago – box 205/206 Coleta: 23/02/2011	COUVE-FLOR (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Porto Feliz/SP Empresa: Campo Tenente Contato: Seo – box 362 Coleta: 04/04/2011	ESCAROLA (<i>Cichorium endivia</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibiúna/SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 04/04/2011	BRÓCOLO NINJA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>itálica</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Sul de Minas Empresa: Campo Tenente Contato: Seo – box 362 Coleta: 04/04/2011	
2ª Coleta – Abril / Maio 2011 Outono (2011)					
ALFACE AMERICANA (<i>Lactuca sativa capitata</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade/SP Empresa: Pedro Com. Verdura Contato: Roberto – box 280/282 Coleta: 06/06/2011	ALFACE CRESPA (<i>Lactuca sativa</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade/SP Empresa: Pedro Com. Verdura Contato: Roberto – box 280/282 Coleta: 06/06/2011	SALSA (<i>Petroselinum crispum</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibiúna/SP Empresa: Matsusako – Vegetais Frescos Coleta: 06/06/2011	RÚCULA (<i>Eruca sativa</i> L.) Sis. cultivo: hidropônica e estufa Local: Hitapeçerica da Serra Empresa: Folha Verde Contato: Nilo Coleta: 06/06/2011	ESPINAFRE (<i>Spinacea oleracea</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Santa Isabel – Jacarei Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 06/06/2011	COUVE MANTEIGA NÃO FOI ENCONTRADA/ SAZONALIDADE
ACELGA (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Mogi das Cruzes Empresa: Horita Contato: Kátia – box 360 Coleta: 06/06/2011	REPOLHO VERDE (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibiúna Emp.: Celso Tashiichigi Contato: Thiago – box 205/206 Coleta: 06/06/2011	COUVE-FLOR (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Sul de Minas Empresa: Campo Tenente Contato: Seo – box 362 Coleta: 06/06/2011	ESCAROLA (<i>Cichorium endivia</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Santa Isabel – Jacarei Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 06/06/2011	BRÓCOLO NINJA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>itálica</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Sul de Minas Empresa: Campo Tenente Contato: Seo – box 362 Coleta: 06/06/2011	

continua

3ª Coleta - Junho / Julho 2011 Inverno (2011)

ALFACE AMERICANA (<i>Lactuca sativa capitata</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade/SP Empresa: Pedro Com. Verdura Contato: Roberto – box 280/282 Coleta: 15/08/2011	ALFACE CRESPA (<i>Lactuca sativa</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Bragança Paulista Empresa: Pedro Com. Verdura Contato: Roberto – box 280/282 Coleta: 15/08/2011	SALSA (<i>Petroselinum crispum</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibiúna/SP Empresa: Takoish Contato: Claudio - box 349 Coleta: 15/08/2011	RÚCULA (<i>Eruca sativa</i> L.) Sis. cultivo: hidropônica e estufa Local: Hitapeçerica da Serra Empresa: Maçaira Comp. Ltda Contato: Amílcar Maçaira – box 79 Coleta: 15/08/2011	ESPINAFRE (<i>Spinacea oleracea</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 15/08/2011	COUVE MANTEIGA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibuguaçu/SP Empresa: Boa Safra Contato: Julandir / box: MLP 96 Coleta: 15/08/2011
ACELGA (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Mogi das Cruzes Empresa: Horita Contato: Kátia – box 360 Coleta: 15/08/2011	REPOLHO VERDE (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibiúna Emp.: Celso Tashiichigi Contato: Thiago – box 205/206 Coleta: 15/08/2011	COUVE-FLOR (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Alumínio (São Roque/ Ibiúna) Empresa: Campo Tenente Contato: Seo – box 362 Coleta: 15/08/2011	ESCAROLA (<i>Cichorium endivia</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Jacarei (Santa Isabel) Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 15/08/2011	BRÓCOLO NINJA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>itálica</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Alumínio (Sorocaba) Empresa: Campo Tenente Contato: Seo – box 362 Coleta: 15/08/2011	

4ª Coleta- Agosto / Setembro 2011 Primavera (2011)

ALFACE AMERICANA (<i>Lactuca sativa capitata</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade/SP Empresa: Pedro Com. Verdura Contato: Roberto – box 280/282 Coleta: 30/10/2011	ALFACE CRESPA (<i>Lactuca sativa</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Bragança Paulista Empresa: Pedro Com. Verdura Contato: Roberto – box 280/282 Coleta: 30/10/2011	RÚCULA (<i>Eruca sativa</i> L.) Sis. cultivo: hidropônica e estufa Local: Hitapeçerica da Serra Empresa: Maçaira Comp. Ltda Contato: Amílcar Maçaira – box 79 Coleta: 30/10/2011	COUVE MANTEIGA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibiúna Empresa: Boa Safra Contato: Julandir / box: MLP 96 Coleta: 30/10/2011	REPOLHO VERDE (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibiúna Emp.: Celso Tashiichigi Contato: Thiago – box 205/206 Coleta: 30/10/2011	BRÓCOLO NINJA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>itálica</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Indaiatubá Empresa: Campo Tenente Contato: Seo – box 362 Coleta: 30/10/2011
CEBOLINHA (<i>Allium fistulosum</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 30/10/2011	BRÓCOLO COMUM (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda - Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 30/10/2011	AGRIÃO (<i>Nasturtium officinale</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 30/10/2011	CHICÓRIA (<i>Cichorium intybus</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 30/10/2011	ALMEIRÃO (PAO DE AÇÚCAR) (<i>Cichorium intybus</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Saraizópolis Empresa: Boa Safra Contato: Julandir / Box: MLP 96 Coleta: 30/10/2011	

continua

5ª Coleta – Março / Abril 2012 Outono (2012)

CEBOLINHA (<i>Allium fistulosum</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Jarinú / SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 23/04/2012	BRÓCOLO COMUM (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Saraizópolis Empresa: Boa Safra Contato: Julandir - box: MLP 96 Coleta: 23/04/2012	AGRIÃO (<i>Nasturtium officinale</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Mogi da Cruzes Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 23/04/2012	CHICÓRIA (<i>Cichorium intybus</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 23/04/2012	ALMEIRÃO (PÃO DE AÇÚCAR) (<i>Cichorium intybus</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 23/04/2012
ALFACE AMERICANA (<i>Lactuca sativa capitata</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade/SP Empresa: Pedro Com. Verdura Contato: Fábio – box 280/ 282 Coleta: 23/04/2012	COUVE MANTEIGA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Saraizópolis Empresa: Boa Safra Contato: Julandir / box: MLP 96 Coleta: 23/04/2012	BRÓCOLO NINJA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>itálica</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Andrades (Minas Gerais) Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 23/04/2012		

6ª Coleta – Maio / Junho 2012 Inverno (2012)

CEBOLINHA (<i>Allium fistulosum</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Jarinú / SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 02/07/2012	BRÓCOLO COMUM (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Jacarei Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 02/07/2012	AGRIÃO (<i>Nasturtium officinale</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Mogi da Cruzes Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 02/07/2012	CHICÓRIA (<i>Cichorium intybus</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 02/07/2012	ALMEIRÃO (PÃO DE AÇÚCAR) (<i>Cichorium intybus</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 02/07/2012
SALSÃO (<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>rapaceum</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Mogi das Cruzes / SP Empresa: Rio Acima Contato: Marcelo Issau Sato - box 128 Coleta: 02/07/2012	COENTRO (<i>Coriandrum sativum</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Ibuína / SP Empresa: Boa Safra Contato: Julandir - box: MLP 96 Coleta: 02/07/2012	ALHO PORÓ (<i>Allium ampeloprasum</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade / SP Empresa: Rio Acima Contato: Milton Andrade - box 128 Coleta: 02/07/2012	MANJERICÃO (<i>Ocimum basilicum</i> L.) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Jundiaí / SP Empresa: Nivaldo Neve Barbosa Contato: Nivaldo - box 67 e 68 Coleta: 02/07/2012	CATALONHA (<i>cichorium intybus</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Itapeverica / SP Empresa: Graembuense Contato: Alberto - box 60 Coleta: 02/07/2012
				HORTELA (<i>Mentha longifolia</i>) Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade / SP Empresa: Maçaira Ltda Contato: Almicar - box 60 Coleta: 02/07/2012

continua

7ª Coleta - Agosto / Setembro 2012 Primavera (2012)

CEBOLINHA <i>(Allium fistulosum L.)</i> Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Jarinú / SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 10/10/2012	BRÓCOLO COMUM <i>(Brassica oleracea L. var. italica Plenck)</i> Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Jacarei Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 10/10/2012	AGRIÃO <i>(Nasturtium officinale)</i> Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Mogi da Cruzes Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 10/10/2012	CHICÓRIA <i>(Cichorium intybus L.)</i> Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 10/10/2012	ALMEIRÃO (PÃO DE AÇÚCAR) <i>(Cichorium intybus L.)</i> Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Igaratá (Santa Isabel)/ SP Empresa: Jacarei Agr. Com. Ltda Contato: Alexandre - box 200 Coleta: 10/10/2012
SALSÃO <i>(Apium graveolens L. var. rapaceum)</i> Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade / SP Empresa: Rio Acima Contato: Marcelo Issau Sato - box 128 Coleta: 10/10/2012	COENTRO <i>(Coriandrum sativum L.)</i> Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade / SP Empresa: Nivaldo Neve Barbosa Contato: Nivaldo - box 67 e 68 Coleta: 10/10/2012	MANJERICÃO <i>(Ocimum basilicum L.)</i> Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Jundiaí / SP Empresa: Nivaldo Neve Barbosa Contato: Nivaldo - box 67 e 68 Coleta: 10/10/2012	CATALONHA <i>(cicharium inlybus)</i> Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade / SP Empresa: Graembuense Contato: Alberto - box 60 Coleta: 10/10/2012	HORTELA <i>(Mentha longifolia)</i> Sis. cultivo: terra e sol pleno Local: Piedade / SP Empresa: Maçaira Ltda Contato: Almicar - box 60 Coleta: 10/10/2012

4.1.1.1. Preparo e armazenamento das amostras

No dia posterior as coletas das amostras iniciou-se o preparo pré-análise das mesmas, sendo os procedimentos baseados no trabalho dos autores (KAWASHIMA; SOARES, 2003), descritos a seguir:

a) As hortaliças foram primeiramente lavadas em água corrente para remoção de partículas de areia e eliminação das partes injuriadas. Em seguida, foram lavadas com água deionizada. Na secagem o excesso de água dos vegetais foi retirado com auxílio do secador de vegetais (utensílio de cozinha) e a seguir com papel toalha. As partes não comestíveis foram removidas;

b) Para algumas amostras, foram selecionadas as partes de interesse alimentar, sendo: Salsa e Couve (somente as folhas), Couve-Flor e Brócolo Ninja (somente as flores); nas demais amostras utilizou-se todas as partes comestíveis do alimento;

c) Para as amostras onde o consumo se faz na forma crua e/ou cozida, estas foram pesadas e divididas em duas partes iguais, sendo que uma parte sofreu o processo de cozimento, seguindo a metodologia da TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) / UNICAMP (TACO, 2011).

d) Após a limpeza e seleção utilizaram-se todas as amostras coletadas para a homogeneização (cruas e cozidas). Para este processo as amostras foram trituradas, bem misturadas e cerca de 250g foram homogeneizadas utilizando um processador de alimentos (Liquidificador-Electrolux), sem a adição de água, em seguida passados através de uma peneira de 20 mesh - abertura (850 μm). As partes do processador e peneira em contato com as amostras foram tratadas com solução de extran 5% (grau analítico, Merck, Brasil) e 2% de ácido cítrico (grau analítico, Synth, Brasil), lavadas com água ultra-pura (MilliQ plus, Millipore, EUA) e secas em estufa 80° C antes do uso.

e) As amostras homogeneizadas foram armazenadas em potes envoltos com papel alumínio e acondicionadas em freezer (- 18°C) até o momento das análises, que se iniciou logo em seguida a pré-preparação das amostras coletadas.

4.1.1.2. Procedimento de cocção das amostras

Foi utilizado o protocolo padronizado para todas as amostras que sofreram o processo de cozimento, seguindo metodologia baseada nas recomendações da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) / UNICAMP. Amostras da serem processadas por cocção foram adicionadas à água de torneira e fervidas em uma panela de aço inoxidável com capacidade para 4 Litros (1:2, alimentos / água) em fogão convencional marca GE modelo clássico. O tempo de cozimento foi medido quando a água começou a ferver depois de adicionadas as hortaliças, sendo de 10 - 12 minutos para as amostras de folhosas (espinafre, escarola, couve manteiga) e 15-20 minutos para amostras florais (couve-flor e brócolo) sendo que em seguida, as amostras foram escorridas. Todos os procedimentos de cozimento foram realizados em triplicata.

Procedimentos:

1. Pesar amostras de 1 kg;
2. Lavar bem e deixar escorrer a água.
3. Retirar a pele dos talos; separar as flores e os talos limpos.
4. Não adicionar nenhum ingrediente ao alimento.
5. Colocar em uma panela sem tampa com 2 litros de água e levar ao fogo médio para cozinhar por cerca de 20 minutos, ou até que os talos estejam macios.
6. Desprezar a água.
7. Deixar esfriar.

4.1.2. Padrões e reagentes

Foram utilizados os seguintes padrões e reagentes:

- Padrão de Vitamina K₁ (filoquinona; 2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinona / C₃₁H₄₆O₂) - Marca Sigma código V3501-10g – Pureza > 99% - grau bioquímico;

- Padrão Vitamina K₂ (menaquinona-4 / C₃₁H₄₀O₂).- Marca Sigma código V9378-1g – Pureza > 99% - grau bioquímico;
- Acetato de sódio - Grau PA - Marca Merck;
- Diclorometano Grau PA - Marca Synth;
- Diclorometano Grau HPLC – Marca Merck;
- Metanol Grau PA - Marca Synth;
- Metanol Grau HPLC – Marca Merck;
- Ácido acético glacial - Grau PA - Marca Synth;
- Cloreto de zinco - Grau PA - Marca Merck;
- Gás Nitrogênio - Marca Oxilumen
- Gás Hélio Ultra Puro – Marca Oxilumen
- Hexano grau HPLC - Marca Merck;
- Fase Móvel: A fase móvel foi preparada de acordo como os autores Jakob; Elmadfa, 1995 e MAJCHRZAK; ELMADFA, 2001, utilizando diclorometano grau HPLC + metanol grau HPLC e 5 mL de solução metanólica (cloreto de zinco, acetato de sódio e ácido acético). O pH dessa solução foi 4,5. A solução foi filtrada num sistema Millipore utilizando membrana filtrante 0,45 µm FHUPO4700 (soluções orgânicas) da marca Millipore e o ar retirado da solução com auxílio de gás Hélio.
- Solução salina para a fase móvel: Essa solução salina estoque (50 mL) foi preparada utilizando-se 29,2 mL metanol grau p.a., 13,7 g de cloreto de zinco (ZnCl₂), 4,1 g de acetato de sódio (CH₃COONa) e 3,0 g de ácido acético (CH₃COOH).

4.1.3. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Agitador magnético – Marca Quimis;
- Balança analítica – Marca Mettler;
- Phmetro – Marca Micronal (B 474);
- Rota evaporador – Marca RII Buchi

- Banho sonificador – Marca Ultrasonic Cleaner Unique
- Micropipetadores Automáticos Eppendorf;
- Agitador de tubos vortex – Marca Phoenix (mod. AT 56);
- Centrífuga - Marca Hermle (Z 323 K)
- Sistema de Água Ultrapura Milli-Q – Marca Millipore;
- Sistema de Filtração Millipore para solventes orgânicos (0,45 µm) / Filtros de celulose (Whatman 41, 0,45 µm);
- Bomba isocrática para sistema HPLC Marca Shimadzu (LC-20AT);
- Amostrador automático para sistema HPLC (Autosampler SIL-20A) Marca Shimadzu;
- Detector de fluorescência para sistema HPLC (RF-10AXL) Marca Shimadzu;
- SoftwareLC-Solution para sistema HPLC Marca Shimadzu;
- Sistema CBM-20A (SCL-10Avp) Marca Shimadzu;
- Lâmpada fluorescente luz do dia F40W T12 Marca Silvânia.

4.2. Métodos

4.2.1. Determinação da umidade

O teor de umidade foi determinado com base no método oficial nº/925.09B da ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) (nº/925.09B). A determinação foi realizada, em estufa a 70°C por 3 horas e posteriormente, as amostras foram mantidas em dessecador até que atingissem a temperatura ambiente, e pesadas. A operação foi repetida com aquecimento por mais 2 horas até peso constante (AOAC, 1995).

4.2.2. Extração da filoquinona (vitamina K₁)

Foram testados diferentes métodos recomendados de pré-tratamento para isolar, purificar e concentrar a filoquinona (vitamina K₁) de matrizes alimentares como os vegetais. Os ensaios preliminares foram realizados com amostras de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) por apresentarem altos teores de filoquinona e a alface (*Lactuca sativa* L.) por apresentar baixos teores, objetivando testar a sensibilidade dos métodos.

As metodologias constaram de: 1) extração líquido-líquido (ELL) utilizando solventes orgânicos (MAJCHRZAK; ELMADFA, 2001; PIIRONEN; KOIVRU, 2000; JAKOB; ELMADFA, 1996) extração em fase sólida (EFS) (DAMON et al., 2005; UDAQAWA; NAKAZOE; MURAI, 1996; BOOTH; SADOWSKI; PENNINGTON, 1995; BOOTH; DAVIDSON; SADOWSKI, 1994), cujos procedimentos empregam extração em fase sólida com cartucho de sílica - Sep-PaK Vac sílica cartridge (6cc, 1gram). Resumidamente as etapas da análise foram: a) Homogeneização da amostra com n-hexano, água e etanol (6:1:4); b) Sonicação 40% no ciclo de 30 minutos; c) Agitação por 10 minutos em agitador de tubos Vortex; d) Centrifugação a 1000g por 10 minutos, temperatura 4°C; e) Remoção da camada superior de hexano transferindo-a para balão de rotaevaporador de 50 mL; f) Evaporação utilizando equipamento de rotaevaporação por 15 minutos no banho a 40 °C; g) Dissolução do resíduo em 2 mL de hexano; h) Filtração com cartucho de sílica lavado com uma mistura de hexano e éter; i) Extração com 40 mL de dietil éter (2 vezes); j) Evaporação do eluato com pressão reduzida; l) Redissolução do resíduo em 200 µL de fase móvel.

Foram realizadas várias repetições (ao menos 10) dos procedimentos de análise visando testar as performances das metodologias recomendadas. Os resultados finais se mostraram favoráveis para a extração da filoquinona (vitamina K₁) das matrizes alimentares nas amostras analisadas. Apesar das diferentes metodologias avaliadas neste trabalho apresentarem resultados satisfatórios, optou-se por padronizar e validar as análises para este estudo com o método de extração líquido-líquido (ELL) o qual foi considerado por nós e também descrito na

literatura como um método simples, rápido e mais barato.

Assim, a metodologia de extração e purificação líquido-líquido (ELL) utilizando solventes orgânicos e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (JAKOB; ELMADFA, 1996; MAJCHRZAK; ELMADFA, 2001). Os procedimentos foram os seguintes:

- Pesou-se aproximadamente 2,0 gramas de amostra homogeneizada em Becker de 250 mL;
- Adicionou-se 60 mL diclorometano/ metanol (2:1, v/v);
- Realizou-se a filtração sobre Na₂SO₄ utilizando funil e papel filtro, em balão volumétrico âmbar de 100 mL;
- Completou-se o volume com metanol para 100 mL;
- Coletou-se 1 mL da solução em balão de 50 mL;
- Evaporou-se utilizando aparelho rotaevaporador a 40°C por 15 minutos;
- O resíduo foi dissolvido em 4 mL de hexano.

Purificação do Extrato:

- Adicionou-se 4 mL a mistura de metanol-água (9:1, v/v) no extrato de hexano com transferência quantitativa para tubos de centrifuga;
- Agitou-se em agitador de tubos tipo Vortex por 2 minutos;
- Centrifugou-se por 5 minutos a uma velocidade de 3000/rpm e temperatura de 4°C;
- Recolheu-se a camada superior de hexano em balão do rotaevaporador de 50 mL;
- Evaporou-se à temperatura de 40°C por 15 minutos;
- O resíduo foi dissolvido em 200 µL da fase móvel e transferido quantitativamente para tubo de vidro âmbar com capacidade de volume de 2 ml (vial com rosca, 12x32mm – RC-LAB cód.: 8-425) acoplado com insert (limitador de volume de 250µL), fechado (com tampa rosqueada contendo septo de PTFE vermelho/silicone para vials 8-425 – RC-LAB) e injetado 100 µL no cromatógrafo.

Durante os ensaios tomou-se o cuidado de fazer todo o procedimento de extração e purificação da filoquinona (Vitamina K₁) das amostras analisadas protegido da luz, visando evitar perdas, uma vez que o analito é fotossensível. Os procedimentos de homogeneização das amostras foram realizados sem adição de água. As análises de cada amostra foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão.

4.2.3. Condições cromatográficas para a análise da filoquinona

As quantificações foram realizadas utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Equipamento da marca Shimadzu equipado com: Sistema CBM-20A (SCL-10Avp); Software LC-Solution; Amostrador automático (Autosampler SIL-20A); Bomba isocrática (LC-20AT); Detector de fluorescência (RF-10AXL). O sistema de determinação foi com fase reversa empregando-se coluna C₁₈ LICHROART 250x4.6 mm PUROSPHER 5 μ m (Merck) com pré-coluna COL.LICHROART 4x4 mm 5 μ m (Merck) e fase móvel composta por diclorometano e metanol (10:90) grau HPLC (Merck), com adição de 5 mL de solução metanólica de cloreto de zinco (1,37 g), acetato de sódio (0,41 g) e ácido acético (0,30 g) por litro de fase móvel, com eluição isocrática e fluxo de 1 mL por minuto. A pós-coluna de redução: (20 x 4.0 mm i.d.), foi preenchida manualmente c/ pó de zinco grau p.a. com partículas < 45 μ (Merck); usando forno de aquecimento (Shimadzu-CTO-6A) com temperatura de 40°C e detector de fluorescência, excitação 243 nm e emissão 430 nm. A fase móvel foi desaerada antes de cada análise cromatográfica pelo tempo de 20 minutos, visando criar ambiente anaeróbico dentro do sistema, procedimento este necessário para que ocorram as reações químicas dentro da coluna de pós-redução adequadamente.

4.2.4. Preparo das soluções para curva padrão da vitamina K₁

Os procedimentos de diluições e injeção do padrão de vitamina K₁ para a construção da curva padrão foram realizados seguindo o trabalho de (GAO; ACKMAN, 1995). Utilizou-se o padrão de vitamina K₁ (filoquinona; 2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinona / C₃₁H₄₆O₂ – Sigma cód. V3501-10g) para preparar a solução padrão de 10,2 mg em hexano grau HPLC em balão de 500 mL âmbar. Esta solução padrão foi armazenada em frasco escuro e estocada em refrigerador a 4,0°C, protegido da luz, permanecendo estável por 30 dias.

A partir da solução padrão, foram preparadas soluções de trabalho mistas, procedendo da seguinte forma: transferiu-se 2000 µL da solução padrão para balão volumétrico âmbar de 20 mL (triplicata); evaporou-se o hexano com nitrogênio e ressuspendeu-se em fase móvel até completar o volume. Logo após foram realizadas diluições utilizando micropipetadores automáticos (20-200; 100-1000 e 500-5000µL, [®]Eppendorf) e balões volumétricos de 10 mL. As concentrações variaram na faixa de 0,052 - 2,08 µg mL⁻¹ (n= 10 pontos), sendo que os volumes finais foram completados com a fase móvel e filtrados em membrana (durapore 0,45µm de poro 13mm, [®]Millipore) e injetados 100 µL no cromatógrafo. Todo o procedimento foi protegido da luz.

Para apresentar os melhores resultados dos teores de filoquinona (vitamina K₁) nos ensaios realizados com amostras *in natura* de hortaliças folhosas, foram necessárias várias repetições (ao menos 10) em quadruplicata, com diferentes amostras de aproximadamente 4 kg de alface, 10 kg de espinafre e couve manteiga, visando ajustes de procedimentos.

Para cada grupo de amostras analisadas foi necessário o desenvolvimento de diferentes protocolos.

Foi necessário um protocolo para o estabelecimento do tempo de uso e limpeza de pós-coluna de redução (20 x 4.0 mm i.d.) preenchida manualmente com pó de Zn (partículas <45µ), pois se observou constante aumento da pressão do cromatógrafo com o uso rotineiro da mesma.

Constatou-se que com o uso contínuo havia cristalização do Zn dentro da coluna, exigindo limpeza constante da mesma. Isso foi conseguido com o desempacotamento da coluna e posterior preenchimento da mesma com pó de Zn metálico. Esse procedimento teve de ser efetuado a cada 24 horas de corrida das amostras no cromatógrafo.

4.2.5. Identificação do pico da vitamina K₁

O pico foi identificado comparando-se o tempo de retenção do padrão com o tempo de retenção do pico da filoquinona (vitamina K₁) nas amostras analisadas. Além do tempo de retenção, também foi feita a comparação dos espectros das amostras e do padrão obtidos através do detector de arranjo de diodo para a vitamina de interesse.

4.2.6. Validação do método cromatográfico

Com a otimização da metodologia cromatográfica, obtida a partir de várias repetições (ao menos 10) em quadruplicata com diferentes amostras de alface, espinafre e couve, as quais apresentaram resultados adequados nas determinações da filoquinona (vitamina K₁), foram feitos os procedimentos para a validação do método (Linearidade, Faixa Linear de trabalho; Sensibilidade; Limite de detecção e quantificação, Recuperação; Exatidão; Precisão e Seletividade), seguindo normas dos órgãos reguladores INMETRO, 2009 e ANVISA 2003, além das recomendações dos autores ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009; LANÇAS, 2004 e RIBANI et al., 2004 .

4.2.6.1. Linearidade

A linearidade corresponde a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, dentro de uma faixa de trabalho, onde se inserem as respostas das mesmas. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009; LANÇAS et al., 2004; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2003). Tal habilidade pode ser representada pela equação de reta:

$$y = ax + b$$

onde: y = resposta medida;

x = concentração do analito;

a = indica a inclinação da reta;

b = intersecção.

As técnicas de se adequar a reta aos dados e verificar o quanto a reta descreve os dados chamam-se regressão e correlação, respectivamente (CHASIN *et al.*, 1998).

4.2.6.2. Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho de um método é definida como o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito em que é possível demonstrar a determinação com exatidão, precisão e linearidade exigidas, sob as condições específicas para o ensaio (INMETRO, 2003).

4.2.6.3. Sensibilidade

A sensibilidade mostra a variação da resposta com a concentração do analito e depende, essencialmente, da técnica de detecção utilizada, sendo expressa como a inclinação da reta de regressão e é determinada

simultaneamente aos testes de linearidade. A inclinação da curva de calibração construída no estudo de linearidade é o valor de sensibilidade do método, podendo este ser utilizado como parâmetro de controle de desempenho do método ao longo do tempo (INMETRO, 2003).

4.2.6.4. Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse, podendo ser obtida de várias maneiras (RIBANI et al., 2004), seguindo recomendações dos autores (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009), o método de adição padrão foi aplicado para o estudo da seletividade do presente trabalho.

4.2.6.5. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada pelo método. O limite de detecção pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros de curva analítica (RIBANI et al., 2004).

4.2.6.6. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada, com exatidão e precisão aceitável (LANÇAS, 2004).

4.2.6.7. Exatidão (Teste de recuperação)

A exatidão é o parâmetro da validação que expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor real do analito (LANÇAS, 2004). Para os ensaios de recuperação a ANVISA estabelece que deva ser obedecido, um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração, como por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentrações (ANVISA, 2003).

4.2.6.8. Precisão

O parâmetro de precisão expressa a concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004). É uma medida de dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maiores que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s). No presente trabalho este foi calculado seguindo recomendações dos autores (RIBANI et al., 2004 e LANÇAS, 2004).

4.2.7. Análise de cor por transmitância

As análises foram realizadas no laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia Bioquímico - Farmacêutica FCF/USP. Os parâmetros de cor foram avaliados pelos valores de reflectância das amostras de hortaliças folhosas, obtidos através do espectrofotômetro HunterLab / EUA, modelo ColorQuest XE nº serie: CQX 2329. O sistema utilizado foi o CIELAB, com ângulo do observador de 10° e iluminante D65, 420 nm, ajustado para reflectância. Para o tratamento dos dados foi utilizado o Software Universal V 4.10. Os resultados foram expressos em valores de reflectância com relação à luminosidade (L^*),

variação da intensidade de verde/vermelho (a^*), variação da intensidade de azul/amarelo (b^*). Após calibração, cada amostra de hortaliça folhosa previamente homogeneizada em processador comercial de alimentos, que estava em temperatura ambiente, foi disposta em cubeta de quartzo 4 x 4 cm, com diâmetro da fenda de 1mm, e colocada com a parte central voltada para a porta de 9 mm. As análises foram realizadas em triplicata. L^* = luminosidade (0 = preto e 100 = branco); a^* = intensidade de verde/vermelho (-80 até zero = verde, do zero ao +100 = vermelho) e b^* = intensidade de azul/amarelo (-100 até zero = azul, do zero ao +70 = amarelo).

4.2.8. Análise estatística

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown-Forsythe).

Foram descritas as quantidades de vitamina K em cada hortaliça a cada coleta realizada, *in natura* e cozida, quando possível, com uso de medidas (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) (KIRKWOOD; STERNE, 2006). Para as hortaliças em que há apenas o processo *in natura* foram realizadas análises de variâncias (ANOVA) com um fator aleatório (NETER et al., 1996) para comparar a quantidade de vitamina K nas diferentes épocas amostradas e seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni (NETER et al., 1996) para comparar as quantidades de vitamina K entre cada duas épocas de amostra.

As hortaliças não processadas e cozidas tiveram os teores de vitamina K comparados segundo épocas e processamento com uso de ANOVA com dois fatores (NETER et al., 1996), sendo a coleta um fator aleatório, seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni para comparar as quantidades de vitamina K entre cada duas épocas ou processamento.

Para comparação dos valores de vitamina K avaliados na CEAGESP e os valores americanos foram realizados testes t-Student comparado a um valor fixo (KIRKWOOD; STERNE, 2006).

Foram calculadas as correlações de Pearson (KIRKWOOD; STERNE, 2006) da concentração de vitamina k com os fatores de coloração de cada hortaliça para verificar a existência de relação entre cor e vitamina K.

Os resultados foram ilustrados usando gráficos de barras representando as médias de vitamina K com os respectivos erros padrão em cada amostra e processamento quando possível. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação do teor de umidade das amostras

Na **TABELA 2** estão expressos os resultados dos teores médios de umidade das amostras de hortaliças folhosas coletadas na CEAGESP no período de Fevereiro de 2011 a Outubro de 2012.

As hortaliças foram analisadas tanto na forma crua, quanto cozida conforme a maneira como são normalmente consumidas.

Tabela 2 – Umidade determinada em amostras de hortaliças folhosas coletadas na CEAGESP, expressa em %, de base úmida.

AMOSTRA	UMIDADE *	AMOSTRA	UMIDADE *
Acelga Crua	65,3 ± 0,39	Couve- Flor Crua	71,9 ± 4,43
Acelga Cozida	55,2 ± 3,37	Couve -Flor Cozida	89,9 ± 1,69
Agrião	92,0 ± 0,07	Couve manteiga Cru	91,7 ± 0,38
Alface Americana	96,5 ± 0,50	Couve manteiga Cozida	93,5 ± 0,26
Alface Crespa	94,8 ± 0,05	Chicória Crua	94,3 ± 0,26
Alho poró Cru	92,6 ± 0,13	Chicória Cozida	93,8 ± 0,45
Alho poró Cozido	92,1 ± 0,29	Escarola Crua	75,2 ± 2,62
Almeirão Cru	92,6 ± 0,05	Escarola Cozida	74,2 ± 3,85
Almeirão Cozido	94,0 ± 0,88	Espinafre Cru	85,3 ± 2,98
Brócolo Comum Cru	91,6 ± 0,98	Espinafre Cozido	45,9 ± 2,03
Brócolo Comum Cozido	90,9 ± 0,71	Hortelã	88,1 ± 0,13
Brócolo Ninja Cru	88,4 ± 0,24	Manjericão	82,7 ± 0,27
Brócolo Ninja Cozido	90,1 ± 0,15	Repolho verde Cru	53,1 ± 3,26
Catalonha Crua	92,4 ± 1,45	Repolho verde Cozido	31,1 ± 1,12
Catalonha Cozida	93,1 ± 0,28	Rúcula	94,6 ± 0,72
Cebolinha	91,3 ± 0,98	Salsa	76,5 ± 4,82
Coentro	89,0 ± 0,10	Salsão Cru	84,5 ± 3,09
		Salsão Cozido	90,6 ± 0,14

* Análises realizadas em triplicata e os resultados expressos em % Média ± Desvio Padrão.

Os resultados apresentados na sua maioria estão de acordo com os dados da literatura (USDA, 2012), sendo que algumas diferenças podem estar

relacionadas à estação do ano, insolação, ou pluviosidade, entre outros fatores, pois na maioria dos trabalhos consultados não existem informações suficientes para que esses dados possam ser comparados. A avaliação dos resultados das amostras de hortaliças folhosas que sofreram o processo de cocção com relação as mesmas analisadas *in natura*, apresentou para a maioria valores médios inferiores a 2% de perdas ou ganhos de água com o processo. O efeito do processo foi observado de forma significativa na perda de água para as amostras de acelga 15,54%, repolho verde 41,48% e espinafre 46,15%.

5.2. Avaliação do Método Cromatográfico

A vitamina K pode ser separada por fase normal, bem como por cromatografia de fase reversa. Neste trabalho foi utilizado o sistema de fase reversa C₁₈, pois a coluna cromatográfica apresentou boa resolução na separação simultânea do pico da filoquinona (vitamina K₁) apresentados nas **FIGURAS 2.1 e 2.2**, condições estas também utilizadas pelos autores (OTLES; CANGINDI, 2007). A vitamina K₁ foi detectada com fluorescência, viabilizada com excitação de 243nm e emissão de 430nm. A eluição utilizada foi a isocrática, sendo a fase móvel composta principalmente pelo solvente orgânico metanol (90:10 v/v) selecionado por ser eficaz como potencializador (substrato doador do átomo de hidrogênio) na fluorescência e como eluente para a separação da filoquina (vitamina K₁), além do baixo custo, recomendado pelos autores (PÉREZ-RUIZ et al., 2007).

Com o estabelecimento das boas práticas de uso da pós-coluna de redução descrita anteriormente, esta se mostrou ferramenta importante para a detecção do analito de interesse, uma vez que, nenhum dos homólogos naturais da vitamina K apresentam fluorescência. Em vista disto, foi induzida a fluorescência das amostras analisadas com a aplicação do método de redução química utilizando uma pós-coluna da coluna (20 x 4.0 mm i.d.) com pó de zinco grau p.a. (partículas < 45µ) empacotada manualmente. Este método possibilitou que a vitamina K₁

sofresse redução reversível entre as formas quinona e hidroquinona da filoquinona, sendo estes produtos altamente fluorescentes. O esquema das estruturas químicas destes produtos estão apresentadas na **FIGURA 2.3**. Com a presença desses compostos de redução ocorrem reações eletroquímicas que em contato com a fluorescência do equipamento cromatográfico emitem luz possibilitando serem detectados e quantificados. A condição essencial para a detecção fluorimétrica da vitamina K é a ausência de oxigênio no sistema, pois neste ambiente os produtos da redução podem ser conduzidos com um substrato doador de átomo de hidrogênio (metanol). Se o oxigênio está presente, os homólogos da vitamina K não são reduzidos e, conseqüentemente, não é observada a fluorescência, ou a fluorescência está ausente. Portanto, antes de se iniciar cada procedimento cromatográfico, a fase móvel foi desaerada visando criar um ambiente anaeróbico dentro da coluna de pós-redução. Este método foi utilizado por vários autores na quantificação da vitamina K em amostras de vegetais verdes (PÉREZ-RUIZ et al., 2007; KAMA, et al., 2005; PENTEADO, 2003; PÉREZ-RUIZ et al., 1999; MACCREHAN; SCHÖNBERGER, 1995; HAROON; BACON, 1987).

A **FIGURA 2.1** apresenta o cromatograma das vitaminas K₁ e K₂ dos padrões da marca Sigma.

Figura 2.1 – Cromatograma característico das vitaminas K₁ e K₂ padrões: No tempo de retenção de 10-12min pico da K₂ (menaquinona-4 / C₃₁H₄₀O₂ – Sigma código: V9378-1g) utilizada como Padrão Interno. No tempo de retenção 15 minutos pico do Padrão Sigma da Vitamina K₁(filloquinona; 2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone / C₃₁H₄₆O₂ - Sigma código: V3501-10g).

A **FIGURA 2.2** apresenta o cromatograma da filloquinona (vitamina K₁) analisada na amostra de couve manteiga.

Figura 2.2 – Cromatograma característico da filoquinona (vitamina K₁) em amostra de Couve (*Brassica chinensis* L); Amostra cód. Couve Manteiga 01 13/01/2011. No tempo de retenção de 10-12 minutos pico da vitamina K₂ utilizada como padrão interno. No tempo de retenção 15 minutos pico da filoquinona (vitamina K₁).

A **Figura 2.3** apresenta a estrutura quinônica da filoquinona (vitamina K₁) e a estrutura reduzida a hidroquinona.

Figura 2.3 – Estrutura quinônica da filoquinona (vitamina K₁), que em presença de agentes redutores é facilmente reduzida á hidroquinona.

Foram realizados procedimentos de análises visando a investigação dos “ombros” nos tempos de retenção de 5-10 minutos, apresentados nos cromatogramas das corridas para todas as amostras analisadas (**Figura 2.2.**). Determinações qualitativas de cada fração dos “ombros” foram feitas com varreduras UV visível utilizando o método PDA do equipamento cromatográfico. A avaliação dos espectros obtidos nos comprimentos de ondas de 350-600nm confirmou se tratar de carotenóide. Através dos valores da máxima absorbância dos picos obtidos e comparados com os espectros característicos dos carotenóides utilizando a literatura (CARVALHO, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA e AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004), constatou-se que o método de determinação da filoquinona (vitamina K₁) detectou a luteína (λ máximo 422, 445, 473 nm) (**Figura 2.4**), em concordância com autores como Almeida-Muradian e Penteado, 2003 que citam os vegetais de folhas verdes como o brócolo, alface, salsinha, espinafre e agrião sendo boas fontes de luteína (>1000 μ g/100g) e de β -caroteno.

Figura 2.4 – Espectro de absorção (faixa 350-600nm) característico da luteína (λ máximo 422,445,473nm), detectada na amostra de Couve Manteiga (*Brassica chinensis* L) código 01 13/01/2011, por equipamento CLAE com coluna C₁₈, solução em fase móvel e método PDA de análise.

5.3. Validação do Método

5.3.1. Linearidade

Para determinar a linearidade do método foram medidas curvas analíticas de soluções padrão de trabalho mistas, nas faixas da concentração de 0,0125 - 2,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 11$ pontos) com 7 repetições. Com esses dados, construiu-se o gráfico de concentração padrão x resposta e calculou-se a regressão da curva.

O parâmetro usado para avaliar a correlação da linearidade dos valores foi o coeficiente de correlação (r) que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida e que tem como valor ideal 1, indicando uma relação perfeita, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza do coeficiente de regressão estimado (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009). Assim, a linearidade da curva de calibração e o intervalo de trabalho do método, foram determinados pelo coeficiente de correlação da reta, também nomeado índice de correlação de Pearson (RIEDER et al., 2000), considerando que:

$r = 1$, correlação perfeita;
 $0,91 < r < 0,99$, correlação fortíssima;
 $0,61 < r < 0,91$, correlação forte;
 $0,31 < r < 0,60$, correlação média;
 $0,01 < r < 0,30$, correlação fraca;
 $r = \text{zero}$, correlação nula.

O coeficiente de correlação (r) obtido demonstra que o método possui correlação – $0,91 < r^2 < 0,99$. Na **TABELA 3** estão apresentados os dados para obtenção da linearidade da análise.

Tabela 3 – Teste de Linearidade* da análise da vitamina K₁.

Filoquinona (vitamina K ₁)			
Massa Inj. (µg)	Média U.Área* (n=7)	Desvio Padrão U.Área	Área/Massa
0,0125	193740	24995,836	154992000,00
0,0252	233805	12499,628	92779894,18
0,104	1041249	18191,179	100120064,10
0,208	2468965	74372,827	118700240,38
0,52	5563344	30727,158	106987384,62
0,728	11843170	376246,793	162680911,17
0,936	12439038	26300,313	132895705,13
1,04	13488682	81642,392	129698865,38
1,3	16674345	387514,040	128264194,87
1,6	19473281	579596,041	121708004,17
2,08	25884470	532617,284	129422348,33

X=Inclinação da reta: 128364912,4817

Y=Ax + B

B=Intersecção da reta: 48319,3736

R²: 0,99

*Médias de 7 replicatas.

A **FIGURA 3.1** Representa curva analítica ($y = ax + b$) onde y, área de pico; x, concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$); r^2 , coeficiente de determinação da filoquinona (vitamina K₁).

Figura 3.1 – Reta de regressão da filoquinona (vitamina K₁).

5.3.2. Faixa linear de trabalho

O estudo da faixa linear de trabalho para as amostras de hortaliças folhosas foi feito como complemento ao teste de linearidade, visando a definição do intervalo de concentração no qual fosse possível quantificar de forma segura o analito. Para isto, foi construído o gráfico mostrado na **(FIGURA 3.2)**. A construção da curva com a concentração em escala logarítmica permitiu melhor visualização da faixa linear, seguindo procedimentos recomendados pelos autores (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009 e RIBANI et al., 2004), consideraram-se como faixa linear de trabalho, os intervalos nos quais os pontos estavam inseridos entre os limites inferiores e superiores do gráfico. Para determinação da faixa linear de trabalho foram obtidas as respostas em mAU (área de pico) para faixas de concentração de $0,0125 - 2,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 11$ pontos), do padrão da filoquinona (vitaminas K_1). O gráfico foi construído a partir das respostas relativas (resposta mAU / concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$) no eixo y e as concentrações correspondentes, em escala logarítmica, no eixo x para as soluções padrões. Para verificar se os pontos da curva analítica estavam inseridos dentro da faixa linear, foram desenhadas linhas horizontais paralelas no gráfico, definindo os limites inferiores 95% e superiores 105%. Estes pontos de limites foram obtidos a partir do valor médio encontrado para área/concentração dos $n=11$ pontos, valor esse multiplicado por 0.95 para limite inferior e 1.05 para o limite superior. Segundo os autores Ribani et al. (2004), pode-se concluir que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha de 95 a 105%. A razão resposta/massa injetada não foi independente da concentração em toda a faixa estudada. Assim, a faixa linear de trabalho é limitada à região de concentração onde permanece inalterada. O valor de intervalo da faixa linear de trabalho encontrado para a filoquinona (vitamina K_1) foi de $0,0125 - 2,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ injetado. A faixa de trabalho foi considerada como sendo adequada para o composto estudado. A **FIGURA 3.2** apresenta os intervalos de faixa linear de trabalho para a filoquinona (vitamina K_1).

Figura 3.2 – Intervalos de faixa linear de trabalho, para as massas injetadas da vitamina K₁.

5.3.3. Sensibilidade

Através do estudo da linearidade do método observa-se que o valor da sensibilidade, expresso pela inclinação da curva de calibração foi de $S=dR/dC=1,2 \times 10^8$, o que indica que o método apresenta boa sensibilidade, ou seja, uma pequena variação na concentração corresponde a uma alta variação na resposta.

5.3.4. Seletividade

No método de adição padrão o teste de seletividade foi realizado comparando-se os valores dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas: a primeira obtida com as soluções de trabalho mistas na faixa de concentração 0,104 – 1,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 6$ pontos) do padrão da filoquinona (vitaminas K₁) e a segunda curva analítica obtida a partir de 500 μL destas soluções de trabalho

mistas adicionadas de 100 µL de amostras de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). Segundo os autores Aragão, Veloso e Andrade, 2009, dos quais foram seguidas as recomendações para determinação da seletividade, quando as inclinações das duas curvas são iguais ou muito próximas e a razão entre os dois coeficientes angulares se aproxima a 1, significa que o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito, ou seja não há efeito de matriz e, portanto, o método é seletivo.

Na **FIGURA 3.3** estão apresentados os resultados obtidos no estudo de seletividade do método para curva padrão da filoquinona (vitaminas K₁) e curva padrão adicionada de amostra de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). As razões entre os coeficientes angulares das curvas foram: padrão $r^2=0,99$ e padrão adicionado de amostra $r^2=0,99$. A partir dos valores obtidos, nenhum efeito da matriz alimentar foi observado quando a amostra foi analisada.

Figura 3.3 – Curvas analíticas da seletividade dos padrões puros (—◆—) e do padrão (—■—) com adição da amostra de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.).

5.3.5. Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção do método foi calculado empregando-se o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que utiliza o coeficiente linear (s) da equação de regressão linear e o coeficiente angular (S), equação apresentada na **FIGURA 4.1**. Estes parâmetros foram calculados através da construção da curva analítica padrão contendo a filoquinona (vitamina K₁) na faixa de concentração próxima ao limite de detecção 0,0052 - 0,0125 µg mL⁻¹ em 7 repetições.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Coeficiente Angular (S)	Coeficiente linear (s)
13458096,46	21091,47
LD	0,0051 µg/mL

Figura 4.1 – Limite de detecção do método baseado no coeficiente linear (s) da equação de regressão linear e coeficiente angular (S) da curva analítica para determinação da filoquinona (vitamina K₁) em hortaliças folhosas.

5.3.6. Limite de Quantificação (LQ)

Para a determinação do limite de quantificação do método, empregaram-se os mesmos critérios do método baseado nos parâmetros da curva analítica descrito anteriormente para o LD. Assim, a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva analítica (S), valores estes obtidos da curva analítica em níveis de concentração da filoquinona (vitamina K₁) próximo ao LQ, foram adotados para o limite de quantificação, utilizando a relação 10:1, equação apresentada na **FIGURA 4.2**.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Coeficiente Angular (S)	Coeficiente linear (s)
13458096,46	21091,47
LQ	0,01567µg/mL

Figura 4.2 – Limite de quantificação do método baseado no coeficiente linear (s) da equação de regressão linear e coeficiente angular (S) da curva analítica para determinação da filoquinona (vitamina K₁) em hortaliças folhosas.

5.3.7. Exatidão (Teste de recuperação)

No teste de recuperação, seguindo recomendações dos autores RIBANI et al., 2004, foram efetuadas 9 determinações com padrão comercial código V3501-10g marca Sigma® de filoquinona (vitamina K₁) adicionado em três níveis de concentração 25, 70 e 100% da concentração esperada na matriz. Como matriz para este teste foi utilizada amostra de salsa (*Petroselinum crispum*). Paralelamente, preparou-se uma amostra em triplicata sem a adição dessa solução padrão. Essas amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração para determinação da vitamina. Calculou-se recuperação média e seu desvio padrão. Na **TABELA 4** estão apresentados os dados para obtenção da recuperação da análise.

Tabela 4 – Ensaios de Recuperação da Filoquinona (vitamina K₁).

Teste de Recuperação				
Equação da reta	Amostra	Área (mAU)	Concentração (µg/ml)	Padrão adicionado (µg)
Y=130458096,46X - 21091,47 R=0,99	Salsa s/ padrão a	7797866	0,060	
	Salsa s/ padrão b	6220222	0,048	
	Salsa s/ padrão c	7272853	0,056	
	Salsa + 25% pd a	33092818	0,254	0,194
	Salsa + 25% pd b	21147320	0,162	0,114
	Salsa + 25% pd c	21887735	0,167	0,112
	Salsa + 50% pd a	29381921	0,225	0,165
	Salsa + 50% pd b	32278253	0,247	0,192
	Salsa + 50% pd c	35805129	0,277	0,107
	Salsa + 100% pd a	31951422	0,245	0,185
	Salsa + 100% pd b	34805875	0,267	0,219
	Salsa + 100% pd c	38547383	0,296	0,240

A **TABELA 5** apresenta os limites recuperação para a filoquinona (vitamina K₁) na amostra analisada. Os resultados de recuperação são expressos em termos de porcentagem da quantidade medida da vitamina em relação às quantidades adicionadas nas amostras. A variação obtida foi de 71,2% para as amostras adicionadas de 25% de padrão e 79,6% para as amostras adicionadas de 100% de padrão. Segundo Ribani et al. (2004), para os ensaios de recuperação os intervalos aceitáveis para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20%.

Tabela 5 – Recuperação da Filoquinona (vitamina K₁), expressa em (%).

Amostra + Padrão de vitamina K	Teste de Recuperação			
	(C amostra + padrão)- (C amostra s/ padrão)/(C amostra adicionada)			
Salsa + 25% de adição de padrão	76,40	Média 71,20	DP 4,88	CV 6,85
	70,52			
	66,71			
Salsa + 50% de adição de padrão	73,41	Média 77,91	DP 3,93	CV 5,05
	80,70			
	79,64			
Salsa + 100% de adição de padrão	75,50	Média 79,59	DP 3,50	CV 4,39
	82,08			
	81,09			

5.2.8. Precisão

Para determinar a precisão por meio do desvio padrão da variação foram feitas 7 replicatas das soluções de curva padrão filoquinona (vitaminas K₁), faixa de concentração: 0,0125 – 2,08 µg mL⁻¹ (n = 11 pontos), conforme recomendação de (LANÇAS, 2004 e RIBANI et al, 2004).

As **FIGURAS 4.3 e 4.4** apresentam os valores da Precisão e Coeficiente de Variação na determinação da filoquinona (vitamina K₁) em hortaliças folhosas.

Figura 4.3

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Figura 4.4

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Área (mAU)	Concentração(ug/mL)	Média (ug/mL)	Desvio Pradrão	Coeficiente de Variação
13548551	1,0915	1,0926	0,0088	0,8022
13395682	1,0791			
13521813	1,0894			
13637453	1,0987			
13736529	1,1068			
13502664	1,0878			
13592333	1,0951			

Figura 4.3 – Precisão do método baseado na curva analítica padrão para determinação da filoquinona (vitamina K₁) em hortaliças folhosas.

Figura 4.4 – Coeficiente de variação do método baseado na curva analítica padrão para determinação da filoquinona (vitamina K₁) em hortaliças folhosas.

5.3.9. Sumário dos dados para validação do método cromatográfico

Tabela 6 – Dados de regressão da vitamina K₁ obtidos pelo método de análise cromatográfica e seus limites de detecção e quantificação para amostras de hortaliças folhosas.

Analito	Filoquinona (vitamina K ₁)
Faixa Linear de trabalho (µg/mL)	0,025 - 2,08
Linearidade (R ²)	0,99
N	6
*Recuperação (%)	76
Sensibilidade U área/µg	1,2x10 ⁸
LD (µg/mL)	0,0051
LQ (µg/mL)	0,0157
**Precisão (DP e CV)	(0,0088) e (0,8022)
Intervalo de Confiança (%)	95
Seletividade	Sim

Legendas – R² = coeficiente de correlação; N = número de níveis de concentração; CV = coeficiente de variação do método; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação. **média de 7 replicatas; * média de 9 replicatas.

Os resultados apresentados na **TABELA 6** para os procedimentos de validação para o método de análise mostraram que foram adequadamente reproduzidos nos ensaios de determinação da filoquinona (vitamina K₁) em hortaliças folhosas. Para os testes de limite de detecção, apesar do método mais utilizado ser o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral, nas análises cromatográficas e eletroforéticas, a medição do ruído não é trivial e as vezes é subjetivo já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector. Além disso, tanto o limite de detecção (LD) quanto o limite de quantificação (LQ) podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Picos

maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando o LD e LQ mais baixos. Além disso, a determinação cromatográfica desses parâmetros deve considerar tanto o tipo quanto o tempo de uso da coluna. Segundo o trabalho de Ribani et al. (2004), foi sugerido que o melhor caminho para resolver este problema do cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. Com base nestas recomendações o presente trabalho utilizou os dados da curva analítica construída para determinação da vitamina K₁ (filoquinona), para efetuar os cálculos do LD e LQ, apresentados nas **FIGURAS 4.3 e 4.4.**

5.4. Teores de filoquinona (vitamina K₁) em hortaliças folhosas coletadas na CEAGESP

Foram coletadas 22 diferentes hortaliças folhosas entre os meses de Fevereiro à Novembro do ano de 2011 e de Março a Outubro do ano de 2012. Visando a análise da repetibilidade dos dados gerados, essas mesmas hortaliças foram coletadas em diferentes épocas (verão, outono, inverno e primavera) dos anos de 2011 e 2012, no total de sete coletas, procurando sempre que possível obter a amostragem do mesmo fornecedor e região da primeira coleta e/ou anterior, dados anteriormente apresentados na **TABELA 1.**

Visando a repetibilidade dos resultados, três coletas em diferentes épocas do ano foram realizadas, sendo que para cada coleta, foram feitas três análises por amostra crua e processada, no total de 18 análises. Na ocorrência de grandes variações entre os resultados dos teores de filoquinona (vitamina K₁) nas três primeiras coletas de cada hortaliça, houve a necessidade de um maior número de coleta de amostras, resultados apresentados na **TABELA 7.**

Tabela 7 – Concentração de filoquinona (vitamina K₁) em hortaliças *in natura*, expressa em µg/100g de amostra, base úmida.

Amostras		Filoquinona (µg/100g)*			
ALFACE AMERICANA	1ª Coleta - Piedade 30,48 ± 2,91	2ª Coleta - Piedade 14,88 ± 1,97	3ª Coleta - Piedade 147,45 ± 10,32	4ª Coleta - Piedade 106,64 ± 5,00	5ª Coleta - Piedade 86,16 ± 4,58
ALFACE CRESPA	1ª Coleta – Cabreúva 135,46 ± 10,09	2ª Coleta - Piedade 43,88 ± 1,71	3ª Coleta - Bragança Paulista 157,90 ± 14,86	4ª Coleta - Bragança Paulista 112,90 ± 4,58	-
RÚCULA	1ª Coleta – Ibiúna 227,79 ± 21,29	2ª Coleta - Hip. Serra 170,50 ± 8,89	3ª Coleta - Hip. Serra 319,47 ± 12,04	4ª Coleta - Hip. Serra 318,39 ± 1,5	-
AGRIÃO	4ª Coleta - Igaratá (Santa Isabel) 347,03 ± 4,07	5ª Coleta - Mogi das Cruzes 252,31 ± 9,19	6ª Coleta - Mogi das Cruzes 292,64 ± 10,53	7ª Coleta - Mogi das Cruzes 263,63 ± 7,01	-
SALSA	1ª Coleta - Ibiúna 558,28 ± 30,40	2ª Coleta – Ibiúna 357,40 ± 36,57	3ª Coleta – Ibiúna 557,47 ± 5,67	-	-
CEBOLINHA	4ª Coleta - Igaratá (Santa Isabel) 192,32 ± 5,67	5ª Coleta – Jarinú 182,16 ± 6,64	6ª Coleta – Jarinú 100,94 ± 6,36	7ª Coleta – Jarinú 104,94 ± 6,30	-
COENTRO	-	-	6ª Coleta – Ibiúna / SP 215,90 ± 1,19	7ª Coleta – Piedade / SP 299,93 ± 5,77	-
MANJERICÃO	-	-	6ª Coleta – Jundiaí / SP 283,69 ± 10,32	7ª Coleta – Jundiaí/ SP 385,97 ± 9,22	-
HORTELÃ	-	-	6ª Coleta – Piedade / SP 380 ± 0,04	7ª Coleta – Piedade / SP 348,38 ± 2,25	-

continua

Filloquinona (µg/100g)*									
Amostras	<i>In natura</i>	Processada**	<i>In natura</i>	Processada**	<i>In natura</i>	Processada**	<i>In natura</i>	Processada**	<i>In natura</i> Processada**
ESPINAFRE	1ª Coleta - Ibiúna		2ª Coleta - Santa Isabel		3ª Coleta - Santa Isabel				
	316,09 ± 9,69	189,70 ± 8,99	423,14 ± 34,97	113,33 ± 18,33	386,07 ± 33,15	483,34 ± 39,11	-	-	
COUVE MANTEIGA	1ª Coleta - Ibuguaçu		INDISPONÍVEL		3ª Coleta - Ibuguaçu		4ª Coleta - Ibiuna		5ª Coleta - Saraizópolis
	144,78 ± 6,11	164,78 ± 0,20			362,06 ± 29,68	325,64 ± 39,01	263,9 ± 13,31	258,76 ± 6,69	212,19 ± 1,47 221,89 ± 4,39
ACELGA	1ª Coleta - Piedade		2ª Coleta - Mogi das Cruzes		3ª Coleta - Mogi das Cruzes				
	150,16 ± 5,11	127,23 ± 9,51	153,41 ± 18,56	111,21 ± 12,20	115,39 ± 12,70	117,83 ± 19,65	-	-	
REPOLHO VERDE	1ª Coleta - Piedade		2ª Coleta - Ibiúna		3ª Coleta - Ibiúna		4ª Coleta - Ibiúna		
	352,79 ± 26,76	289,57 ± 10,51	162,30 ± 14,99	172,08 ± 41,51	312,28 ± 38,48	247,12 ± 21,34	319,62 ± 11,13	197,17 ± 0,92	
COUVE-FLOR	1ª Coleta - Porto Feliz / SP		2ª Coleta - Sul de Minas		3ª Coleta - Alumínio				
	28,20 ± 2,06	37,22 ± 2,44	23,75 ± 1,30	46,72 ± 0,56	45,70 ± 5,07	65,97 ± 2,07	-	-	
ESCAROLA	1ª Coleta - Ibiúna		2ª Coleta - Santa Isabel		3ª Coleta - Santa Isabel				
	180,80 ± 20,82	118,78 ± 0,60	110,26 ± 8,17	113,59 ± 10,73	230,55 ± 17,86	234,18 ± 26,47			

continua

Filoquinona (µg/100g)*									
Amostras	<i>In natura</i>	Processada**	<i>In natura</i>	Processada**	<i>In natura</i>	Processada**	<i>In natura</i>	Processada**	<i>In natura</i> Processada**
BRÓCOLO NINJA	1ª Coleta - Sul de Minas		2ª Coleta - Sul de Minas		3ª Coleta – Alumínio		4ª Coleta – Indaiatuba		5ª Coleta – Andrades/MG
	56,11 ± 10,76	97,57 ± 24,25	68,85 ± 3,03	68,59 ± 9,97	374,04 ± 22,65	403,13 ± 30,24	269,54 ± 0,4	130,88 ± 7,56	191,53 ± 9,96 115,94 ± 10,5
CHICÓRIA	4ª Coleta - Igaratá (Santa Isabel)		5ª Coleta - Igaratá (Santa Isabel)		6ª Coleta - Igaratá (Santa Isabel)		7ª Coleta - Igaratá (Santa Isabel)		-
	205,08 ± 15,84	266,44 ± 6,00	149, 80± 6,54	157, 67± 4,19	172, 96± 3,70	166, 37± 5,84	145, 52± 9,07	185, 86± 9,94	
BRÓCOLO COMUM	4ª Coleta - Igaratá (Santa Isabel)		5ª Coleta – Saraizopolis		6ª Coleta – Jacareí		7ª Coleta – Jacareí		-
	386,97 ± 8,02	130,55 ± 8,26	246,70 ± 8,50	205,98 ± 8,33	172,30 ± 7,44	174,01 ± 9,86	165,13 ± 5,43	202,17 ± 7,54	
ALMEIRÃO (PÃO DE AÇÚCAR)	4ª Coleta – Saraizopolis		5ª Coleta - Igaratá (Santa Isabel)		6ª Coleta - Igaratá (Santa Isabel)		7ª Coleta - Igaratá (Santa Isabel)		-
	208,11 ± 9,75	243,57 ± 4,14	132,43 ± 10,72	174,62 ± 4,91	118,38 ± 4,39	150,97 ± 1,49	97,3 ± 2,24	83,58 ± 7,46	
SALSÃO	-		-		6ª Coleta – Mogi das Cruzes/ SP		7ª Coleta – Piedade / SP		-
					322,54 ± 1,57	293,62 ± 5,26	268,44 ± 4,10	324,23 ± 2,26	
CATALONHA	-		-		6ª Coleta – Itapeverica / SP		7ª Coleta – Piedade / SP		-
					279,57 ± 5,55	171,09 ± 5,71	280,18 ± 9,46	281,53 ± 8,47	
ALHO PORÓ	-		-		6ª Coleta – Mogi das Cruzes/ SP		-		-
					**n d	** n d			

* Análises realizadas em triplicata e resultados expressos em Média ± Desvio Padrão. # Amostras que sofreram o processo de cozimento, seguindo a metodologia da TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - UNICAMP. **nd = não detectado por este método.

5.4.1. Avaliação dos resultados da quantificação da filoquinona (vitamina K₁) em amostras coletadas na CEAGESP.

Os vegetais folhosos ocupam um lugar importante em dietas bem-equilibradas Kawashima e Soares (2003) relatam que as hortaliças folhosas mais comumente consumidas como salada verde na região sudeste do Brasil são: alface, rúcula e agrião, além, da couve, repolho, chicória e espinafre que são utilizados como legumes cozidos. Os autores ressaltam a escassez de informações sobre a composição dos alimentos brasileiros e evidenciam a necessidade de mais dados sobre composição de hortaliças folhosas, por estas estarem presentes na mesa de todas as classes sociais. Pesquisadores brasileiros explicitam que a literatura nacional é bastante escassa no que se refere à vitamina K, em razão disso, faz-se necessária a realização de novos estudos e aprimoramento da tabela de composição, para ampliar o conhecimento sobre os teores de vitamina K nos alimentos brasileiros (KLAC & CARVALHO, 2006; DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001).

A concentração de vitamina K₁ é muito baixa na maioria dos alimentos (<10 mg/100 g) e maiores teores da vitamina são obtidos a partir de alguns legumes verdes e folhosos como espinafre e brócolo (OTLES; CAGINDI, 2007; MAJCHRZAK; ELMADFA, 2001).

Visando obter adequada representatividade da amostragem para os objetivos deste estudo, as amostras de hortaliças folhosas analisadas foram coletadas na Companhia de Entrepasto e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP, considerada uma das principais empresas estatais brasileiras que surgida em maio de 1969 se estabeleceu atualmente como a maior central de abastecimento da América Latina e a terceira maior do mundo. Em 2012, comercializou 3,4 milhões de toneladas de frutas, verduras, legumes, flores e pescados. No setor de hortaliças cerca de 50% da produção total do país passa pelas Centrais Estaduais de Abastecimentos (CEASAS), sendo que as seis maiores são responsáveis por comercializar 88% do volume total deste produto a

CEAGESP de São Paulo comercializa maior fatia com 30% deste volume seguidos do Rio de Janeiro (21%), Contagem (16%), Campinas (7%), Curitiba (8%) e Vitória (6%). As hortaliças comercializadas na CEAGESP abastecem feiras, sacolões, quitandas, supermercados, restaurantes e merendas escolares de todas as regiões da Grande São Paulo (CEAGESP, PROHORT 2013).

Considerando que o principal objetivo da presente pesquisa foi avaliar os teores de filoquinona (vitamina K₁) em hortaliças folhosas comumente consumidas pela população do Estado de São Paulo, durante o período de Fevereiro à Novembro dos anos de 2011 e 2012, foram analisadas 22 diferentes hortaliças, cobrindo uma amostragem mais ampla do que as comumente consumidas citadas nos trabalhos de Kawashima e Soares (2003) e Souza, 2011. Esses autores descrevem um grupo de aproximadamente 10 diferentes variedades de hortaliças folhosas mais consumidas por esta população. A **TABELA 8** mostra de forma agrupada os resultados das análises da filoquinona (vitamina K₁) para as amostras de hortaliças folhosas *in natura* e processadas coletadas na CEAGESP nas diferentes épocas dos anos de 2011 e 2012. A maioria das hortaliças foi analisada em triplicata de coletas, sendo necessárias repetições para as amostras de alface americana, alface crespa, rúcula, repolho verde, brócolo ninja e couve manteiga as quais foram realizadas com as 4^a e a 5^a coletas. Mesmo com sucessivas análises em triplicata para cada coleta totalizando mais de 15 análises, os resultados para algumas amostras apresentaram variações significativas nos teores da vitamina de interesse, entre as coletas em diferentes épocas do ano. As análises dos dados são apresentadas e discutidas a seguir:

A **TABELA 8** apresenta a variação dos teores de filoquinona (vitamina K₁) para as hortaliças folhosas analisadas *in natura*, em diferentes épocas durante o período de Fevereiro à Novembro dos anos de 2011 e 2012.

Tabela 8 – Teores de filoquinona (vitamina K₁) em hortaliças folhosas in natura, em diferentes épocas do ano, expresso em %.

Hortaliça	Coleta	Média	DP	p*
Alface Americana	Verão (2011)	30,48	2,91	<0,001
	Outono (2011)	17,91	3,37	
	Inverno (2011)	147,45	10,31	
	Primavera (2011)	106,64	5,00	
	Outono (2012)	86,48	3,28	
	Total	77,79	50,06	
Alface Crespa	Verão (2011)	135,46	10,09	<0,001
	Outono (2011)	43,71	1,99	
	Inverno (2011)	157,90	14,86	
	Primavera (2011)	112,91	4,59	
	Total	112,49	45,38	
Salsa	Verão (2011)	558,28	30,40	<0,001
	Outono (2011)	357,41	36,57	
	Inverno (2011)	557,46	5,67	
	Total	491,05	103,05	
Rúcula	Verão (2011)	227,79	21,30	<0,001
	Outono (2011)	170,50	8,89	
	Inverno (2011)	319,47	12,04	
	Primavera (2011)	318,68	1,17	
	Total	259,11	67,03	
Cebolinha	Primavera (2011)	192,22	3,68	<0,001
	Outono (2012)	182,47	4,72	
	Inverno (2012)	100,87	4,50	
	Primavera (2012)	104,95	6,30	
	Total	145,13	44,46	
Agrião	Primavera (2011)	347,38	2,94	<0,001
	Outono (2012)	252,91	6,58	
	Inverno (2012)	292,34	7,47	
	Primavera (2012)	263,63	7,01	
	Total	289,07	38,62	
Coentro	Inverno (2012)	215,25	1,40	<0,001
	Primavera (2012)	299,93	5,77	
	Total	257,59	46,53	
Manjericão	Inverno (2012)	283,33	7,33	<0,001
	Primavera (2012)	385,97	9,22	
	Total	334,65	56,71	

* Nível descritivo do teste estatístico

Os resultados dos testes comparativos com os dados das hortaliças analisadas *in natura*, em que o fator de variação foi a época do ano, mostraram de forma geral que houve diferenças estatísticas nos teores da vitamina nas amostras analisadas. Para todas as amostras houve variações significativas dos teores máximos e mínimos da vitamina. Este fator foi principalmente acentuado nas amostras de alface americana que apresentou em média maior valor da vitamina de 147,45 µg/100g e menor valor de 14,88 µg/100g, também observado nas amostras de alface crespa 157,90 µg/100g para 43,88 µg/100g. Os resultados mostraram que para a maioria das amostras analisadas *in natura* as épocas do ano entre Primavera/Verão foram favoráveis para obtenção de maiores teores da vitamina. Por outro lado, as épocas entre Outono/Inverno obtiveram os menores teores filoquinona (vitamina K₁). A **TABELA 9** apresenta os resultados da variação dos teores da vitamina, na realização dos testes de comparações múltiplas para todos os momentos das coletas de cada hortaliça.

Tabela 9 – Comparações múltiplas dos teores de filoquinona (vitamina K₁) entre coletas para as hortaliças avaliada *in natura*.

Variável	Comparação	p*
Alface Americana	Verão (2011) VS Outono (2011)	0,221
	Verão (2011) VS Inverno (2011)	<0,001
	Verão (2011) VS Primavera (2011)	<0,001
	Verão (2011) VS Outono (2012)	<0,001
	Outono (2011) VS Inverno (2011)	<0,001
	Outono (2011) VS Primavera (2011)	<0,001
	Outono (2011) VS Outono (2012)	<0,001
	Inverno (2011) VS Primavera (2011)	<0,001
	Inverno (2011) VS Outono (2012)	<0,001
	Primavera (2011) VS Outono (2012)	0,015
Alface Crespa	Verão (2011) VS Outono (2011)	<0,001
	Verão (2011) VS Inverno (2011)	0,111
	Verão (2011) VS Primavera (2011)	0,108
	Outono (2011) VS Inverno (2011)	<0,001
	Outono (2011) VS Primavera (2011)	<0,001
Salsa	Inverno (2011) VS Primavera (2011)	0,002
	Verão (2011) VS Outono (2011)	<0,001
	Verão (2011) VS Inverno (2011)	>0,999
Rúcula	Outono (2011) VS Inverno (2011)	<0,001
	Outono (2011) VS Primavera (2011)	<0,001
	Inverno (2011) VS Primavera (2011)	>0,999
	Verão (2011) VS Outono (2011)	0,004
	Verão (2011) VS Inverno (2011)	<0,001
	Verão (2011) VS Primavera (2011)	<0,001
Cebolinha	Outono (2011) VS Inverno (2011)	<0,001
	Outono (2011) VS Primavera (2011)	<0,001
	Inverno (2011) VS Primavera (2011)	>0,999
	Primavera (2011) VS Outono (2012)	0,243
	Primavera (2011) VS Inverno (2012)	<0,001
Agrião	Primavera (2011) VS Primavera (2012)	<0,001
	Outono (2012) VS Inverno (2012)	<0,001
	Outono (2012) VS Primavera (2012)	<0,001
	Inverno (2012) VS Primavera (2012)	>0,999
	Primavera (2011) VS Outono (2012)	<0,001
	Primavera (2011) VS Inverno (2012)	<0,001
Coentro	Primavera (2011) VS Primavera (2012)	<0,001
	Outono (2012) VS Inverno (2012)	<0,001
	Outono (2012) VS Primavera (2012)	0,416
Manjeriço	Inverno (2012) VS Primavera (2012)	0,003
	Inverno (2012) VS Primavera (2012)	<0,001

* Nível descritivo do teste estatístico

Para melhor visualização dos resultados das **TABELAS 8** estes resultados estão apresentados como gráficos em barras nas **FIGURAS 5.1 a 5.9**.

Figura 5.1 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em alface americana (*Lactuca sativa capitata*) in natura, em diferentes épocas do ano.

Figura 5.2 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em alface crespa (*Lactuca sativa L*) in natura, em diferentes épocas do ano.

Figura 5.3 – Teores médios de filloquinona (vitamina K₁) em salsa (*Petroselinum crispum*) in natura, em diferentes épocas do ano.

Figura 5.4 – Teores médios de filloquinona (vitamina K₁) em rúcula (*Eruca sativa* L.) in natura, em diferentes épocas do ano.

Figura 5.5 – Teores médios de filloquinona (vitamina K₁) em cebolinha (*Allium fistulosum* L.) in natura, em diferentes épocas do ano.

Figura 5.6 – Teores médios de filloquinona (vitamina K₁) em agrião (*Nasturtium officinale*) in natura, em diferentes épocas do ano.

Figura 5.7 – Teores médios de filloquinona (vitamina K₁) em coentro (*Coriandrum sativum* L.) in natura, em diferentes épocas do ano.

Figura 5.8 – Teores médios de filloquinona (vitamina K₁) em manjerição (*Ocimum basilicum* L.) in natura, em diferentes épocas do ano.

Figura 5.9 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em hortelã (*Mentha longifolia*) *in natura*, em diferentes épocas do ano.

A **TABELA 9** mostra que praticamente todas as coletas das hortaliças *in natura* apresentam em média diferenças significativas nos teores de filoquinona (vitamina K₁), exceto aquelas que apresentaram em média mesma quantidade da vitamina observada nas amostras de alface americana nas épocas do Verão (2011) e Outono (2011) ($p = 0,221$); alface crespa coleta Verão (2011) e Inverno (2011) ($p = 0,111$) e Verão (2011) e Primavera 2011) ($p = 0,108$); salsa coleta Verão (2011) e Inverno (2011) ($p = 0,999$); Rúcula coleta Inverno (2011) e Primavera (2011) ($p = 0,999$); Cebolinha coleta Primavera (2011) e Outono (2012) ($p = 0,243$) e Inverno (2012) e Primavera (2012) ($p = 0,999$) e para a amostra de agrião coleta Outono (2012) e Primavera (2012) ($p = 0,416$).

Vários trabalhos internacionais sobre a determinação da filoquinona (vitamina K₁) apontam variações das concentrações da vitamina nos alimentos analisados *in natura*, influenciadas por fatores como a fertilização e condições de solo, clima, área geográfica, estado de maturação e variação sazonal, relatam que os meses de verão aumentam mais a quantidade da filoquinona que os meses de inverno, concordantes com os resultados para algumas amostras apresentadas neste trabalho, entretanto, há controvérsias desta versão (BOOTH et al., 2012; KLACK; CARVALHO, 2006).

Algumas causas possíveis para as variações nos teores da filoquinona (vitamina K₁) nas amostras cultivadas no sudeste brasileiro, são: cultivar,

localização do plantio, práticas agrícolas, forma de irrigação e possivelmente a temperatura. Para este último, mudanças drásticas de temperatura durante o ano causam prolongados períodos de secas e chuvas irregulares. Essas condições foram concordantemente citadas pelos autores Kawashima e Soares (2003), para explicar variações encontradas nos teores de minerais das amostras de hortaliças folhosas *in natura* (alface, couve, espinafre, repolho e chicória) adquiridas em mercados na região sudeste do país.

A intensidade das chuvas ocorridas nos primeiros meses do ano de 2011, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), que registrou o índice de 493.7 milímetros de precipitação na capital paulista mostrou terem sido os meses mais chuvosos desde 1947. Este fato alterou as características das amostras de hortaliças folhosas coletadas no entreposto da CEAGESP neste período, pois os postos de abastecimentos encontravam-se com a redução no fornecimento para o comércio paulista, além dos produtos que foram oferecidos se apresentarem prejudicados pelo excesso de umidade. Nas análises de determinação da filoquinona (vitamina K₁) para as amostras coletadas neste período foram observados os mais baixos teores da vitamina, principalmente nas amostras de alface americana, alface crespa, espinafre, couve manteiga, brócolos ninja quando comparadas com as mesmas variedades de hortaliças analisadas em outras épocas do ano de 2011.

Segundo o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) nos períodos de outono e inverno do ano de 2012 as hortaliças folhosas sofreram com os efeitos atípicos de chuvas em São Paulo, sendo relatado que este foi o mais intenso em quase três décadas. Isso causou um impacto nos produtos agrícolas consumidos pelos paulistanos devido ao excesso de umidade. De acordo com os agricultores da Região de Mogi das Cruzes, o outono e inverno causaram prejuízos para agricultura paulista, ocorrendo diminuição na produtividade. Afirmam ainda que o verão também prejudicou a produtividade agrícola naquele período. O inverno seco é a estação mais propícia para o cultivo de hortaliças.

Produtores de Mogi das Cruzes, afirmam que perderam até 30% da produção de hortaliças, já que o início do inverno de 2012 foi um pouco mais chuvoso.

A **TABELA 10** apresenta a variação dos teores de filoquinona (vitamina K₁) para as hortaliças folhosas analisadas *in natura* e processadas, verificando o efeito da coleta em diferentes épocas sobre essas hortaliças, durante o período de Fevereiro a Novembro do ano 2011 e Março à Outubro do ano 2012 e o efeito do processamento por cocção.

Tabela 10 – Teores da vitamina K das hortaliças segundo coleta e processamento, expressos em %, em base úmida.

Hortaliça	Coleta	<i>in natura</i>		Cozido	
		Média	DP	Média	DP
Acelga	Verão (2011)	150,12	3,61	127,23	9,85
	Outono (2011)	153,40	18,56	111,21	12,20
	Inverno (2011)	115,39	12,70	117,83	19,65
	Total	139,64	21,50	118,76	14,37
Repolho verde	Verão (2011)	352,79	26,76	289,57	10,51
	Outono (2011)	162,30	14,99	172,08	41,51
	Inverno (2011)	312,28	38,49	247,76	15,13
	Primavera (2011)	319,11	7,92	197,46	0,82
	Total	286,62	79,55	226,72	51,19
Espinafre	Verão (2011)	316,09	9,69	189,70	8,99
	Outono (2011)	423,14	34,96	113,33	18,33
	Inverno (2011)	386,07	33,15	383,34	39,11
	Total	375,10	53,11	262,12	170,61
Couve Manteiga	Verão (2011)	144,21	4,43	164,86	0,18
	Inverno (2011)	362,06	29,68	325,64	39,01
	Primavera (2011)	263,67	9,42	258,89	6,85
	Outono (2012)	212,15	1,04	221,40	3,21
	Total	245,52	84,12	242,70	63,33
Couve-flor	Verão (2011)	28,19	2,06	34,22	4,09
	Outono (2011)	23,78	1,30	46,72	0,55
	Inverno (2011)	45,70	5,07	65,97	2,67
	Total	32,56	10,43	48,97	14,07
Escarola	Verão (2011)	180,80	20,82	118,77	0,60
	Outono(2011)	110,26	8,17	113,59	10,73
	Inverno (2011)	230,55	17,86	234,18	26,47
	Total	173,87	54,27	155,52	60,74
Brócolis Ninja	Verão (2011)	56,11	10,75	97,57	24,26
	Outono (2011)	68,85	3,03	68,59	9,97
	Inverno (2011)	374,05	22,65	403,77	21,41
	Primavera (2011)	269,73	0,45	130,88	7,57
	Outono (2012)	191,82	7,06	115,35	7,49
	Total	192,11	125,31	163,23	127,03
Chicoria	Primavera (2011)	205,09	11,21	226,44	6,00
	Outono (2012)	149,87	4,63	157,67	4,19
	Inverno(2012)	172,96	3,69	166,37	5,84
	Primavera (2012)	145,51	9,07	185,86	9,94
	Total	168,36	25,56	184,09	28,28
Brocolis Comum	Primavera (2011)	368,97	8,02	250,55	8,26
	Outono (2012)	246,25	6,06	205,54	5,94
	Inverno (2012)	155,15	6,64	172,75	5,32
	Primavera (2012)	165,06	3,84	202,17	7,54
	Total	233,86	89,61	177,75	31,97
Almeirão	Primavera (2011)	208,44	6,92	243,13	3,02
	Outono (2012)	132,75	7,60	174,62	4,91
	Inverno(2012)	118,00	3,17	150,97	1,45
	Primavera (2012)	97,37	2,24	83,58	7,46
	Total	139,14	44,05	163,07	59,70
Catalonha	Inverno (2012)	279,01	4,03	171,00	4,04
	Primavera (2012)	280,18	9,46	281,14	6,03
	Total	279,59	6,54	226,07	60,50
Salsão	Inverno (2012)	322,14	1,32	293,03	2,97
	Primavera (2012)	268,01	3,00	324,14	1,60
	Total	295,07	29,72	308,58	17,17

* Análises realizadas em triplicata e resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão. # Amostras que sofreram o processo de cozimento, seguindo a metodologia da TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - UNICAMP.

A maioria dos vegetais são comumente tratados termicamente antes de serem consumidos. Sabe-se que este tratamento induz mudanças significativas na composição química do alimento, que afetam a biodisponibilidade, a concentração de nutrientes e a promoção da saúde por compostos tais como a vitamina C e E, carotenóides e polifenóis (PELLEGRINI et al., 2010).

Visando reproduzir a prática doméstica de tratamento térmico para produtos como hortaliças folhosas e florais comumente utilizadas na culinária brasileira, foi escolhido para este trabalho o método de cocção (LIMA-PALLON; CATHARINO; GODOY, 2008). Os procedimentos foram realizados seguindo o protocolo estabelecido segundo as características das hortaliças, sendo que para as amostras folhosas o tempo de cozimento foi de 10 minutos e para as florais 20 minutos. Cerca de 300 gramas de cada amostra foram pesados em balança analítica. Em seguida foram acomodadas em uma panela de aço inoxidável com capacidade de 4 Litros, e adicionadas a 1,5 Litros de água medidos em proveta de 2 Litros. O cozimento foi realizado em fogão convencional, sempre utilizando a mesma boca do fogão em chama média. A medida do tempo de cozimento se iniciava logo após o início da ebulição da água e as marcações foram feitas utilizando cronômetro com alarme sonoro.

Os resultados apresentados na **TABELA 10** sugerem alterações nas quantidades de vitamina K nas hortaliças avaliadas, tanto entre as coletas como entre os processamentos. Neste último, os valores da porcentagem média da perda com o processamento mostraram que a cocção produziu perdas da filoquinona (vitamina K₁) na maioria das amostras analisadas quando comparadas com as mesmas *in natura*, sendo que para as amostras de acelga a perda foi de 14,95%, para o repolho verde de 20,90%, para o espinafre de 30,12%, para a escarola de 10, 56%, para o brócolo Ninja 15,03%, para o brócolo comum de 23,99% e para a catalonha 19,14%. As amostras de couve manteiga apresentaram em média 1,15% de perda da vitamina K, indicando que praticamente não sofreram os efeitos do cozimento. Os diferenciados comportamentos observados com relação aos teores da vitamina para as

amostras que sofreram o processo de cocção podem ter sido ocasionados pelas quantidades de perdas ou as incorporações de água pelas amostras com o processo.

Os efeitos da cocção por tratamentos térmicos a vapor e microondas em substâncias fitoquímicas (polifenóis, carotenóides e ácido ascórbico) de legumes e vegetais frescos têm sido extensivamente estudados e efeitos positivos e negativos relatados dependendo das diferenças nas condições de processo, diferenças morfológicas e características nutricionais de diferentes espécies de vegetais (MAZZEO et al., 2011, MIGLIO et al., 2008; GLISZCZYNSKA-SWIGLO et al., 2006; PELLIGRINI et al., 2010 e 2003, TUKMEN et al., 2005).

Os autores Mazzeo et al. (2011) avaliaram os efeitos do cozimento a vapor e por ebulição em amostras de espinafre e de couve-flor e relataram que ambos tratamentos apresentaram alterações significativas na composição nutricional dos vegetais estudados. Pellegrini et al. (2010) demonstram que diferentes processos térmicos domésticos aumentaram a biodisponibilidade de polifenóis e carotenóides, destacando o papel positivo do cozimento sobre as qualidades nutricionais dos vegetais. Essas melhorias oferecidas pelos tratamentos térmicos em vegetais também foram relatados pelos autores Miglio et al. (2008), Booth et al. (2012), Pellegrini et al. (2010) e Damon et al. (2005) em seus trabalhos sobre a eficiência de absorção da vitamina K₁. Esses autores relataram que a absorção pode ser muito variada e menos eficiente quando o alimento é ingerido cru, pelo fato da vitamina estar intimamente ligada às membranas dos tilacóides e cloroplastos nas células desses vegetais. A absorção é mais eficiente quando os alimentos são ingeridos processados pois a ruptura da matriz alimentar promove o aumento da biodisponibilidade de muitos fitoquímicos, melhorando assim a qualidade nutricional de vegetais. Os autores ressaltam ainda que os dados existentes sobre diferentes métodos de processamentos térmicos de vegetais são fragmentados e incompletos, tornando difícil a comparação entre os estudos.

A análise estatística apresentada na **TABELA 10** mostrou que as hortaliças apresentam teores de vitamina K em amostras *in natura* e cozidas em média diferentes entre as coletas ($p < 0,05$ Coleta*Processamento). Apenas a couve manteiga apresentou comportamento semelhante para esta vitamina nas diferentes coletas ($p = 0,070$). Esta quando analisada *in natura* e processada não difere em média nos teores da filoquinona (vitamina K₁) podendo concluir-se que difere em média entre as coletas independentemente do processamento ($p = 0,006$). No período do outono (2011), não foram encontradas amostras de couve manteiga para coleta devido à sazonalidade deste produto. Para as demais amostras as quais os comportamentos se mostraram diferentes, foram realizados testes estatísticos individuais, visando avaliar o momento das ocorrências nas alterações dos teores da vitamina quando analisadas *in natura*, processadas e épocas de coletas. Para melhor visualização dos resultados, estes resultados estão apresentados como gráficos em barra nas **FIGURAS 6.1 a 6.12**.

Figura 6.1— Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em acelga (*Beta vulgaris* L.var. cicla) *in natura* e processada, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de acelga entre coletas e tipo de processamento, nas diversas épocas do ano (**Figura 6.1**) verifica-se que o valor médio de vitamina K na acelga *in natura* no outono (2011) foi em média estatisticamente maior que a cozida ($p = 0,043$). Para as amostras de

acelga não se observou diferença média entre as coletas independentemente do processamento ($p = 0,493$).

Figura 6.2 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em repolho verde (*Brassica oleracea* L. var. capitata) *in natura* e processado, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de repolho verde entre coletas e tipo de processamento, nas diversas épocas do ano (**Figura 6.2.**) verifica-se que a vitamina K no repolho verde foi em média estatisticamente menor na coleta de outono (2011) em comparação com as demais coletas tanto *in natura* como processado ($p < 0,05$). Na primavera (2011) a quantidade média de vitamina K no repolho verde *in natura* foi estatisticamente maior que o cozido ($p < 0,001$). Apesar de não diferir estatisticamente, no geral, o repolho verde cru mostrou maior valor da vitamina em comparação ao cozido nas diferentes coletas, apontando maiores perdas com a cocção, sugerindo para essa hortaliça o consumo na sua forma crua para melhor aproveitamento da vitamina.

Figura 6.3 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em espinafre (*Spinacea oleracea* L.) *in natura* e processado, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de espinafre entre coletas e tipo de processamento, nas diversas épocas do ano (**Figura 6.3.**) verifica-se que o espinafre apresentou em média estatisticamente maior valor de vitamina K *in natura* no outono (2011) em relação ao Verão (2011) ($p = 0,006$) e quando cozido o maior valor ocorreu no inverno (2011) em comparação com o verão (2011) e outono (2011) ($p < 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente). Os valores *in natura* foram em média estatisticamente maiores que os cozidos no verão (2011) e outono (2011) ($p = 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente).

Figura 6.4 – Teores de médios filoquinona (vitamina K₁) em couve manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) *in natura* e processado, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de couve manteiga entre coletas e tipo de processamento, nas diversas épocas do ano (**Figura 6.4.**) verifica-se que a quantidade média de vitamina K na couve manteiga foi estatisticamente maior no inverno (2011) e menor no verão (2011) diferindo em média entre cada coleta independente do tipo de processamento ($p < 0,05$).

Figura 6.5 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) *in natura* e processada, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de couve-flor entre coletas e tipo de processamento, nas diversas épocas do ano (**Figura 6.5.**) verifica-se que a quantidade média de vitamina K na couve-flor no inverno (2011) foi estatisticamente maior *in natura* e cozida. Nas demais coletas ($p < 0,05$) o valor médio de vitamina K foi estatisticamente maior na couve-flor cozida que *in natura* ($p < 0,05$) com exceção da coleta no verão (Ano 1) ($p = 0,484$). Os teores da vitamina nas amostras processadas sempre foram maiores quando comparados com as mesmas amostras analisadas *in natura* em todas as coletas. Através desses dados, podemos concluir que o processamento favoreceu a maior extração da vitamina, devido ao rompimento das membranas das células das matrizes alimentares com o aquecimento, deixando o composto de interesse mais exposto facilitando sua extração, fator este também relatado pelos autores Gliszczynska-Swiglo et al., 2006, em estudo sobre avaliação do cozimento por ebulição em amostras de vegetais.

Figura 6.6 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em escarola (*Cichorium endivia*) *in natura* e processada, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de escarola entre coletas e tipo de processamento, nas diversas épocas do ano (**Figura 6.6.**) verifica-se que a escarola em média tem maior quantidade de vitamina K no

inverno (2011) que em todas as demais coletas ($p < 0,05$), tanto *in natura* como cozida. Somente no verão (2011) a quantidade média foi estatisticamente maior *in natura* que cozida ($p = 0,009$).

Figura 6.7 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em brócolo ninja (*Brassica oleracea* var. *itálica*) *in natura* e processado, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de brócolo ninja entre coletas e tipo de processamento, nas diferentes épocas do ano (**Figura 6.7.**) verifica-se que a maior quantidade média de vitamina K no brócolo ninja ocorreu no inverno (2011), tanto *in natura* como cozido ($p < 0,05$). Na coleta de primavera (2011) e outono (2012) a quantidade média de vitamina K foi estatisticamente maior no brócolo ninja *in natura* que no cozido ($p < 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente). As variações nos teores da vitamina para as amostras de brócolo ninja podem ser devidas a diferenças nos tratos de cultivo e local de plantio, pois foram cultivados em diferentes regiões (**TABELA 7**) além das ocorrências de intensas chuvas nos primeiros meses do ano de 2011 que podem ter contribuído para obtenção dos baixos teores da vitamina.

Figura 6.8 – Teores médios de filloquinona (vitamina K₁) em chicória (*Cichorium intybus* L.) *in natura* e processada, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de chicória entre coletas e tipo de processamento, nas diversas épocas do ano (**Figura 6.8.**) verifica-se que somente na primavera (2012) a quantidade média de vitamina K foi estatisticamente maior na chicória cozida ($p < 0,001$). Tanto *in natura* como cozida a chicória apresentou maior concentração média de vitamina K na primavera (2011) ($p < 0,05$).

Figura 6.9 – Teores médios de filloquinona (vitamina K₁) em brócolo comum (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) *in natura* e processado, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de brócolo comum entre coletas e tipo de processamento, nas diversas épocas do ano (**Figura 6.9.**) verifica-se que o brócolo comum *in natura* apresentou maior valor médio de vitamina K na primavera (2011) e este valor foi decaindo ao longo das demais coletas ($p < 0,05$). As amostras que sofreram o processo de cocção apresentaram valor médio de vitamina K estatisticamente maior na primavera (2011) e menor no inverno (2012) ($p < 0,05$). A concentração média de vitamina K foi estatisticamente maior no brócolo comum *in natura* na primavera (2011) e outono (2012) ($p < 0,05$), com exceção apenas primavera (2012) ($p = 0,136$). As variações nos teores da vitamina para as amostras de brócolo comum podem ser devidas as diferenças nos tratos de cultivo e local de plantio, pois foram hortaliças cultivadas em diferentes regiões (**TABELA 7**). Estudos sobre avaliação do cozimento por ebulição em amostras de brócolo mostram reduções significativas nos teores de flavonóides, ácidos fenólicos e folatos, por outro lado, ocorreram aumentos significativos nos teores de carotenos, polifenóis, luteína e vitamina E. Os autores atribuem que os aumentos nos conteúdos estão relacionados com as suas disponibilidades melhoradas para as extrações, enquanto as perdas observadas dos compostos são principalmente devido à sua lixiviação durante o cozimento em água, indicando ser importante incentivar o aproveitamento da água do cozimento, a fim de que uma maior quantidade de compostos nutricionais possa ser ingerida (LIMA-PALLONE; CATHARINO; GODOY, 2008; GLISZCZYNSKA-SWIGLO et al., 2006).

Figura 6.10 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em almeirão (*Cichorium intybus* L.) *in natura* e processado, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de almeirão entre coletas e tipo de processamento, nas diversas épocas do ano (**Figura 6.10.**) verifica-se que os valores médios de vitamina K no almeirão são estatisticamente maiores quando cozidos que *in natura* em todas as coletas ($p < 0,05$), com exceção de primavera ($p = 0,131$). Tanto *in natura* como cozido o almeirão apresentou maior concentração média de vitamina K na primavera (2011) e menor valor na primavera (2012) ($p < 0,05$).

Figura 6.11 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em catalonha (*cicharium inlybus*) *in natura* e processada, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de catalonha entre coletas e tipo de processamento, nas épocas do ano amostradas (**Figura 6.11.**) verifica-se que o valor médio de vitamina K na catalonha foi estatisticamente maior *in natura* que cozido no inverno (2012) ($p < 0,001$) e quando cozida a vitamina K na primavera foi estatisticamente maior que no inverno (2012) ($p < 0,001$).

Figura 6.12 – Teores médios de filoquinona (vitamina K₁) em salsão (*Apium graveolens* L. var. *rapaceum*) *in natura* e processado, em diferentes épocas do ano.

Na comparação dos teores da vitamina K, nas amostras de salsão entre coletas e tipo de processamento, nas épocas do ano amostradas **Figura 6.12.** verifica-se que no inverno (2012) a vitamina K média no salsão *in natura* foi maior que cozida. Na primavera (2012) ocorreu o inverso ($p < 0,001$), tanto que *in natura* o valor médio de vitamina K no salsão foi estatisticamente maior no Inverno (2012) que na primavera (2012) e quando cozida está relação se inverteu ($p < 0,001$).

5.5. Avaliação da cor das amostras coletadas na CEAGESP

A análise instrumental de cor foi aplicada depois de se observar que os maiores teores para filoquinona (vitamina K₁) encontrados foram em amostras de hortaliças folhosas analisadas *in natura*, as quais apresentaram suas folhas e/ou flores com colorações verdes mais escuras, tais como, salsa, espinafre, brócolo, ninja e agrião. Por outro lado, os teores mais baixos da vitamina foram obtidos em amostras de couve-flor, alface americana e acelga; essas hortaliças apresentam colorações verdes mais claras. Portanto, esta análise foi realizada, objetivando-se verificar a relação do teor da vitamina estudada com a intensidade da coloração verde para algumas amostras de hortaliças e verificar possíveis alterações na coloração dessas amostras submetidas ao processamento de cocção. A **TABELA 11** apresenta os resultados das análises de cor realizadas em algumas amostras de hortaliças folhosas *in natura*, em comparação com os teores da filoquinona (vitamina K₁) encontradas para as mesmas.

Tabela 11 – Médias* dos parâmetros de cor de algumas amostras analisadas in natura, em comparação com o teor da filoquinona (vitamina K₁), expressas em %, base úmida.

Amostras	Parâmetros de cor *	Filoquinona (µg/100g)**
CEBOLINHA		
L*	18,45 ±0,84	104,94 ± 6,30
a*	-11,08 ±0,12	
b*	22,58 ±0,33	
COENTRO		
L*	11,76 ±0,66	299,93 ± 5,77
a*	-2,49 ±0,54	
b*	14,32 ±1,10	
HORTELÃ		
L*	9,19 ±0,39	348,38 ± 2,25
a*	-2,6 ±0,43	
b*	10,37 ±0,88	
MANJERICÃO		
L*	14,79 ±0,70	385,97 ± 9,22
a*	-1,33 ±0,23	
b*	13,41 ±0,66	
AGRIÃO		
L*	22,24 ±0,54	263,63 ± 7,01
a*	-10,11 ±0,07	
b*	24,85 ±1,30	
ALMEIRÃO (PÃO DE AÇÚCAR)		
L*	17,44 ±0,60	97,30 ± 2,24
a*	-3,91 ±0,22	
b*	11,68 ±0,41	
CHICÓRIA		
L*	26,79 ±0,47	145,52 ± 9,07
a*	-3,65 ±0,22	
b*	10,37 ±0,73	
BRÓCOLO COMUM		
L*	25,11 ±0,50	165,13 ± 5,43
a*	-12,08 ±0,75	
b*	28,71 ±1,36	
CATALONHA		
L*	5,95 ±1,54	280,18 ± 9,46
a*	-2,12 ±0,33	
b*	6,21 ±0,87	
SALSÃO		
L*	26,30 ±0,68	268,44 ± 4,10
a*	-6,75 ±0,30	
b*	19,39 ±0,55	

* Resultados de 6 repetições expressos em Média ± Desvio Padrão.

L* = luminosidade (0 = preto e 100 = branco);

a* = intensidade de verde/vermelho (-80 até zero = verde, do zero ao +100 = vermelho);

b* = intensidade de azul/amarelo (-100 até zero = azul, do zero ao +70 = amarelo).

** Análise realizada em triplicata e resultados expressos em Média ± Desvio Padrão.

O sistema CIELAB permitiu registrar a luminosidade das amostras de hortaliças folhosas analisadas (L^*) e as coordenadas cromáticas a^* ($-a^*$, verde; $+a^*$, vermelho) e b^* ($-b^*$, azul; $+b^*$, amarelo). Os resultados apresentados na **TABELA 11** demonstraram que para todas as hortaliças analisadas os valores concentraram-se na faixa de intensidade de a^* para a coloração verde, pois apresentaram resultados menores que zero, resultando na coloração verde. As amostras variaram na negatividade dos resultados indicando que quanto maior o valor negativo, maior a intensidade desta coloração. Os maiores valores foram obtidos para as amostras cebolinha, agrião, brócolo comum e salsão. Para a intensidade de b^* , todas as hortaliças apresentaram valores concentrando-se na faixa da coloração amarela, pois os valores foram maiores que zero. Os autores Booth (2012) e Klac e Carvalho (2006), em trabalhos de revisão, citam o grupo dos vegetais verdes escuros, como alimentos ricos na vitamina K_1 , dando o exemplo do espinafre e brócolo contendo aproximadamente 180 a 440 $\mu\text{g}/100\text{g}$ alimento, mostrando que a filoquinona (vitamina K_1) deve estar associada a tecidos que realizam a fotossíntese fazendo com que os vegetais verdes escuros com altas concentrações de clorofila contenham os maiores teores dessa vitamina. Portanto, métodos estatísticos foram utilizados para verificar possíveis correlações dos teores da vitamina obtidos nas amostras e os parâmetros de cor encontrados. Os resultados destas análises apresentados nos **GRÁFICOS 1 a 3** mostram que não há correlação linear estatisticamente significativa dos fatores de cor e de luminosidade com a concentração da filoquinona (vitamina K_1) para as amostras de hortaliças folhosas analisadas *in natura* ($p > 0,05$). Observou-se dispersões nos dados gerados, ao invés de curvas lineares ($a^* r = 0,039$; $b^* r = 0,102$; $L^* r = 0,008$). O **GRÁFICO 1** apresentando os resultados da intensidade da cor verde (a^*) com o teor da filoquinona (vitamina K_1) mostra que as amostras de manjerição, hortelã, coentro e catalonha obtiveram os maiores teores da vitamina e baixas intensidades da cor verde. Por outro lado, as amostras de brócolo comum e cebolinha obtiveram os menores teores da vitamina e maiores intensidade da cor verde, indicando que para estas amostras a intensidade da coloração verde

não pode ser relacionada com maiores concentrações vitamina K₁.

Gráfico 1– Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas *in natura* e o fator a* de intensidade da cor verde.

Gráfico 2– Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas *in natura* e o fator b* de intensidade da cor amarela.

Gráfico 3 – Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas *in natura* e o fator L* de intensidade da luminosidade.

A **TABELA 12** apresenta resultados das análises de cor de algumas amostras de hortaliças folhosas *in natura* e processadas em comparação com os teores da filoquinona (vitamina K₁) encontradas para as mesmas.

Tabela 12 – Médias* dos parâmetros de cor de algumas amostras analisadas in natura e processadas por cocção, em comparação com o teor da filoquinona (vitamina K₁), expressas em %, de material base úmida.

Amostras	<i>In natura</i>	Filoquinona (µg/100g)**	Processada [#]	Filoquinona (µg/100g)**
ALMEIRÃO (PÃO DE AÇÚCAR)				
L*	17,44 ±0,60		17,44 ±0,52	
a*	-3,91 ±0,22	97,30 ± 2,24	-2,39 ±0,31	83,30 ± 2,24
b*	11,68 ±0,41		19,18 ±0,41	
CHICÓRIA				
L*	26,79 ±0,47		20,92 ±0,22	
a*	-3,65 ±0,22	145,52 ± 9,07	-5,86 ±0,09	185,86±9,9
b*	10,37 ±0,73		15,48 ±0,46	
BRÓCOLO COMUM				
L*	25,11 ±0,50		27,45 ±0,18	
a*	-12,08 ±0,75	165,13 ± 5,43	-1,28 ±0,05	202,17± 7,54
b*	28,71 ±1,3		30,94 ±0,38	
CATALONHA				
L*	5,95 ±1,54		10,71 ±0,21	
a*	-3,12 ±0,33	280,18 ± 9,46	-2,68 ±0,12	281,53 ± 3,47
b*	6,21 ±0,87		12,87±0,48	
SALSÃO				
L*	26,30 ±0,68		18,54 ±0,64 ^a	
a*	-6,75 ±0,30	268,44 ± 4,10	-7,82 ±0,13 ^b	324,23 ± 2,25
b*	19,39 ±0,55		15,78 ±1,40 ^a	

[#] Amostras que sofreram o processo de cozimento, seguindo a metodologia do TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - UNICAMP.

* Resultados de 6 repetições expressos em Média ± Desvio Padrão.

L*= luminosidade (0 = preto e100 = branco);

a*= intensidade de verde/vermelho (-80 até zero = verde, do zero ao +100 = vermelho);

b*= intensidade de azul/amarelo (-100 até zero = azul, do zero ao +70 = amarelo).

** Análise realizada em triplicata e resultados expressos em Média ± Desvio Padrão.

As hortaliças folhosas que sofreram cocção **TABELA 12** mostram o efeito do cozimento, em relação aos parâmetros de cor para todas as amostras analisadas. O processo de cocção apresentou os resultados dos parâmetros a* (intensidade da cor verde) mais próximos do zero indicando perda da coloração verde. Este fator foi mais acentuado na amostra de brócolo comum de -12,08±0,75 para -1,28±0,05. Para os parâmetros b* (intensidade da cor amarela) foi observado aumento na intensidade do amarelo em relação as mesmas amostras *in natura*. Com exceção do salsão, as hortaliças que apresentaram as maiores alterações foram almeirão de 11,68±0,41 para 19,18±0,41 e catalonha de 6,21±0,87 para 12,87±0,48. Os autores Mazzeo et al., 2011 igualmente descrevem

alterações na coloração das hortaliças por elas analisadas quando processadas por cocção. Os **GRÁFICOS 4 a 6** mostram que os fatores de coloração e luminosidade não estão correlacionados linearmente aos teores de filoquinona (vitamina K₁) para as amostras de hortaliças folhosas processadas ($p > 0,05$). Observou-se dispersões dos dados gerados, ao invés de curvas lineares ($r = 0,039$ para os parâmetros a^* , b^* e L^*). A perda da coloração verde (fator a^*) e diminuição da concentração da vitamina foram verificadas somente na amostra de almeirão. Portanto, os efeitos esperados para todas as amostras de hortaliças folhosas quando processadas, sobre as perdas significativas da coloração verde durante o processo de cocção resultando em menores teores da vitamina, não foram observados para a maioria das amostras analisadas.

Gráfico 4 – Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas cozidas e o fator a^* de intensidade da coloração verde.

Gráfico 5 – Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas cozidas e o fator b* de intensidade da coloração amarela.

Gráfico 6 – Correlação de Pearson entre a concentração de filoquinona (vitamina K₁) em amostras de hortaliças folhosas analisadas cozidas e o fator L* de intensidade Luminosidade.

5.6. Avaliação dos teores da filoquinona (vitamina K₁) em amostras coletas na CEAGESP em comparação aos valores da USDA.

A **TABELA 13** apresenta a média da triplicata dos dados das amostras analisadas coletadas na CEAGESP durante as diferentes épocas dos anos de 2011 e 2012, comparando com os teores para mesmas hortaliças descritas na literatura.

Tabela 13 – Teores de filoquinona (Vitamina K1) das amostras analisadas *in natura*, comparadas com os teores encontrados na Tabela Americana – USDA, expressos em µg/100g de amostra, base úmida.

Amostras in natura	Filoquinona (µg/100g)			p#
	CEAGESP*		USDDA**	
	Média	DP		
Alface Americana	77,79	50,06	102,30	0,079
Alface Crespa	112,49	45,38	126,30	0,315
Salsa	491,05	103,05	1640,00	<0,001
Rúcula	259,11	67,03	108,60	<0,001
Acelga	139,64	21,50	830,00	<0,001
Repolho Verde	286,62	79,55	76,00	<0,001
Espinafre	375,10	53,11	482,90	<0,001
Couve Manteiga	245,52	84,12	817,00	<0,001
Couve-flor	32,56	10,43	15,50	0,001
Escarola	173,87	54,27	231,00	0,013
Brócolo Ninja	192,11	125,31	84,80	0,005
Coentro	257,59	46,53	310,00	<0,001
Manjeriço	334,65	56,71	-	
Salsão	295,07	29,72	41,00	<0,001
Catalonha	279,59	6,54	-	
Cebolinha	145,13	44,46	207,00	<0,001
Agrião	289,07	38,62	250,00	<0,001
Chicória	168,36	25,56	297,60	<0,001
Almeirão	139,14	44,05	231,00	<0,001
Brócolo Comum	233,86	89,61	101,60	<0,001
- Valores não encontrados na tabela americana				
* Resultados de triplicatas de amostras analisadas em diferentes épocas dos anos de 2011 a 2012.				
** USDA - United States Department of Agriculture.				
# Nível descritivo do teste estatístico				

A **Tabela 13** mostra que apenas alface americana e alface crespa *in natura* apresentam em média estatisticamente a mesma quantidade de vitamina K no CEAGESP e tabela americana ($p > 0,05$). A salsa, acelga, espinafre, couve manteiga, escarola, coentro, cebolinha, chicória e almeirão apresentam em média menor valor de vitamina K nas amostras do CEAGESP que na tabela americana ($p < 0,05$), enquanto que rúcula, repolho verde, couve-flor, brócolo ninja, salsão, agrião e brócolo comum apresentam estatisticamente maior média de vitamina K nas amostras da CEAGESP ($p < 0,05$).

O conhecimento do teor de vitamina K nos alimentos é bastante relevante em pesquisas as quais avaliam a relação entre a ingestão dietética da vitamina e o estado nutricional do indivíduo. Em vários trabalhos foram encontradas variações significativas dos teores no consumo desta vitamina. Os autores Booth et al.(2004) analisando a ingestão de vitamina K e a densidade mineral óssea em homens e mulheres, observaram um consumo 171µg/dia para as mulheres e 153µg/dia para os homens. Entretanto, no The Rotterdam Study a média do consumo de filoquinona (vitamina K₁), foi de 244µg/dia para as mulheres e de 257µg/dia para os homens (GELEIJNSE; VERMEER; GROBBEE, 2004).

As variações dos teores na ingestão da vitamina também foram relatadas em pesquisa brasileira, em investigação da ingestão de alguns nutrientes em indivíduos com osteoporose, onde foi verificada a ingestão de vitamina K em homens e mulheres, sem fratura, que foi entre 29-64µg/dia e de 34-74 µg/dia, respectivamente (PINHEIRO et al., 2009). Ressalta-se que a recomendação diária de ingestão para vitamina K é de 120 µg/ dia para os homens e 90 µg/ dia para as mulheres (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001). O Institute of Medicine preconiza que para uma menor prevalência de inadequação, o consumo da referida vitamina deve ser $\geq$ AI. Em estudo recente desenvolvido junto à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - SP a autora Souza (2011), aplicou um inquérito alimentar em adultos e idosos, visando à análise da ingestão habitual de vitamina K e verificou o consumo insuficiente da vitamina. Os teores de ingestão de vitamina K segundo a faixa etária foram de 88 µg/dia (20-29 anos), 98 µg/dia (30-59 anos) e 104 µg/dia ($\geq$ 60 anos). Nesta pesquisa foi demonstrado que o consumo de vitamina K esteve acima ou igual ao recomendado pela Dietary Reference Intakes (DRI) em aproximadamente 50% das mulheres e em menos de 35% dos homens (Souza, 2011). Segundo dados da última Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) (IBGE, 2011) os principais folhosos consumidos no Brasil são alface, repolho e couve; juntos estes representam cerca de 17,5 µg do consumo diário de filoquinona. Ressalta-se que o consumo de filoquinona (vitamina K₁) provém, principalmente, da ingestão de hortaliças folhosas e no

Brasil este consumo é de apenas 10,8 g/dia (IBGE, 2011). Outros estudos na população brasileira demonstram que consumo de vegetais no geral é baixo (SOUZA; RODRIGUES; PENTEADO, 2012; VIEBIG et al., 2009; JAIME et al., 2007). Entretanto, vários estudos relatam que o consumo de frutas, hortaliças e legumes é maior na população idosa (FIGUEIREDO; JAIME; MONTEIRO, 2008; JAIME; MONTEIRO, 2005). Souza, Rodrigues e Penteado (2012) relataram uma correlação linear entre o consumo total de vitamina K e a ingestão dessa vitamina através de hortaliças; observaram ainda que o consumo de vitamina K através da ingestão de hortaliças apresentou forte correlação com o consumo total de vitamina K (0,95). Dessa forma, as autoras concluíram que na população estudada o consumo das hortaliças foi o que mais contribuiu para a ingestão total de vitamina K. Resultados semelhantes foram descritos por Dôres, Paiva e Campana (2001) em um estudo com pacientes em terapia anticoagulante. Booth et al. (1996) também observaram que na ingestão habitual, foram as hortaliças que mais contribuíram para ingestão total de vitamina K, colaborando com 34 a 42% da ingestão total, para homens e mulheres, respectivamente. Booth, et al., (2012) em trabalho de revisão relataram que a ingestão da filoquinona (vitamina K₁) está em constante diminuição ao longo das últimas duas décadas nos Estados Unidos, de acordo com um concomitante declínio no consumo de vegetais verdes entre as populações jovens adultas e idosas; esta última apresentando um subgrupo potencialmente vulnerável a baixa ingestão da vitamina, com o risco de certas doenças tais como doenças cardiovasculares e da osteoartrite.

As discrepâncias entre os teores da vitamina K observados em diferentes tabelas de composição de alimentos podem refletir nos resultados desses estudos sobre a ingestão da vitamina. Pesquisas tem demonstrado que a vitamina K, tem sido inadequadamente estudada, sendo um dos maiores problemas aquele relacionado com as próprias tabelas de composição de alimentos por apresentarem grandes variações dos teores da vitamina para um mesmo alimento (BOOTH et al., 2012; SOUZA; RODRIGUES; PENTEADO, 2012; KLACK; CARVALHO, 2006; DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001). Foram constatadas essas

variações em vários trabalhos internacionais, além de pesquisas brasileiras que fazem uso dos dados americanos os quais verificamos não são condizentes para a maioria das hortaliças folhosas cultivadas em solo brasileiro e analisadas neste trabalho. Pesquisadores ressaltam que as diferenças geográficas nos dados de composição de alimentos devem ser consideradas quando da aplicação bases de dados de composição para pesquisas regionais (BOOTH, 2012; PELLEGRINI et al., 2003). Em razão disso, faz-se necessária a realização de novos estudos e aprimoramento da tabela de composição, para ampliar o conhecimento sobre os teores de vitamina K nos alimentos brasileiros.

6. CONCLUSÕES

Com base no que foi apresentado, concluímos que:

- O método de análise utilizado na presente pesquisa foi efetivo, podendo ser utilizado na determinação da filoquinona (vitamina K₁) em amostras de hortaliças folhosas.
- A maioria das amostras analisadas apresentaram variações de filoquinona (vitamina K₁) nas diferentes épocas do ano.
- Apesar dos resultados mostrarem que as maiores concentrações da filoquinona (vitamina K₁), foram obtidas em amostras de hortaliças folhosas *in natura* de coloração verde mais escura, enquanto que os menores teores da vitamina foram encontrados em amostras que apresentavam coloração verde clara, a análise estatística mostrou que a análise de cor realizada nas amostras estudadas não apresentou correlação da intensidade da cor verde com os maiores teores da vitamina.
- Nos períodos de inverno e primavera a maioria das hortaliças analisadas apresentou os maiores teores da filoquinona (vitamina K₁).
- Os teores de filoquinona (vitamina K₁) nas hortaliças provenientes da CEAGESP são diferentes daquelas apresentadas na tabela da USDA, com exceção das alfaces americanas e alface crespa.
- O processamento das hortaliças folhosas por cocção provocou alteração nos teores da filoquinona (vitamina K₁) em comparação com as amostras *in natura*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJARALLAH, B.; FERNANDES, G.; JEEJEEBHOY, K.N.; GRAMLICH, L.M.; WHITTAKER, J.S.; ARMSTRONG, D.; DUERKSEN, D.R.; ALLARD, J.P. The Canadian home total parenteral nutrition (HTPN) registry: vitamin K supplementation and bone mineral density. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.36, n.4, p.415-420, 2012.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.D.V.C. Carotenoides. In: PENTEADO, M.D.V.C. **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole, p.3-52, 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico que institui as boas práticas de dispensação em farmácias e drogarias**. Brasília: ANVISA, 2003.

ARAGÃO, N.M.; VELOSO, M.C.C.; ANDRADE, J.B. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metexantinas em bebidas. **Química Nova**, v.52, n.32, p.2476-2481, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. (nº/925.09B). cap. 32, p. 1. 1995.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.17, p.385-396, 2004.

BEULENS, J.W.J.; BOOTH, S.L.; VAN DEN HEUVEL, E.G.H.M.; STOECKLIN, E.; BAKA, A.; VERMEER, C. The role of menaquinones (vitamin K2) in human health. **British Journal of Nutrition**. p 1-12, 2013.

BEULENS, J.W.J.; VANDER, A.D.L.; GROBBEE, D.E. Dietary phylloquinone and menaquinones intakes and risk of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.33, n.8, p.1699-1705, 2010.

BEULENS, J.W.J.; BOTS, M.L.; ATSMAN, F.; BARTELINK, M.L.; PROKOP, M.; GELEIJNSE, J.M.; WITTEMAN, J.C.; GROBBEE, D.E.; VAN DER SCHOUW, Y.T. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. **Atherosclerosis**, v.203, n.2, p.489-493, 2009.

BINKLEY, N.C.; SUTTIE, J.W. Vitamin K nutrition and osteoporosis. **Journal of Nutrition**, v.125, n.7, p.1812-1821, 1995.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BONJOUR, J-P.; GUE´GUEN, L.; PALACIOS, C.; SHEARER, M.J.; WEAVER, C.M. Minerals and vitamins in bone health: the potential value of dietary enhancement. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 1581–1596, 2009.

BOOTH, S.L. Vitamin K: food composition and dietary intakes. **Food & Nutrition Research**, v.56, p.1-5, 2012.

BOOTH, S.L.; PETERSON, J.W.; SMITH, D.; SHEA, M.K.; CHAMBERLAND, J.; CRIVELLO, N. Age and dietary form of vitamin K affect menaquinone-4 concentrations in male fischer 344 rats. **Journal of Nutrition**, v.138, p.492-296, 2008.

BOOTH, S.L.; GOLLY, I.; SACHECK, J.M.; ROUBENOFF, R.; DALLAL, E.G.; HAMADA, K.; BLUMBERG, J.B. Effect of vitamin E supplementation on vitamin K status in adults with normal coagulation status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p.143-148, 2004.

BOOTH, S.L.; MARTINI, L.; PETERSON, J.W.; SALTZMAN, E.; DALLAL, G.E.; WOOD, R.J.; Dietary phylloquinone depletion and repletion in older women. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2565-2569, 2003a.

BOOTH, S.L.; BROE, K.E.; GAGNON, D.R.; TUCKER, K.L.; HANNAN, M.T.; MCLEAN, R.R.; DAWSON-HUGHES, B.; WILSON, P.W.F.; CUPPLES, L.A.; KIEL, D.P. Vitamin K intake and bone mineral density in women and men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.512-516, 2003b.

BOOTH, S.L.; SUTTIE, J.W. Dietary intake and adequacy of vitamin K. **Journal of Nutrition**, v.128, p.785-788, 1998.

BOOTH, S.L.; SADOWSKI, J.A.; PENNINGTON, J.A.T. Phylloquinone (vitamin K1) content of foods in the U.S. food and drug administration's total diet study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.6, p.1574-1579, 1995.

BOOTH, S.L.; DAVIDSON, K.W.; SADOWSKI, J.A. Evaluation of an HPLC method for the determination of phylloquinone (vitamin K1) in various food matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.295-300, 1994.

BOXMA, P.Y.; BERG, E.V.D.; GELEIJNSEG, J.M.; LAVERMAN, G.D.; SCHURGERS, L.J.; VERMEER, C.; KEMA, I.P.; MUSKIE, F.A.; NAVIS, G.; BAKKER, S.J.L.; BORST, M.H. Vitamin K intake and plasma desphospho-uncarboxylated matrix gla-protein levels in kidney transplant recipients. **PLoS ONE**, v.7, n.10, p.E47991, 2012.

BÜGEL, S.; SORENSEN, A.D.; HELS, O.; KRISTENSEN, M.; VERMEER, C.; JAKOBSEN, J.; FLYNN, A.; MOLGAARD, C.; CASHMAN, K.D. Effect of phylloquinone supplementation on biochemical markers of vitamin K status and

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

bone turnover in postmenopausal women. **British Journal of Nutrition**. v. 97, 373–380, 2007.

CARVALHO, O.T. **Carotenóides e composição centesimal de ervilhas (*Pisum sativum* L.) cruas e processadas**. São Paulo, 2007. 79p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêutica - Universidade de São Paulo.

CEAGESP. Armazenagem. Rede Armazenadora. **Há mais de 70 anos no mercado**. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/armazenagem/unidades/> Acessado em: 10. Fev. 2013.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADOR, M.C.; GORNI, F.R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

DAMON, M.; ZHANG, N.Z.; HAYTOWITZ, D.B.; BOOTH, S.L. Phylloquinone (vitamin k1) content of vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.751-758, 2005.

DÔRES, S.M.C.; PAIVA, S.A.R.; CAMPANA, A.O. Vitamina K: metabolismo e nutrição. **Revista de Nutrição**, v.14, n.3, p.207-218, 2001.

DÔRES, S.M.C.; FREITAS, J.I.E.; PAIVA, S.A.R.; MAFFEI, F.H.A.; CAMPANA, A.O. Estimativa da ingestão usual e fontes dietéticas de vitamina K1 em pacientes ambulatoriais. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO, 12., 2000, Buenos Aires. **Anais**. Buenos Aires, 2000. p.EM-33.

DUMONT, J.F.; PETERSON, J.; HAYTOWITZ, D.; BOOTH, S.L.; Phylloquinone and dihydrophyloquinone contents of mixed dishes, processed meats, soups and cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.595-603, 2003.

ELDER, S.J.; HAYTOWITZ, D.B.; HOWE, J.; PETERSON, J.W.; BOOTH, S.L. Vitamin K contents of meat, dairy, and fast food in the U.S. Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 463-467, 2006.

FENAPCO - FEDERAÇÃO NACIONAL DE ASSOCIAÇÕES DE PACIENTES E DE COMBATE À OSTEOPOROSE. **Osteoporose**. Disponível em: <http://www.fenapco.com.br/index2.php?pag=osteoporose>. Acesso em: 05 dez. 2012.

FERLAND, G.; SADOWSKI, J.A. Vitamina K 1 (phylloquinone) content of edible oils: effects of heating and light exposure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, 1869-1873, 1992.

FIGUEIREDO, I. C. R.; JAIME, P. C.; MONTEIRO, C. A. Fatores associados ao consumo de frutas, legumes e verduras em adultos da cidade de São Paulo.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

Revista De Saúde Pública, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 777-785, 2008.

GAO, Z.H.; ACKMAN, R.G. Determination of vitamin K1 in canola oils by high performance liquid chromatography with menaquinone-4 as an internal standard. **Food Research International**, v.28, n.1, p.61-69, 1995.

GELEIJNSE, J.M.; VERMEER, C.; GROBBEE, D.E; SCHURGERS, L.J.; KNAPEN, M.H.; VAN DER MEER, I.M.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J.C. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. **Journal of Nutrition**, v.134, n.11, p.3100-3105, 2004.

GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A.; CISKA, E.; PAULAK-LEMANSKA, K.; CHMIELEWSKW, J.; BORKOWSKW, T.; TYRAKOWSKA, B. Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing **Food Additives & Contaminants**, v.23, n.11, p.1088-1098, 2006.

HAROON, Y.; BACON, D.S. Chemical reduction system for the detection of phyloquinone (vitamin K1) and menaquinones (vitamin K2). **Journal of Chromatography**, v.384, p.383-389, 1987.

HARRINGTON, D.J.; BOOTH, S.L.; CARD, D.J.; SHEARER, M.J. Excretion of the urinary 5C—and 7C-aglycone metabolites of vitamin K by young adults responds to changes in dietary phyloquinone and dihydrophyloquinone intakes. **Journal of Nutrition**, v.137, p.1763-1768, 2007.

IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003**: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/analise.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2009.

INDYK, H.E.; WOOLLARD, D.C. Vitamin K in milk and infant formulas: determination and distribution of phyloquinone and menaquinone-4. **Analyst**, v.122, p.465-469, 1997.

INDYK, H.E.; WOOLLARD, D.C. The endogenous vitamin K1 content of bovine milk: temporal influence of season and lactation. **Food Chemistry**, v.54, n.4, p.403-407, 1995.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**: revisão 01. [S.l.]: INMETRO, 2003. 36p. (DOQ-CGCRE-008). Disponível em: http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf. Acesso em: 9 nov. 2008.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 – Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro, IBGE: 2011. Disponível em : http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/pofanalise_2008_2009.pdf. Acesso : 8 Nov. 2012.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc**. Washington: National Academy of Sciences, 2001. 773p. Disponível em: <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309072794>. Acesso em: 04 fev. 2009.

ISSHIKI, H.; SUZUKI, Y.; YONEKUBO, A.; HASEGAWA, H.; YAMAMOTO, Y. Determination of phyloquinone and menaquinone in human milk using high performance liquid chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.3, p.627-632, 1988.

JAIME, P. C.; MACHADO, F. M. S.; WESTPHAL, M. F.; MONTEIRO, C. A. Educação nutricional e consumo de frutas e hortaliças: ensaio comunitário controlado. **Revista De Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 154-157, 2007.

JAIME, P. C.; MONTEIRO, C. A. Consumo de frutas e hortaliças na população adulta brasileira, 2003. **Cadernos De Saúde Pública**, Rio de Janeiro v. 21 Suppl, p. 19-24, 2005.

JAKOB, E.; ELMADFA, I. Rapid and simple HPLC analysis of vitamin K in food, tissues and blood. **Food Chemistry**, v.68, p.219-221, 2001.

JAKOB, E.; ELMADFA, I. Application of a simplified HPLC assay for the determination of phyloquinone (vitamin K1) in animal and plant food items. **Food Chemistry**, v.56, n.1, p.87-91, 1996.

JOUNGHE, S.; VERBEECK, J.; VINKEN, P.; LAMMENS, L.; STARCKX, S.; LACHAU-DURAND, S.; BOUCHE, M-P.; WILLEMS, B.; COUSSEMENT W. Hemorrhagic cardiomyopathy in male mice treated with an NNRTI: the role of vitamin K. **Toxicologic Pathology**, v.36, p.321-329, 2008.

KAMAO, M.; SUHARA, Y.; TSUGAWA, N.; UWANO, M.; YAMAGUCHI, N.; UENINSHI, K.; ISHIDA, H.; SASAKI, S.; OKANO, T. Vitamin K content of foods and dietary vitamin K intake in Japanese young women. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.53, p.464-470, 2007.

KAMAO, M.; SUHARA, Y.; TSUGAWA, N.; OKANO, T. Determination of plasma vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using vitamin K analogs as internal standards. **Journal of Chromatography, B:**

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.816, n.1/2, p.41-48, 2005.

KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V. Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in southern Brasil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.605-611, 2003.

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.

KIRKWOOD, B.R.; STERNE, J.A.C. **Essential medical statistics**. 2.ed. Malden: Blackwell Science, 2006. 502p.

KLACK, K.; CARVALHO, J.F. Vitamina K: metalobismo, fontes e interação com o anticoagulante varfarina. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.46, n.6, p.398-406, 2006.

KNAPEN, M.H.J.; SCHURGERS, L.J.; SHEARER, M.J.; NEWMAN, P.; THEUWISSEN, E.; VERMEER, C. Association of vitamin K status with adiponectin and body composition in healthy subjects: ncarboxylated osteocalcin is not associated with fat mass and body weight. **British Journal of Nutrition**, v.108, n.7, p.1017-1024, 2012.

KNAPEN, M.H.J.; SCHURGERS, L.J.; VERMEER, C. Vitamin K₂ supplementation improves hip bone geometry and bone strength indices in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v.18, n.7, p.963-972, 2007.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62p. (Métodos cromatográficos de análise, 6).

LANHAM-NEW, S.A. Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 67, p. 163-176, 2008.

LIMA-PALLONE, A.J.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. **Química Nova**, v.31, n.3, p.530-535, 2008.

MACCREHAN, W.A.; SCHÖNBERGER, E. Determination of vitamin K1 in serum using catalytic-reduction liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v.670, p.209-217, 1995.

MAJCHRZAK, D.; ELMADFA, I. Phylloquinone (vitamin K1) content of commercially-available baby food products. **Food Chemistry**, v.74, p.275-280, 2001.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

MAZZEO, T.; N'DRI, D.; CHIVARO, E.; VISCONTI, A.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. **Food Chemistry**, v.128, n.3, p.627-233, 2011.

MCKEOWN, N.W.; JACQUES, P.F.; GUNDBERG, C.M.; PETERSON, J.W.; TUCKER, K.L.; KIEL, D.P.; WILSON, P.W.F.; BOOTH, S.L. Dietary and nondietary determinants of vitamin K biochemical measures in men and women. **Journal of Nutrition**, v.132, p.1329-1334, 2002.

MICHELAZZO, F.B.; COZZOLINO, S.M.F. Vitamina K, In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2.ed. Barueri: Manole, 2007. p.293-304.

MIGLIO, C.; CHIAVARO, E.; VISCONTI, A.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.139-147, 2008.

MOUSSA, F.; DEPASSE, F.; LOMPRET, V.; HAUTEM, J-Y.; GIRARDET, J-P.; FONTAINE, J-L.; AYMARD, P. Determination of phylloquinone in intravenous fat emulsions and soybean oil by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.664, p.189-194, 1994.

NETER, J.; KUTNER, M.H.; NACHTSHEIM, C.J.; WASSERMAN, W. Applied linear statistical models. 4.ed. Boston: WCB, McGraw-Hill, 1996. 1408p. (Irwin Series in Statistics).

NIMPTSCH, K.; NIETERS, A.; HAILER, S.; WOLFRAM, G.; LINSEINSEN, J. The association between dietary vitamin K intake and serum undercarboxylated osteocalcin is modulated by vitamin K epoxide reductase genotype. **British Journal of Nutrition**. v. 101, p. 1812–1820, 2009.

NOYOTNY, J.A.; KURILICH, A.C.; BRITZ, S.J.; BAER, D.J.; CLEVIDENCE, B.A. Vitamin K absorption and kinetics in human subjects after consumption of ¹³C-labelled phylloquinone from kale. **British Journal of Nutrition**. v. 104, p. 858–862, 2010.

O'CONNOR, E.; MOLGAARD, C.; MICHAELSEN, K.F.; JAKOBSEN, J.; CASHMAN, K.D. Vitamin D–vitamin K interaction: effect of vitamin D supplementation on serum percentage undercarboxylated osteocalcin, a sensitive measure of vitamin K status, in Danish girls. **British Journal of Nutrition**. v. 104 p. 1091–1095, 2010.

O'CONNOR, E.; MOLGAARD, C.; MICHAELSEN, K.F.; JAKOBSEN, J.; LAMBERG-ALLARDT, C.J.E.; CASHMAN, K.D. Serum percentage undercarboxylated osteocalcin, a sensitive measure of vitamin K status, and its

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

relationship to bone health indices in Danish girls. **British Journal of Nutrition**. v. 97 p. 661–666, 2007.

OLSON, R.E. Osteoporosis and vitamin K intake. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.1031-1032, 2000.

OOSTENDE, C.V.; WIDHALM, J.R.; BASSET, G.J.C. Detection and quantification of vitamin K1 quinol in leaf tissues. **Phytochemistry**, v.69, p.2457-2462, 2008.

OTLES, S.; CAGINDI, O.; Determination of vitamin k1 content in olive oil, chard and human plasma by RP-HPLC method with UV-Vis detection. **Food Chemistry**, v.100, p.1220-1222, 2007.

PELLEGRINI, N.; CHIAVARO, E.; GARDANA, C.; MAZZEO, T.; CONTINO, D.; GALLO, M.; RISO, P.; FOGLIANO, V.; PORRINI, M. Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration, and antioxidant capacity of raw and frozen brassica vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4310-4312, 2010.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy Assessed by three different *in vitro* assays. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2812–2819, 2003.

PENTEADO, M.D.V.C. **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole, 2003. 612p.

PÉREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C.; GARCÍA, M.D.; MATÍN, J. High-performance liquid chromatography-photochemical reduction in aerobic conditions for determination of K vitamins using fluorescence detection. **Journal of Chromatography, A**, v.1141, p.67-72, 2007.

PÉREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C.; TOMÁS V.; MATÍN, J. Flow-injection fluorimetric determination of vitamin K1 based on a photochemical reaction. **Talanta**, v.50, p.49-56, 1999.

PETERSON, J.W.; MUZZEY, K.L.; HAYTOWITZ, D.; EXLER, J.; LEMAR, L.; BOOTH, S.L. Phylloquinone (vitamin K1) and dihydrophyloquinone content of fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.79, n.7, p.641-646, 2002.

PIIRONEN, V.; KOIVU, T. Quality of vitamin K analysis and food composition data in Finland. **Food Chemistry**, v.68, p.221-226, 2000.

PINHEIRO, M.M.; SCHUCH, N.J.; GENARO, P.S.; CICONELLI, R.M.; FERRAZ, M.B.; MARTINI, L.A. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

women--the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutrition Journal**, v.8, p.6, 2009.

PROHORT - PROGRAMA BRASILEIRO DE MODERNIZAÇÃO DO MERCADO HORTIGRANJEIRO. Disponível em: <http://www.ceasa.gov.br/index.php?pag=10>. Acesso em: 10 fev. 2013.

RETO, M.; FIGUEIRA, M.E.; FILIPE, H.M.; ALMEIDA, C.M.M. Analysis of vitamin K in green tea leafs and infusions by SPME-GC-FID. **Food Chemistry**, v.100, p.405-411, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIEDER, A.; DORES, E.F.G.C.; HIGA, N.; MORAES, M.P.L. Alterações no teor de matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do pantanal diante da poluição por pesticidas. **Pesticidas**, v.10, p.87-112, 2000.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. Washinton: HarvestPlus, 2004. 58p. (HarvestPlus Technical Monography Series 2). Disponível em: <http://www.ifpri.org/sites/default/files/publications/hptech02.pdf>. Acesso em: 12 Abr. 2011.

SHEA, M.K.; DALLAL, G.E.; DAWSON-HUGHES, B.; ORDOVAS, J.M.; O'DONNELL, C.J.; GUNDBERG, C.M.; PETERSON, J.W.; BOOTH, S.L. Vitamin K, circulating cytokines, and bone mineral density in older men and women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.88, p.356-363, 2008.

SHEARER, M.J.; BOTON-SMITH, C. The UK food data-base for vitamin K and why we need it. **Food Chemistry**, v.68, p.213-218, 2000.

SHEARER, M.J.; NEWMAN, P. Metabolism and cell biology of vitamin K. **Thrombosis and Haemostasis**, v.100, n.4, p.530-547, 2008.

SOUZA, W.N. **Ingestão de vitamina K por indivíduos de diferentes faixas etárias**. São Paulo, 2011. 101p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêutica - Universidade de São Paulo.

SOUZA, W.N.; RODRIGUES, M.L.; PENTEADO, M.D.V.C. Ingestão habitual de vitamina K em adultos e idosos. **Revista de Nutrição**, v. 25, n.4, p.507-515, 2012.

STATISTICA Softwares. Versão SPSS 15.0 para Excel., 2003.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

SUMMEREN, V.M.J.H; BRAAM, L.A.J.L.M; LILIEN, M.R.; SCHURGER, L.J.; KUIS, W.; VERMEER, C. The effect of menaquinone-7 (vitamin K2) supplementation on osteocalcin carboxylation in healthy prepubertal children. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 1171–1178, 2009.

SUMMEREN, V.M.J.H.; COEVERDEN, V. S.C.C.M.; SCHURGERS, L.J.; BRAAM, L.A.J.L.M; NOIRT, F.; UITERWAAL, C.S.P.M.; KUIS, W.; VERMEER, C. Vitamin K status is associated with childhood bone mineral content. **British Journal of Nutrition**, v. 100, p. 852–858, 2008.

TACO – Tabela de composição de alimentos. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. 4.ed. Campinas: NEPA, 2011. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/downloads/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em: 01. fev. 2011.

TBCA – Tabela brasileira de composição de alimentos. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e BRASILFOODS. 5ª edição revisada e ampliada. São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela/>. Acesso em: 01.fev.2011.

THEUWISSEN, E.; CRANENBURG, E.C.; KNAPEN, M.H.; MAGDELEYNS, E.J.; TEUNISSEN, K.J. SCHURGERS, L.J.; SMIT, E.; VERMEER, C. Low-dose menaquinone-7 supplementation improved extra-hepatic vitamin K status, but had no effect on thrombin generation in healthy subjects.**British Journal of Nutrition**. v. 108, p.1652–1657, 2012.

TSUGAWA, N.; SHIRAK, M.; KAMAO, Y.S.M.; OZAKI, R.; OKANO, K.T.T. Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v.26, p.79-85, 2008.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y.S. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. **Food Chemistry**, v.93, p.713-718, 2005.

UDAGAWA, M.; NAKAZOE, J.-I.; MURAI, T. Content of phylloquinone and menaquinone derivatives in the organs of pelagic and demersal fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, v.113, n.3, p.331-334, 1996.

UNITED STATES. Department of Agriculture. National Agricultural Library. Food and Nutrition Information Center. **Food Composition**. Disponível em: <http://fnic.nal.usda.gov/food-composition>. Acesso em: 20 jan. 2012.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

VARDAVAS, C.I.; MAJCHRZAK, D.; WAGNER, K.-H.; EMALDFA, I.; KAFATOS, A. The antioxidant and phyloquinone content of wildy grown greens in Crete. **Food Chemistry**, v.99, p.813-821, 2006.

VIEBIG, R. F.; PASTOR-VALERO, M.; SCAZUFCA, M.; MENEZES, P. R. Consumo de frutas e hortaliças por idosos de baixa renda na cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 806-813, 2009

ZONTA, F.; STANCHER, B. Quantitative analysis of phyloquinone (vitamin K1) in soy bean oils by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.329, p.257-263, 1985.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.