

## VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS EM ALIMENTOS – UMA ABORDAGEM ANALÍTICA

José A. da Paixão\* e Tânia L. M. Stamford

Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco,  
Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901 Recife - PE

Recebido em 30/9/02; aceito em 5/8/03

FAT-SOLUBLE VITAMINS IN FOOD – AN ANALYTICAL APPROACH. This study concerns certain problems inherent to the determination of fat-soluble vitamins in food, from extraction methods to identification and quantification. The discussion involves the main official and unofficial extraction methods coupled with spectrophotometric and HPLC techniques in which vitamins samples are obtained through liquid-liquid-solid and liquid-liquid-solid-solid extraction, indispensable to the analytical separation of different chemical compounds with vitamin functions. A saponification stage, possibly coupled with supercritical fluid extraction appears to be mandatory in the determination of vitamins A and E in their alcoholic forms. Alternative identification and quantification procedures are outlined: biological and chemical assays, analytical separations by HPLC (normal and reversed-phase), UV detection (all fat-soluble vitamins) and fluorescence detection (retinoids and tocopherols). Automation from sample preparation to quantification stages increases the data acquisition rate.

Keywords: fat-soluble vitamins; extraction; quantification.

## INTRODUÇÃO

Vitaminas são substâncias orgânicas presentes em muitos alimentos em pequenas quantidades e indispensáveis ao funcionamento do organismo, na forma de co-fatores. Sua ausência sistemática na dieta resulta, quase sempre, em crescimento e desenvolvimento deficientes e outras perturbações orgânicas, configurando-se um quadro sintomatológico característico de carência. Independentemente dos fatores do ambiente, a maioria dos organismos animais é incapaz de sintetizá-las por via anabólica, razão pela qual precisam ser incluídas nas dietas; em geral, são necessárias em microquantidades e em função da idade, sexo, estado fisiológico e atividade física do indivíduo. Os requerimentos nutricionais desses micronutrientes aumentam durante os períodos de crescimento, gestação e lactação, nas condições de trabalho intenso e ocorrência de determinadas doenças, notadamente as infecciosas<sup>1,2</sup>.

Tradicionalmente, as vitaminas são classificadas em lipossolúveis e hidrossolúveis, de acordo com propriedades fisiológicas e físico-químicas comuns<sup>1-3</sup>. Os textos modernos de bioquímica<sup>3</sup> vêm propondo uma subclassificação para as hidrossolúveis, baseada em suas funções bioquímicas (captadoras e libertadoras de energia, papel na hematopoese, etc).

As vitaminas lipossolúveis, notadamente A, D e E, têm merecido destaque quando do desenvolvimento de produtos enriquecidos e vitaminados, com o intuito de assegurar ao público infantil o suprimento destes micronutrientes essenciais ao crescimento, desenvolvimento e outras funções biológicas<sup>1-5</sup>. Crianças e jovens são extremamente sensíveis às variações dos teores de vitaminas A e D em função das baixas reservas ao nascer, rápido crescimento, diferenciação celular e alto “turnover” destes nutrientes em relação aos dos adultos<sup>1-3</sup>.

O interesse crescente em relação à demanda orgânica de nutrientes, o estabelecimento de padrões nutricionais de ingestão, a preocupação mundial quanto à confiabilidade dos valores destes nutrientes

declarados nos rótulos dos alimentos enriquecidos e vitaminados e a possível toxicidade de alguns deles tem ressaltado a necessidade de se determinar a composição química dos micronutrientes em alimentos. Impõe-se, assim, o desenvolvimento de metodologias seletivas e apropriadas ao reconhecimento de formas com distintas bioatividade e biodisponibilidade<sup>1,6,7</sup>.

A estreita relação entre dieta e saúde faz com que aumente a preocupação dos consumidores em ingerir alimentos nutritivos ou de alta qualidade como, por exemplo, os fortificados ou enriquecidos e os vitaminados<sup>5,6</sup>. Lamentavelmente, a adição desses micronutrientes a produtos industrializados também tem sido utilizada como mera estratégia de “marketing”, onde os interesses comerciais prevalecem, em detrimento das reais necessidades do indivíduo.

A padronização de métodos para determinação das vitaminas lipossolúveis em alimentos é dificultada devido à diversidade de procedimentos descritos na literatura<sup>8-9</sup> e à morosidade da aplicação da técnica oficial<sup>10</sup> da “Association Official of Analytical Chemistry” (AOAC). Isto faz com que os organismos oficiais de fiscalização e a própria indústria fiquem impedidos de exercerem um melhor controle de qualidade nos processos tecnológicos e nos produtos desenvolvidos<sup>4,5,7,9</sup>.

A análise das vitaminas está sujeita a uma série de erros, pouco frequentes em outras substâncias, inclusive pela facilidade de isomerização desses nutrientes que conduz à perda total ou parcial do valor vitamínico em condições extremas de pH, temperaturas elevadas e alto poder de oxidação, fatores que devem ser considerados pelos métodos analíticos.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) pode ser executada à temperatura ambiente e sem derivação das substâncias, utilizando a detecção por UV e/ou propriedades de fluorescência dos compostos que desempenham a função de vitaminas.

Os métodos simultâneos de extração apresentam vantagens por tratar igualmente o material a ser estudado, mas nem sempre atendem a todos os tipos de amostras (fluidas e sólidas) e sua escolha deve ser condicionada às propriedades individuais das substâncias e à composição química do material<sup>9,11</sup>. Estes fatores comprometem a

\*e-mail: paixao@nutricao.ufpe.br

validação e a adequação dos métodos<sup>12-14</sup> em função do teor de água, lipídeos totais e presença de isômeros.

Entre os métodos químicos de identificação e quantificação, os de maior eficiência envolvem a separação analítica por CLAE através da fase normal ou reversa, às quais acoplam-se detectores de UV e/ou de fluorescência, cuja identificação e quantificação<sup>9-14</sup> são asseguradas por fator de capacidade (k) e resolução (Rs). Estes ensaios são realizados na ausência de oxigênio e de luz difusa, fatores que podem comprometer inclusive as etapas pré-cromatográficas, enfoque principal desta revisão em que são discutidas as dificuldades inerentes à técnica de CLAE<sup>15-18</sup>.

As atuais metodologias recomendadas para avaliação dos compostos com função de vitaminas encontrados nos alimentos ainda são conflitantes<sup>8</sup>. Os clássicos ensaios biológicos com cobaias e microrganismos, em função de suas exigências nutricionais seletivas por determinadas vitaminas, são considerados longos, onerosos e laboriosos. Além disso, não permitem a quantificação simultânea e a automação, apesar da sensibilidade e especificidade dos mesmos para a determinação das vitaminas hidró e lipossolúveis. Neste caso, os ensaios biológicos são considerados complementares aos químicos que, devido ao pequeno número de testes confirmativos<sup>8-15,19</sup>, são realizados mais rapidamente e requerem menor repetibilidade e reprodutibilidade.

As dificuldades reportadas acima explicam, em parte, a inexistência de dados analíticos confiáveis sobre o teor de vitaminas em alimentos. Poucos laboratórios nacionais estão capacitados a efetuar esta análise, dificultando o cumprimento dos dispositivos legais. A legislação vigente nos países da América Central e do Sul referente a produtos enriquecidos ou fortificados e vitaminados espelha-se na de países como Canadá, Estados Unidos da América e dos que fazem parte do Mercado Comum Europeu, onde problemas metodológicos são facilmente contornados por estudos colaborativos. Desta forma, uma maneira sistemática e segura de se efetuar o controle de qualidade é obter-se a certificação dos teores das vitaminas nos rótulos de produtos comercializados<sup>19</sup>, mediante uso de materiais de referência. Entretanto, somente em 1997, o "National Institute of Standards and Technologies" (NIST) reconheceu uma fórmula infantil SRM1846 (material certificado mais citado nos trabalhos consultados). Outras fórmulas encontradas na literatura nem sempre possuem a licença do NIST.

Diante do exposto, a população corre o risco de consumir alimentos enriquecidos e vitaminados de qualidade pouco controlada, inclusive podendo ingerir vitaminas em teores que não se adequam à Dose Diária Recomendada (DDR) ou produtos de degradação das vitaminas, de função pouco conhecida.

Neste trabalho são discutidos os problemas inerentes às técnicas de extração e determinação das vitaminas lipossolúveis através de métodos oficiais e/ou não-oficiais, objetivando orientar pesquisadores e laboratórios quando da triagem de procedimentos envolvidos no preparo de amostras, sendo esta a principal dificuldade na difusão da técnica por CLAE quando se trata de amostras ou matrizes complexas como alimentos. Assim, a abordagem foi estrategicamente orientada para os métodos de extração, as técnicas de identificação e de quantificação e a automação em análise de vitaminas.

## MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

### Extração com solventes orgânicos

Um método analítico pode ser avaliado, em termos de repetibilidade e reprodutibilidade, através de dados estatísticos e por recuperação de padrões, que indica a exatidão do método por CLAE. Estes parâmetros integram elementos básicos de validação da

metodologia<sup>12-14</sup>. Outra forma de testar a exatidão do método é compará-lo através do uso de distintas técnicas de extração em produtos com certa similaridade<sup>14</sup>.

A extração simultânea das vitaminas lipossolúveis contidas em matrizes alimentícias pode ser feita de diferentes maneiras, diretamente com solvente (líquido-líquido), como misturas de dioxano:isooctano (2:8 v/v), para rações animais<sup>20</sup>, ou isopropanol:ciclohexano (3:97 v/v), para tabletes multivitaminicos<sup>21</sup>. Para a extração da vitamina A<sup>22</sup> do leite em pó e de fórmulas infantis, recomendam-se o dimetilsulfóxido:dimetilformamida:clorofórmio (2:2:1 v/v) e água:isopropanol<sup>23</sup> ou metanol:isopropanol<sup>24</sup>, respectivamente. Das misturas mais polares, a de metanol:acetato de etila é recomendada para fórmulas infantis e leite em pó<sup>25</sup>, que se torna eficiente quando associada à coluna de limpeza (líquido-líquido-sólido). Estas colunas também são utilizadas no acoplamento a solventes apolares, como benzeno<sup>26</sup>, nas determinações de vitamina D em leite humano.

Dentre os solventes apolares, recomenda-se uma mistura de éter etílico:hexano (92:8 v/v) na determinação das vitaminas A e D em leites fortificados, através de estudos comparativos do método de "Carr-Price" espectrofotométrico com a técnica de CLAE-fase normal<sup>27,28</sup>. Para a análise simultânea das vitaminas A e D em peixes<sup>29</sup> deve-se utilizar a mistura éter etílico:éter de petróleo na proporção de 1:1 v/v.

A proposta metodológica da Comunidade Européia para a determinação dos teores de vitamina A<sup>30</sup> em leites e fórmulas infantis consiste no aquecimento do alimento a 40 °C, com agente tenso-ativo, como etanol ou outro álcool, para precipitação das proteínas do leite, procedendo-se a extração líquido-líquido através de uma mistura de éter de petróleo:éter etílico (1:1 v/v) ou hexano, isoladamente. Neste caso, recomenda-se o uso de um antioxidante (butilhidroxitolueno) durante a extração que libera formas esterificadas e não-esterificadas das vitaminas A e E em grau variável, principalmente em amostras desengorduradas e fluidos biológicos<sup>9,15,30</sup>. A vitamina K também pode ser obtida por este método, seguido de purificação em colunas de limpeza<sup>9,15</sup>.

As vitaminas D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> podem ser extraídas com diclorometano, contendo fosfato tribásico<sup>31</sup>. Comparações entre os métodos de extração líquido-líquido através do isooctano com os de "Soxhlet" e "Goldfish" mostraram coeficiente de variação inferior a 1%, com recuperação da ordem de 97 a 101% e para a quantificação de 0,05 a 0,75% de D<sub>3</sub>, em grãos de cereais desintegrados, utilizando a extração líquido-sólido contínua<sup>32</sup>.

A extração simultânea das vitaminas A e D feita diretamente com solventes dioxano:isooctano (2:8 v/v) em rações animais<sup>20</sup> ou com metanol:acetato de etila (1:1 v/v) em leites fortificados e fórmulas infantis<sup>25</sup> apresentou índices satisfatórios de extratibilidade e de recuperação quando associada a duas colunas preparativas, constituindo-se um sistema de extração e separação líquido-sólido-sólido<sup>33</sup>.

À praticidade da técnica de extração líquido-líquido contrapõem-se desvantagens, como toxicidade e custo elevado de alguns reagentes, fatores que limitam o uso de algumas metodologias nos países em desenvolvimento. Poucos trabalhos recomendam um único solvente para a extração líquido-líquido-sólida em alimentos, embora o solvente apolar isolado seja indicado para fórmulas farmacêuticas e alimentos<sup>34-36</sup>, e polar combinado a um apolar<sup>37</sup>, para estudos simultâneos de A e D em fórmulas farmacêuticas. Blanco *et al.*<sup>38</sup> demonstraram a adequação do hexano grau analítico para determinações de trans-retinol, ergocalciferol,  $\alpha$ -acetato-tocoferol e fitoquinona (K<sub>1</sub>) em fórmulas parenterais pediátricas. Esta quantificação foi obtida em colunas intermediárias de octadecilsilano (C18) SPHERISORB ODS 150 x 2,1 mm, diâmetro interno (d.i.), diâmetro de partículas ( $\varnothing$ ) 5  $\mu$ m, com coeficiente de variação abaixo de 1% e recuperação de 90 a 110 %.

Esta combinação, utilizando sistema de extração e separação líquido-líquido-sólido, não se mostrou tão satisfatória ao se extrapolar os resultados obtidos com fórmulas farmacêuticas para matrizes lácteas, avaliadas, neste caso, em coluna capilar *ODS HIPERSIL-C18* 150 x 0,3 mm, Ø 3 µm, que necessitou de uma fase de enriquecimento no topo da coluna para a determinação de formas alcoólicas de retinol e de tocoferol<sup>39</sup>. Resultados similares, em termos de limite de detecção, foram alcançados no leite e na manteiga em coluna analítica *ODS EXTRASIL* 150 x 2,1mm, Ø 3 µm, para a determinação de vitamina D e forma alcoólica de vitamina E, requerendo inclusive etapas de limpeza associadas à saponificação.

### Extração associada à hidrólise enzimática

A desesterificação específica dos triglicérides permite minimizar o efeito dos interferentes em amostras biológicas. O uso de algumas lipases específicas<sup>1,9,33</sup> é uma alternativa atraente para a extração das formas esterificadas das vitaminas A e E, embora dificilmente se estabeleça a exaustão na hidrólise causada, principalmente, pelas diferenças de fonte enzimática e sua bioatividade. Barnett *et al.*<sup>34</sup>, utilizando lipase de *Candida cylindraceae* incubada por 60 min a 37 °C, em tampão fosfato, pH 7,8, obtiveram bons resultados para a quantificação simultânea de formas esterificadas e não-esterificadas das vitaminas A e E na presença de D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> por extração líquido-líquido em n-pentano. Adaptações ao trabalho original, quanto a fases estacionárias e móveis, permitiram quantificar melhor o trans-K<sub>1</sub> em fórmulas infantis, nas quais se observou inclusive a degradação da vitamina K em colunas de alumina<sup>35</sup>. Isômeros cis e trans-K<sub>1</sub> foram obtidos satisfatoriamente em fórmulas infantis<sup>35-37</sup> por coluna analítica de sílica, acoplada a colunas de limpeza também de sílica, utilizando a extração líquido-líquido em duas etapas (NH<sub>4</sub>OH-MeOH:diclorometano e isoctano).

Recentemente, estudos comparativos<sup>41-44</sup> revelaram que as melhores fontes enzimáticas acopladas ou não à extração supercrítica foram as de *Candida antarctica* tipo B (Novozyme 435) > *Rhizomucor miehei* (Lypozyme IM) > *Pseudomonas cepacia*, que mostraram atividade específica somente para palmitato de retinila quando avaliadas por sistema imobilizado. Procedimentos adicionais, como colunas de limpeza, extração líquido-sólido e saponificação, foram recomendados, notadamente nas determinações de vitamina D e de α-tocoferol em leites, fórmulas infantis e carnes<sup>42,44</sup>.

### Extração supercrítica associada ou não à saponificação

Diante da dificuldade de extrair ou desesterificar a vitamina E por ausência de atividade em seis microrganismos isolados bem documentada nos estudos anteriores<sup>42,44</sup>, a extração simultânea das vitaminas lipossolúveis em alimentos por um único solvente parece uma incógnita. Neste caso, a extração supercrítica enquadra-se como técnica adicional, desenvolvida com etanol como co-solvente, em temperaturas de 60 a 80 °C, a 374 atm (CO<sub>2</sub> supercrítico), condições nas quais se obteve melhor recuperação (96 a 106%) do trans-retinol, D<sub>2</sub> e acetato de tocoferol<sup>42,44</sup>.

A saponificação pode ser utilizada como procedimento adicional na determinação das vitaminas A (trans-retinol) e de α-tocoferol, mesmo quando acoplado à extração supercrítica (CO<sub>2</sub>) a 80 °C, a 370 atm, utilizando o metanol (5%) como co-solvente. Nestas condições, obtiveram-se determinações com coeficiente de variação abaixo de 8% e recuperação de 99% a 96% no leite em pó<sup>41,42</sup>. A associação de saponificação à extração supercrítica justifica-se pela inexistência de microrganismos capazes de converterem formas esterificadas de vitamina E<sup>42</sup> em forma alcoólica, como acontece no

homem e outros animais. Outra vantagem da extração supercrítica é a redução no tempo de análise (em média, 90 min). Portanto, a etapa de saponificação faz-se necessária para a extração adequada de vitamina E nos diferentes alimentos<sup>45-48</sup>, notadamente na presença das demais vitaminas.

A saponificação é um procedimento adicional que vem se tornando comum na literatura (~ 80% dos trabalhos consultados) quando do isolamento das vitaminas lipossolúveis encontradas na fração insaponificável<sup>46</sup> dos alimentos. Envolve um rompimento das ligações ésteres na matriz lipoprotéica, com liberação dos ácidos graxos na forma de sais, glicerol, fosfolípidos e outras moléculas encontradas no alimento. Entre as frações insaponificáveis encontram-se os esteróides, carotenóides, colesterol<sup>46</sup> e vitaminas lipossolúveis liberadas em proporções variáveis, dependendo das condições de saponificação e extração. Em contrapartida, essas vitaminas podem ser destruídas por exposição contínua a algumas condições de saponificação<sup>4,9,38-48</sup>, ou ainda, pela presença de impurezas nos solventes utilizados na extração<sup>9,14,41-43</sup>. Através deste procedimento, as formas esterificadas das vitaminas A e E são convertidas exaustivamente em formas alcoólicas livres<sup>9,41-46</sup>.

A AOAC<sup>10</sup> recomenda o uso de solventes grau cromatográfico, exatamente com o intuito de reduzir os interferentes extra-matriz na análise das vitaminas. Para minimizar as perdas decorrentes de outros fatores, como a presença ou a ausência de O<sub>2</sub> no meio (ou de formas anômalas de O<sub>2</sub>), recomenda-se o fluxo de gases inertes, como argônio<sup>42,43</sup> ou nitrogênio líquido<sup>10,39-44</sup>, durante a saponificação.

Dados recentes de Salo-Väänänen *et al.*<sup>45</sup> estabeleceram, através de um estudo em condição de super-saturação de KOH-aquoso (KOH-50% a 100%), a concentração requerida de KOH por g de amostra de leite fluido e de peixe. A eficiência da saponificação<sup>46</sup> parece similar quando se compara a relação acima com a obtida por Paixão e Stamford<sup>47</sup>, que utilizaram a mesma estratégia experimental (super-saturação) considerando a solubilidade nos distintos meios: água<sup>45</sup> e metanol<sup>47</sup>. Desta forma, propuseram um sistema KOH-metanol, no qual também se definiu a melhor concentração de KOH, permitindo ajustar a extração de trans-retinol e de α-tocoferol com destruição mínima. Investigações complementares confirmaram a proposição apresentada quando se comparou a força da extração através de outros meios de saponificação, solventes de extração e plano amostral em matrizes lácteas sólidas e fluidas<sup>48</sup>.

Assim, justifica-se uma proposta única de extração e detecção das vitaminas lipossolúveis em leites e achocolatados, fluidos e sólidos<sup>47,48</sup>, quanto à proporção de g KOH:g de sólidos totais. Apesar das tentativas para se estabelecer uma relação quantitativa de KOH:amostra:sólidos totais, os dois sistemas de saponificação avaliados (aquoso<sup>45</sup> x metanol<sup>47</sup>) são por demais distintos e podem ter ocorrido apenas interferências da solubilidade do KOH nos dois meios. Resultados similares e corroborativos foram observados em relação à instabilidade do trans-retinol e do α-tocoferol diante de meios alcalinos com elevadas concentrações de KOH, enquanto a extratibilidade dos mesmos foi insuficiente em concentrações de KOH muito baixas<sup>45,47-48</sup>.

Vale ressaltar que nos produtos vitaminados e enriquecidos, fatores ligados à estabilização dos compostos químicos com função vitamínica necessitam igualmente ser rompidos para a liberação das vitaminas das cápsulas ou dos géis de polissacarídeos e gelatinas que os envolvem<sup>5,6,49</sup>, requerendo assim a etapa de saponificação<sup>45-48</sup>. Além da otimização das condições de saponificação, estudo recente aponta uma adequação de plano amostral para matrizes complexas, como leite cru e processado e achocolatados<sup>48</sup>.

As dificuldades observadas durante a extração das vitaminas lipossolúveis decorrem, em parte, da topologia das mesmas diante das células vegetais e animais, a qual está intrinsecamente ligada à

complexidade e à própria natureza dos componentes básicos das membranas<sup>46</sup>, mostrados na Figura 1. As principais forças que estabilizam os componentes da membrana e vitaminas são forças de van der Waals e eletrostática para os terminais polares e interação hidrofóbica para os terminais apolares das moléculas das vitaminas<sup>1-3,46</sup>. Assim, o isolamento e conseqüente separação das vitaminas dependem do seu grau de desestabilização diante dos agentes externos<sup>48-50</sup>, associado à própria técnica.

A saponificação pode ser empregada sob aquecimento, 50 a 60 °C, por 45 a 60 min; dependendo do teor de gordura, recomendam-se temperaturas mais elevadas, até 80 °C, por 30 a 60 min<sup>9,50,51</sup>, procedimento corroborado pela Comunidade Européia na determinação isolada da vitamina A (trans-retinol). Alternativamente, pode ser executada à temperatura ambiente por 12 h, seja para extração da vitamina A ou E, isoladamente<sup>52-54</sup>, e ainda, para as determinações das vitaminas D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>, em leite fluido, leite em pó fortificado e fórmulas infantis<sup>52-56</sup>.

Em ambos os casos, há preferência pelo KOH por produzir um sabão mole, o que determina a não-solidificação dos extratos obti-

dos à temperatura ambiente, facilitando a etapa subsequente de concentração, ao contrário do NaOH<sup>1,9,41-56</sup>. Delgado-Zamarreño *et al.*<sup>57</sup> propuseram, através de sistema automatizado de saponificação em NaOH, a extração e detecção das vitaminas A e E em formas alcoólicas no leite em pó. Entretanto, ressaltaram a presença de inúmeros interferentes nos cromatogramas, provavelmente devido ao uso do NaOH ou do ácido acético na neutralização dos extratos.

O KOH vem sendo preferido em relação a outros sistemas de saponificação, em proporções variáveis e em diferentes meios: metanol, ~40% m/v<sup>56</sup>, etanol, ~10 a 40% m/v<sup>53-55,57</sup>, etanol-água ~10 a 20% m/v<sup>54-60</sup> ou apenas água ~80% m/v<sup>27,45,50,61-63</sup>, sistema recomendado pela AOAC<sup>10</sup> nas determinações isoladas de trans-retinol e  $\alpha$ -tocoferol (KOH $\approx$ 67%) quando acoplados ao detector UV, ajustado a 325 nm e 292 nm, respectivamente.

Além da otimização do meio aquoso<sup>45</sup> e metanólico<sup>47,48</sup>, e da concentração de KOH<sup>45,47,48</sup>, outros fatores relacionados à saponificação foram avaliados. Por exemplo, o tempo requerido para este procedimento, que pode ser reduzido de 12 para 3 h no meio metanólico, desde que se aumente a concentração de pirogalol<sup>48</sup>.

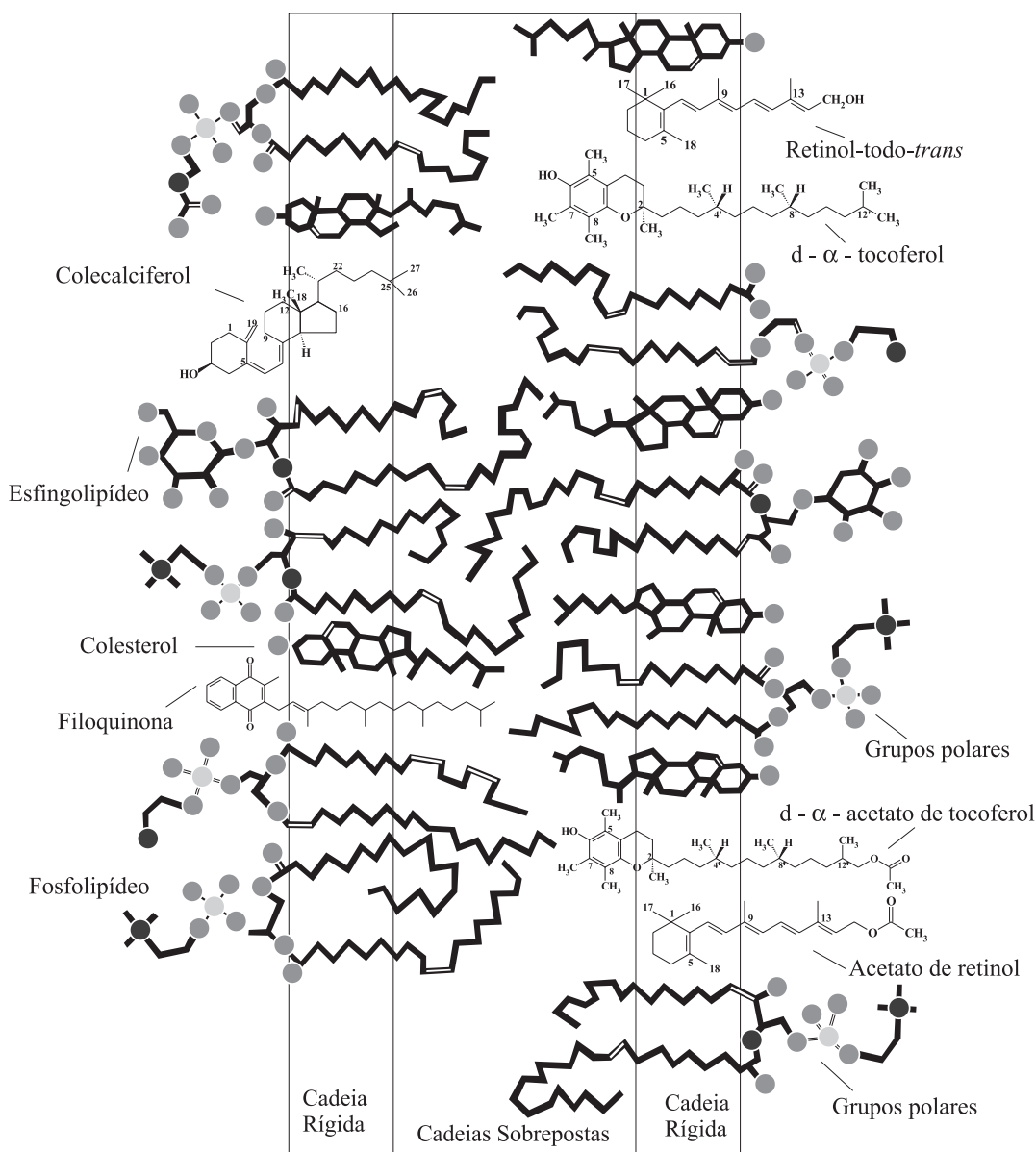


Figura 1. Proposição de interface das vitaminas lipossolúveis com componentes das membranas celulares, adaptado da ref. 46



## Estabilidade das vitaminas durante as fases de determinação

Os problemas usuais decorrentes destes procedimentos analíticos são a formação de isômeros e outros derivados em consequência do excessivo aquecimento, da exposição contínua e extrema a condições alcalinas e excesso de  $O_2$  no meio. Estes fatores afetam, concomitantemente, as taxas de extração desses analitos, como também a interconversão de formas isoméricas trans-retinol em 9-cis-retinol ou 11-cis-retinol<sup>62-65</sup>,  $D_2$  em pré- $D_2$ ,  $D_3$  em pré- $D_3$ <sup>33</sup> ou, ainda, formação de dímeros do  $\alpha$ -tocoferol em alguns alimentos<sup>9,65</sup>. Nas condições em que se associam saponificação e aquecimento, o metanol parece mais adequado em função do seu ponto de ebulição (68 °C), enquanto a saponificação com etanol (72 °C) é o procedimento recomendado para determinação da vitamina A isoladamente<sup>30</sup>.

Difícilmente, obtém-se sucesso na análise destas substâncias sem a ajuda de antioxidantes ou outros mecanismos de proteção. A AOAC<sup>10</sup> recomenda, para determinação isolada das vitaminas A e E, a saponificação com fluxo de  $N_2$ . Em razão disso, considerou-se que a extração líquido-líquido seria a forma mais econômica e adequada para as determinações analíticas por CLAE. Deve-se, entretanto, levar em conta os efeitos relacionados às diferenças de matriz, sólida ou fluida<sup>45,47,48</sup> e de baixo ou elevado teor de lipídeos totais<sup>45,47,48</sup>, evidenciados em alguns trabalhos, notadamente com condições analíticas similares<sup>64-69</sup>. Poucos trabalhos que recomendam apenas a extração líquido-líquido apresentam cromatogramas, o que dificulta melhor avaliação do assunto.

A resistência das vitaminas a condições alcalinas e ácidas tem sido pouco estudada, mas há indícios de que são mais sensíveis às condições ácidas do que às alcalinas, notadamente a D e a K<sup>1,2,9</sup>, embora outros fatores possam desempenhar seu papel.

O uso de antioxidantes nesses extratos está bem documentado na literatura e, aparentemente, somente a vitamina D não necessita do mesmo. Existem propostas analíticas que recomendam seu uso<sup>52-56</sup>; outras, não. Apesar disso, obtém-se recuperação satisfatória ( $\geq 70\%$ ) mesmo quando submetida à saponificação<sup>56</sup> ou à extração líquido-líquido<sup>37,38,43</sup>.

São sugeridos: o ácido ascórbico, o butilidroxitolueno (BHT), o butilidroxianisol (BHA), o galato de propila e o pirogalol, isoladamente ou associados. O pirogalol é o mais eficiente em condições alcalinas, proporcionando elevada recuperação (acima de 90%) das vitaminas A e D<sup>9</sup> quando comparado ao galato de propila e ao BHT (abaixo de 90%), além de boa solubilidade em sistemas polares e apolares. A maioria dos trabalhos<sup>25,38,51-56</sup> recomenda uma concentração que varia de 0,01 a 1%. Na ausência do pirogalol os valores de extratibilidade das vitaminas A e E, notadamente em amostras fluidas com elevado teor de gordura<sup>16</sup>, foram subestimados, enquanto que, em concentrações elevadas deste antioxidante observaram-se incrementos nos teores de vitamina E em amostras similares<sup>16-18,47,48</sup>. Desta forma, a extratibilidade da vitamina E foi sensivelmente melhorada<sup>16,67</sup>. A validade do, ou tempo de exposição ao, pirogalol pode comprometer a sobrevivência das vitaminas<sup>48</sup>, principalmente em amostras de elevado teor de gordura e água<sup>47,48</sup>. Nesses casos, a concentração de pirogalol pode variar de 0,1% a 1%, dependendo do período de saponificação<sup>47,48</sup>.

Entre os solventes usados para extração das vitaminas lipossolúveis (ou da fração insaponificável) estão o éter de petróleo e o hexano, isoladamente<sup>34-37</sup>, ou misturas de éter de petróleo (ou hexano) em éter etílico. Estas misturas parecem facilitar, inclusive, o arraste de vitamina D<sup>16-22</sup> e evitar a formação de emulsão, que pode aprisionar algumas formas vitamínicas nas interfaces. Quanto ao percentual de éter etílico em éter de petróleo, variações de 5 a 40% mostraram-se favoráveis, notadamente na extração de outros

tocoferóis ( $\beta, \gamma, \delta$ ). Entretanto, este novo procedimento analítico revelou-se satisfatório<sup>47,48</sup> para a extração simultânea da vitamina A (trans-retinol) e da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol).

Para romper a emulsão ou evitá-la, recomendam-se lavagens sucessivas com água:NaCl (2%), acetona ou álcool, isoladamente, ou misturas de  $H_2O$ :acetona salina (5% NaCl) utilizadas na maioria dos trabalhos<sup>4,9,51-58</sup>.

A purificação dos extratos pode ser obtida por diferentes meios: precipitação dos esteróides em metanol a -37 °C, por 5 a 10 min, solução de digitonina em metanol<sup>54</sup> (0,5% m/v) a -33 °C, por 12 h, para produtos com 3% de lipídeos totais<sup>54-55</sup> ou, ainda, uma solução de digitonina (1,5% m/v) em metanol para extratos de leite evaporado<sup>68</sup>. Outra maneira consiste em passar os extratos através de microcolunas polares, como a sílica gel, misturas de óxido de alumínio e de magnésio, dependendo da necessidade analítica e da afinidade dos compostos pela coluna escolhida, retendo seletivamente compostos polares ligados à fração insaponificável<sup>26,33,56,69</sup>.

O fracionamento de compostos lipídicos naturais (glicofosfolídeos, fosfolipídeos ácidos e neutros) por acoplamento de colunas (líquido-líquido-sólido-sólido) foi obtido recentemente em três colunas polares<sup>69</sup>. O uso de duas colunas analíticas em série<sup>25,56-58</sup> é bem documentado para a vitamina D e corroborado pelos métodos oficiais atuais<sup>10</sup> e não-oficiais<sup>45</sup> utilizando, alternativamente,  $D_2$  ou  $D_3$  como padrão interno nas respectivas determinações com resolução ideal ( $\geq 1,5$ ) para ambas as formas.

A re-dissolução das vitaminas requer solubilidade e estabilidade em um mesmo solvente<sup>4,9,33</sup>. Difícilmente estas substâncias apresentam a mesma solubilidade nos sistemas de fases móveis propostos, enquanto o etanol é o solvente no qual se tem determinado o coeficiente de extinção molar<sup>9</sup>. Este solvente garante boa estabilidade às principais formas químicas (exceto para a vitamina K) e se define um sistema unifásico<sup>41-42</sup>. O metanol arrasta co-precipitados até o injetor e dificulta a estabilidade do sinal<sup>41-44</sup>. Entretanto, Qian e Sheng<sup>27</sup> recomendaram o uso de butanol para re-dissolução das vitaminas.

## TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

### Métodos convencionais: biológico e químico

Até a década de 1950, a avaliação das vitaminas lipossolúveis contidas nos alimentos era feita de maneira empírica face à inexistência de técnicas confiáveis para identificação e quantificação, principalmente por falta de padrões. Desta forma, foram observados os efeitos antixeroftálmico (lesão inespecífica da córnea) e anti-raquítico do óleo de fígado de peixes e gorduras animais, indicativo inicial da relação entre doença e alimentos<sup>2,4,9</sup>. A partir destas observações, consolidaram-se os ensaios biológicos, em ratos, cobaias e aves, enquanto os testes microbiológicos surgiram na década de 60. Os ensaios biológicos e microbiológicos são fundamentados em estudo dose:resposta, tomando-se indicativos morfofisiológicos e bioquímicos avaliados contra um placebo, através de comparações de fontes naturais de vitaminas ou formas químicas diretamente<sup>8-11</sup>.

Até hoje, para algumas vitaminas hidrossolúveis os ensaios microbiológicos utilizam culturas cadastradas em bancos oficiais, constituindo-se métodos para avaliações de riboflavina (*Lactobacillus casei*), tiamina (*Lactobacillus viridiscens*) e ácido pantotênico (*Lactobacillus plantarum*). Estes ensaios são referendados pela AOAC<sup>10</sup> através de informações sobre o crescimento do microrganismo em depleção e normalidade, e através de uma relação quantitativa entre  $\mu g$  de vitamina por mg de proteína sintetizada<sup>4,9</sup>.

Os métodos químicos de identificação e quantificação através de derivação para avaliação das vitaminas A (660 nm) e D (500 nm)

envolvem reações de pouca especificidade para produção de cor (violeta e azul ao esverdeado, respectivamente) com o tricloreto de antimônio ( $\text{SbCl}_3$ ), tradicionalmente conhecido como reagente de “Carr-Price”. O trifluoroacético e o tricloroacético são igualmente recomendados para o mesmo fim<sup>8,9,70-72</sup>.

Estes agentes de derivação<sup>4,8,9</sup> também reagem com carotenóides, com produtos de degradação da vitamina A, esteróides (com e sem função vitamínica) e colesterol, constituindo-se interferentes intrínsecos à matriz em questão. Outros reagentes mais específicos disponíveis são o de “Emmerie-Engel”, cloreto férrico + 2-2'-bipiridil em solução etanólica, para a vitamina E e o de “Irreverre-Sullivan”, dietiltiociarbamato de sódio em solução etanólica, para a vitamina K.

Os métodos espectrofotométricos no espectro do visível requerem a separação da fração de interesse para que se minimizem problemas inerentes à estabilidade das reações envolvidas, no caso do reagente de “Carr Price”, estável no máximo por 1 min e das próprias vitaminas, o que torna a alternativa pouco viável por requerer etapa adicional de limpeza<sup>4,9</sup>. Isto quase sempre compromete o resultado da análise por expor as vitaminas a reações tempo-dependentes pouco esclarecidas pela literatura (efeitos do  $\text{O}_2$ , luz difusa, temperatura e condições ácidas e alcalinas). O mais recente reagente descrito na literatura para reações colorimétricas é o trifluoreto de boro (16 a 19%), recomendado para a derivação da vitamina A<sup>73</sup>, o qual apresentou vantagens em relação ao de “Carr-Price” em termos de estabilidade da reação.

Cada uma das etapas envolvidas requer especificidade e compatibilidade. Caso contrário, ocorrem variações comprometedoras no resultado quantitativo das análises. Desta forma, o reagente oficial<sup>10</sup>, “Carr Price”, para a derivação das vitaminas lipossolúveis não satisfaz, plenamente, às exigências de todos os protocolos espectrofotométricos<sup>4,9</sup>. Analisadas individualmente ou em conjunto, estas substâncias, quando derivadas, produzem cor instável (do amarelo-alaranjado ao salmão), com unidades de absorvância no  $\lambda$  máximo em torno de 500 nm (correspondendo a 3 ou 4 vezes a absorção da vitamina D no UV). Igualmente, a reação ocorre com a vitamina A, que produz cor de azul intenso a violeta, com  $\lambda$  máximo entre 600 e 660 nm<sup>8,9,70-76</sup>.

Outro fator associado à estabilidade da reação é a coexistência de vitamina A em relação à vitamina D (até 1000 vezes em termos de UI) enquanto, em termos de massa 300 vezes, principalmente nos alimentos enriquecidos<sup>5,74</sup>. Por outro lado, a relação entre as vitaminas E:D é de 2000-6000:1 m/m. Quando o extrato contém teores elevados de vitamina E pode se tornar marrom por causa da reação com  $\text{SbCl}_3$ , fazendo-se necessárias algumas correções e etapas adicionais na separação e determinação dessas vitaminas<sup>9,10,70-72</sup>.

Os fatores de correção existentes na literatura, propostos por Morton e Stubbs, são válidos somente para os produtos de degradação da vitamina A<sup>9,71</sup>. O reagente de “Emmerie-Engel”, para os tocoferóis com função vitamínica ou não, confere ao extrato uma cor vermelho-intenso, com  $\lambda$  máximo em 520 nm, enquanto o de “Irreverre-Sullivan” produz uma cor azul em 5 min, torna-se vermelho-laranja em 8 min, com  $\lambda$  máximo em 575 nm, para a vitamina K. Os principais interferentes associados à vitamina E são os próprios antioxidantes não-tocóis, como o BHA, BHT, galato de propila, vitamina A, carotenóides e outros esteróides; entre os associados às vitaminas D e K pode se incluir o colesterol<sup>8,9,46,71-72</sup>.

### Métodos cromatográficos

Os métodos físicos de separação, como a CLAE e a eletroforese capilar<sup>33,75-76</sup>, são, atualmente, os mais recomendados para a separação de formas químicas distintas e avaliações quantitativas das vita-

minas. Através dos parâmetros de separação ( $k$  e  $R_s$ ) podem ser estudados extratos vitamínicos em presença de outras substâncias com ou sem função vitamínica, como, por exemplo, produtos de degradação e isômeros<sup>27,53,63-66,77-78</sup> em alimentos e tecidos<sup>53,66,78</sup>.

As colunas analíticas para CLAE mais utilizadas para a determinação de vitaminas são de dois tipos: as de fase normal e as de fase reversa. As de fase normal são polares (sílica e outros) e produzem separação em fases móveis extremamente apolares<sup>33,41-44</sup>, enquanto as de fase reversa são revestidas em grau variável (de 6 a 18%) com polímeros apolares, octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18), que propiciam melhor resposta com fases móveis polares<sup>9,33</sup>.

A confirmação das identidades dos referidos compostos com função vitamínica pode ser conseguida por meio de reações pós-coluna ou diretamente na coluna (com os reagentes de derivação) ou, alternativamente, através da associação destas técnicas de separação analítica à espectrometria de infravermelho, de massas e à ressonância magnética nuclear<sup>33,76</sup>, que fornecem dados concludentes sobre a identificação dos picos, quando devidamente coletados.

O uso de colunas polares, como sílica ( $\equiv\text{Si-OH}$ ) e alumina, em sistema de fase normal, expostas à eluição com solventes apolares ou misturas de solventes de polaridade média em baixas proporções, aumenta os sítios ativos das superfícies nos sistemas de separação, partição ou adsorção<sup>33,78</sup>. A inserção de partículas esféricas e homogêneas de compostos com baixa polaridade, C8 e C18, aumenta a área superficial e modifica a polaridade da coluna, neste caso, eficazes para solventes de média polaridade. Em fases móveis contendo de 10 a 20% de  $\text{H}_2\text{O}$  constitui-se a fase reversa, enquanto outros solventes de menor polaridade, como o metanol, podem ser seletivos para a eluição, constituindo um sistema polar orgânico de separação<sup>33,78-80</sup>.

As colunas de fase reversa são as mais citadas na literatura para sistemas simultâneos de separação analítica, de octadecilsilano (FR-C18) de 250 x 3,2 mm,  $\varnothing$  5  $\mu\text{m}$ <sup>47,59,81</sup> em particular as de d.i. 4,6 mm<sup>25,47,60,61,82</sup>. Mais recentemente, colunas de 150 x 2,1 mm,  $\varnothing$  3  $\mu\text{m}$ , SPHERISORB ODS-2 foram utilizadas para análise de vitaminas lipossolúveis, usando o metanol como fase móvel, propiciando boas separações de  $\text{D}_2$  e  $\alpha$ -tocoferol em dietas pediátricas parenterais<sup>38</sup> na presença de trans-retinol e de  $\text{K}_1$ . Metanol ou misturas de metanol:água em colunas SPHERISORB ODS-2 convencionais foram as fases móvel e estacionária utilizadas para determinação das vitaminas A e E em leites fluidos e em pó; foram detectados os efeitos da concentração de pirogalol na extratibilidade destas vitaminas em matrizes lácteas com teor variável de lipídeos e de água<sup>17,18,47,48</sup> e definidas condições de saponificação<sup>47</sup> e plano amostral<sup>47,48,67</sup> para leites e achocolatados fluidos e sólidos<sup>47,48</sup>.

Wielinski e Olszanowski<sup>75</sup> demonstraram, através de parâmetros cromatográficos, boa  $R_s$  ( $\geq 1,5$ ) e ideal  $k$  (1-10) para colunas de octilsilano (FR-C8), utilizando fase móvel  $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$  (95:5 v/v). Ao contrário, diante da mesma fase estacionária, a fase móvel  $\text{MeOH:H}_2\text{O}$  revelou-se inadequada para as vitaminas lipossolúveis, enfatizando o efeito de interações hidrofóbicas significativas sobre a retenção dos compostos estudados<sup>81,82</sup>. Reconhecidamente, a fase móvel  $\text{MeOH:H}_2\text{O}$  é a mais seletiva para a coluna C18 (mais apolar). Desta forma, pode-se eluir quase todas as vitaminas lipossolúveis a partir de uma fase móvel 100% metanol em colunas intermediárias<sup>38</sup> ( $\varnothing$  inferior a 5  $\mu\text{m}$  e d.i. inferior a 3,2 mm) ou convencionais ( $\varnothing$  de 5 a 10  $\mu\text{m}$  e d.i. de 4,6 mm) quando se deseja quantificar formas esterificadas e alcoólicas de A e de E, sem a presença de vitamina D<sup>47,74,82</sup>. Nesta fase móvel em colunas convencionais obteve-se  $R_s \geq 1,10$  para  $\text{D}_2$  e  $\text{D}_3$ <sup>47</sup>.

As colunas de fase normal adequam-se muito bem à análise de ésteres de retinila<sup>58</sup> ou de retinóides e tocoferóis<sup>33</sup>. As colunas de 150 x 3,8 mm parecem eficientes na separação de carotenóides, retinóides e  $\text{D}_2$  e  $\text{D}_3$  em alimentos<sup>83</sup> e análise de fluidos biológicos para a sepa-

ração de carotenóides, retinóides, tocoferóis, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub><sup>84,85</sup>. São menos usadas do que as de 250 x 4,8 mm, provavelmente devido à sua menor disponibilidade comercial.

Os sistemas binários e ternários oferecem grandes possibilidades de uso, sendo mais atrativos em sistema isocrático de eluição. Deste modo, as separações por adsorção conferem melhor equilíbrio da fase móvel com os analitos<sup>15,33,78-80</sup>. Em função do caráter hidrofóbico desses analitos<sup>86</sup>, são poucas as possibilidades de análise por sistema isocrático. Por outro lado, são escassos os dados sobre o uso de um único solvente para eluição de todas as vitaminas lipossolúveis<sup>17,38,82</sup>. Recentemente, sistemas de gradiente em fase reversa C18 em colunas intermediária<sup>40</sup> e capilar<sup>39</sup> foram consideradas ideais para a separação de isômeros e precursores das vitaminas D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> em presença de outras vitaminas, utilizando programa de gradiente A (MeOH:H<sub>2</sub>O) e B (MeOH:THF 7:3).

A facilidade de rearranjos de formas dihidroxiladas de vitamina D inviabiliza o uso de cromatografia gás-líquido, dando-se preferência à CLAE e outras técnicas, como imunoelctroforese<sup>87-89</sup>. Através de radioimunoensaios<sup>26,27</sup> foi possível a detecção de ng a pg de proteínas ligantes das formas mono e dihidroxiladas<sup>87,88</sup>. Na separação de D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> e respectivos isômeros, bem como de outras formas hidroxiladas, as colunas de sílica são mais eficientes que as de alumina, podendo ser satisfatoriamente substituídas por fase ligada nitropolar<sup>81</sup>. Recentemente, resultados de estudos comparativos de limpeza através de cartuchos de sílica e de C18 permitiram a Ortiz-Boyer *et al.*<sup>66</sup> determinar formas monoidroxiladas através do detector de UV ajustado a 265 nm, com recuperação satisfatória (≥ 90%). Pequenas mudanças na composição da fase móvel (metanol-tampão fosfato) conduziram a resultados satisfatórios na separação e quantificação de vitamina D<sub>3</sub> em três formas químicas, 24,25; 1,25 e 25-OH-D<sub>3</sub>, em plasma humano.

### Sistema de detecção

A partir de 1970, inúmeros trabalhos que utilizam a CLAE vêm oferecendo alternativas viáveis para identificação e quantificação simultânea das vitaminas. Diferentes procedimentos de calibração são utilizados, notadamente os acoplados a detectores mais seletivos, sensíveis e confiáveis, constituindo fontes de dados sobre a presença de isômeros ou substâncias em co-eluição na separação analítica. Dentre eles, ressalta-se o de arranjo de diodos na faixa do UV-Visível<sup>33,76</sup>, amplamente usado na detecção de isômeros em produtos processados<sup>27,63,64,81</sup>.

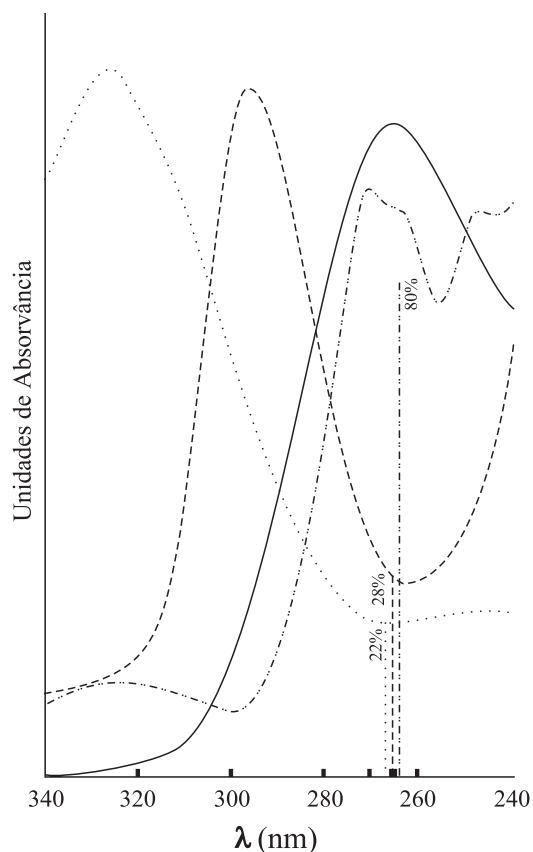
A pesquisa nesta área é relativamente recente, em razão dos riscos que envolvem a interpretação dos resultados apesar do uso de técnicas sofisticadas como a CLAE, recentemente acoplada à extração supercrítica<sup>41-44</sup> para determinação destes compostos em leites, utilizando-se inclusive colunas de limpeza e etapas de saponificação. Hoje, são várias as propostas analíticas para uso da CLAE, considerando as formas vitamínicas individualmente, através de programa de  $\lambda$  (nm) máx<sup>38,39,41-48,57</sup>, ou alternativamente analisadas por  $\lambda$  (nm) único<sup>47,48,64,75,90-93</sup>, a depender do alimento e das relações entre as vitaminas nos alimentos: leite fluido *in natura*, leite modificado e desnatado<sup>22,26,39,51,52,54-57</sup>, achocolatados e leite desnatado<sup>51</sup>, fórmulas infantis<sup>23-25,50,54</sup>, rações<sup>20,27,61</sup>, manteiga<sup>40</sup>, peixes<sup>33,45,89</sup>, ovos<sup>58,61,90</sup>, raízes<sup>83</sup> e alguns cereais fortificados<sup>32,90,91</sup>.

Estudos simultâneos de quantificação de vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis em fórmulas farmacêuticas foram realizados através da CLAE por ajuste de  $\lambda$  a 270 nm para as hidrossolúveis (tiamina, piridoxina, nicotinamida, riboflavina) e 290 nm para as lipossolúveis<sup>93</sup>, utilizando duas colunas analíticas. Trabalho recente quantificou todas as vitaminas em uma única coluna analítica e recomendou 362 nm para cianocobalamina e 285 nm para as demais

vitaminas em formulações farmacêuticas<sup>92</sup>. A extração sugerida foi a do tipo líquido-sólido, utilizando C18, como adsorvente para as vitaminas lipossolúveis, que foram eluídas em metanol:clorofórmio. Ambos os estudos detectaram de oito a nove vitaminas, embora somente um deles recomendasse o uso de uma única coluna C18 *Novapack* 150 x 3,9 mm, Ø 4 µm<sup>92</sup>. A fase móvel utilizada para quantificação das vitaminas hidro e lipossolúveis foi CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 0,05 molar, em um gradiente de 5:95 para 30:70 v/v CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>3</sub>CN. A recuperação foi de 78 a 116%.

A detecção através de ajuste único de  $\lambda$  é bastante reportada na literatura, notadamente em estudos simultâneos de vitaminas lipossolúveis em rações (detector ajustado a 290 nm)<sup>31</sup> e em leites (ajustado a 280 nm) para quantificação simultânea de A (trans-retinol), D<sub>3</sub> e E (α-tocoferol), em sistema automatizado de extração alcalina NaOH e análise por CLAE-FR<sup>57</sup>. Respostas quantitativas lineares podem ser obtidas a 265 nm para todas as vitaminas lipossolúveis<sup>48,74</sup>, baseadas inclusive na proposição da Figura 2, através das relações de unidades de absorvâncias<sup>60</sup>.

Retinóides e carotenóides mostram inúmeras possibilidades de detecção em alimentos, enquanto a vitamina D apresenta maior dificuldade analítica desde a extração até a detecção, requerendo uma associação de coluna de limpeza, ou diretamente, duas colunas analíticas<sup>25,26,60</sup>. Detectores seletivos e sensíveis, como o de fluorescência, são usualmente recomendados para determinação simultânea das vitaminas A e E nas formas alcoólica e esterificada<sup>23,24</sup>. Estes compostos exibem fluorescência natural, assim como alguns precursores, como os respectivos tocotrienos, que também são separados satisfatoriamente em colunas polares acopladas ao detector de



**Figura 2.** Resolução de um único  $\lambda$  (265 nm) para detecção das vitaminas lipossolúveis, adaptado da ref. 60. ..... Retinol-trans, acetato e palmitato de retinila; - - - - -  $\alpha$  - Tocoferol; — Ergocalciferol, colecalciferol; - · - · - Filoquinona

fluorescência<sup>94</sup> a partir de óleos naturais. As vitaminas D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> (olefinas abertas) não apresentam fluorescência natural.

As relações D:E e D:A, bem como seus respectivos isômeros, contribuem significativamente com os efeitos interativos da matriz lipoprotéica, que contém outros interferentes decorrentes desta relação elevada e são responsáveis pelos principais problemas quando se utiliza apenas o detector UV<sup>5,9,11,39,40,54,55</sup>.

Detecções em canais ajustados em diferentes  $\lambda$  no UV e outro no Visível (436 a 470 nm) permitem monitorar vitaminas lipossolúveis na presença de carotenóides, podendo-se inclusive avaliar a contribuição do  $\beta$ -caroteno como fonte de vitamina A em leites de espécies animais que apresentam deficiente conversão de  $\beta$ -caroteno em trans-retinol<sup>65,85</sup>.

Particularmente, em extratos ricos em interferentes e com maior probabilidade de oxidação, a absorção no UV torna-se insuficiente. Cuidados especiais devem ser tomados em relação às vitaminas D e K<sub>1</sub> que, por sua associação com o colesterol ou outros esteróides, exigem tratamentos exaustivos. A própria susceptibilidade dessas vitaminas a radiações UV não garante boa estabilidade<sup>4,9,33</sup> do sinal analítico. Blanco *et al.*<sup>38</sup> demonstraram que a vitamina K de dietas parenterais pediátricas, contendo inclusive outras vitaminas lipo e hidrossolúveis, é destruída após 24 h de exposição direta à luz difusa.

Detectores de UV-Visível e de fluorescência são os mais usados, acoplados à CLAE, pela simplicidade e praticidade<sup>9,15,33,76</sup>. Ambos possibilitam leituras que viabilizam a quantificação simultânea de duas ou mais formas vitamínicas e respectivos isômeros<sup>53,63,81</sup> ou precursores<sup>93</sup> quando conectados em série. A sensibilidade do detector de fluorescência mostrou-se até seis vezes superior quando as fases estacionárias normal e reversa foram comparadas para a determinação de tocoferóis e retinóides em alimentos<sup>9,16,47,48,53,63</sup> e fluidos biológicos<sup>9,15,52</sup>. Entretanto, a interpretação dos resultados deve ser cuidadosa, devido ao efeito dos álcoois e da água sobre a fluorescência<sup>33,76</sup>, principalmente nas colunas de fase reversa<sup>33</sup>.

### Utilização de padronização externa e interna no sistema de quantificação

A identificação por CLAE faz-se através de estudos comparativos de k obtido por meio de injeção de padrões e amostras em condições similares. A quantificação é feita por comparações de áreas relacionadas a concentrações conhecidas, obtendo-se curvas de calibração construídas no modo pontual ou em "pools"<sup>11-14,33,76</sup>.

A quantificação pode ser obtida por padronização externa, interna ou adição de padrões. Os dois últimos procedimentos são considerados mais confiáveis, conseguindo minimizar a interferência de um pico sobre o outro, o que pode afetar a determinação de algumas formas vitamínicas e as próprias taxas de recuperação. Por outro lado, na padronização externa as variações de potência das vitaminas acentuam-se com o tempo que, associadas a outros fatores de perda, comprometem a estabilidade do sinal<sup>9,33,76</sup>.

Os padrões internos mais utilizados são algumas formas estáveis de vitamina A, acetato de retinila<sup>32,46,57</sup>, palmitato de retinila<sup>22,24,52</sup>, formas esterificadas de vitamina E<sup>89,92</sup>, D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub> para quantificação de D<sub>3</sub> ou D<sub>2</sub>, respectivamente<sup>14,54-56</sup>, ou outros compostos não relacionados, como o 4-OH-bifenil<sup>21</sup>, o fenilacetato de colesterol<sup>34</sup> e a própria cianocobalamina<sup>81</sup>, recomendados em sistemas simultâneos de quantificação.

A padronização externa é a técnica mais utilizada na quantificação de vitaminas lipossolúveis em produtos enriquecidos<sup>18,23,25,26,51,58,61,74,92</sup>. A adição de padrão, apesar de ser a forma mais adequada de avaliação, é menos freqüentemente referida na literatura pelo fato de existirem poucas amostras reais sem contaminação (matriz zero ou isenta) para gerar a curva de calibração, exceto quando se desenvolve um

material para este fim<sup>33,76</sup>. Nesta modalidade de quantificação, o único componente permitido para a construção da curva é o próprio analito, o que torna seu uso limitado em alimentos que contêm um grande número de interferentes.

É bastante razoável que sejam consideradas conflitantes as metodologias atuais usadas na análise de vitaminas lipossolúveis pelas técnicas referidas nesta revisão<sup>8,9</sup>. Entretanto, avanços instrumentais e na padronização de materiais poliméricos empregados no recheio de colunas<sup>39,40</sup> vêm requerendo novos enfoques nos estudos por CLAE. Esta é, sem dúvida, a mais difundida técnica para estudos de vitaminas em alimentos e fluidos biológicos<sup>4,9,33,76</sup>, basicamente pela capacidade de resolução de isômeros e de produtos de degradação, notadamente as obtidas em colunas capilar e intermediária.

### AUTOMAÇÃO EM ANÁLISE DE VITAMINAS

A quantificação simultânea de vitaminas em alimentos através da CLAE apresenta dificuldades em face do grande número de etapas envolvidas na determinação, tornando o método demasiadamente laborioso, o que complica a automação. A rapidez da análise que se alcança com a automação permite uma periodicidade mínima de avaliação destes nutrientes em alimentos, que ainda não é definida pela literatura. Em decorrência deste avanço pode-se acelerar, inclusive, o processo de validação analítica de alguns procedimentos não-oficiais requeridos pelos organismos internacionais.

Programas automatizados que permitem a simulação de experimentos de separações analíticas podem otimizar as condições cromatográficas e constituem atualmente uma alternativa econômica diante do custo de colunas e fases móveis para melhoria de métodos por CLAE<sup>33,93-95</sup>. São escassos os trabalhos que envolvem automação acoplada às condições cromatográficas de preparo de amostras (etapas pré-cromatográficas) com subsequente detecção.

Estudos automatizados de separação e de quantificação vêm se tornando constantes nos laboratórios mundiais frente às necessidades e desafios desta técnica. Particularmente, os estudos de validação<sup>11-14,33,93,96</sup> poderão ser mais facilmente realizados, assim como a estequiometria<sup>33</sup> nas perdas de valor vitamínico. Desta maneira, pode-se monitorar a interconversão de formas químicas e elucidar, portanto, os fatores desencadeadores de isômeros em alguns processos tecnológicos.

Apesar de não ser exatamente a digestão alcalina com KOH a condição mais usual, Delgado-Zamarreño *et al.*<sup>57</sup> propuseram um sistema de automação de extração e análise por CLAE para leites fluidos e em pó que passaram por digestão alcalina com NaOH, inclusive envolvendo etapas de limpeza, obtendo-se de 80 a 105% de recuperação para as vitaminas A, D e E, simultaneamente, embora a precisão obtida foi em torno de 4,5%. Gámiz-Gracia *et al.*<sup>97</sup> propuseram um sistema automatizado de determinação das vitaminas A e E pelo método de extração da AOAC<sup>10</sup> que, comparativamente ao procedimento manual, foi similar em termos de precisão.

Através deste recurso pode-se garantir sistematicamente um melhor controle de qualidade dos produtos alimentícios contendo vitaminas lipossolúveis, uma vez que, diante de sua baixa estabilidade, são necessárias mensurações periódicas e sistemáticas atendendo aos princípios de boa prática de laboratório e de produção, não propiciadas por dificuldades operacionais e custo analítico.

Considera-se a automação uma melhoria significativa de praticidade diante de análises de rotina, mesmo nas determinações por métodos não-oficiais e pouco definidos na literatura. Naturalmente, variações intrínsecas ao procedimento analítico podem ser identificadas. Como não se dispõe de uma proposta única e adequada para as determinações de vitaminas lipossolúveis, notadamente para as D e K, deve-se considerar ainda que estes analitos são suficientemente



instáveis para propiciar o conhecimento do real valor vitamínico dos produtos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Poucos estudos recomendam a quantificação simultânea de vitaminas lipossolúveis em alimentos através da CLAE-convencional, devido à baixa eficiência do método na extração dessas substâncias na presença de precursores e isômeros. Entretanto, a CLAE-capilar é a principal técnica que viabiliza a obtenção destes importantes dados. Diante destes novos procedimentos (eletroforese e cromatografia capilar) que permitem o alcance deste objetivo, é possível obter informações sobre reprodutibilidade nos protocolos de extração envolvidos. Por último, deve-se definir melhor a extratibilidade, notadamente nos procedimentos que permitem boas taxas de recuperação (fortes candidatos aos estudos colaborativos).

As controvérsias sobre metodologia adequada para análise de vitaminas deverão ser superadas na próxima década, face aos modernos avanços tecnológicos na área de materiais (colunas capilares) e de instrumentação analítica, uso associado de detectores e automação que permitem melhor avaliação dos extratos.

Os métodos vigentes, extra-oficiais e oficiais, não foram desenvolvidos com a mesma base metodológica e, por isso, as dificuldades em termos de preparo de amostras e a complexidade de matrizes alimentícias comprometem parâmetros de separação, refletindo-se na repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação.

Através da CLAE-capilar, perdas e oxidação parcial das vitaminas durante a extração ou decorrentes do processamento tecnológico podem ser contornadas satisfatoriamente, quantificando desta forma os valores reais dos compostos com função máxima e parcial (dos isômeros) das vitaminas. A importância deste enfoque é que pode se estimar e prever com segurança determinados efeitos do processamento e de técnicas pré-estabelecidas sobre o armazenamento e comercialização de alimentos.

Estudos estequiométricos, relacionando massa de compostos com a função de vitaminas, são escassos na literatura. Em razão disso, faz-se necessária a realização de novos estudos nesta área para se conhecer melhor o real papel das vitaminas, notadamente as lipossolúveis, em matrizes alimentícias complexas como leite, carne, frutos, hortícolas e processados.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco, pela concessão de auxílios e bolsas.

## REFERÊNCIAS

- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Principles of Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., Worth Publishers: New York, 1995.
- Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W.; *Harper: Bioquímica*, 8<sup>a</sup> ed., Atheneu Ed. Ltda.: São Paulo, 1998.
- Champe, P. C.; Harvey, R. A.; *Bioquímica Ilustrada*, 2<sup>a</sup> ed., Artes Médicas Ed.: Porto Alegre, 1996.
- Machlin, L. J. Em *Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects*; Marcell Dekker: New York, 2<sup>nd</sup> ed., 1984.
- Paixão, J. A.; *Bol. Soc. Bras. Ciência Tecnol. Alimentos* **1998**, 32, 48.
- Borenstein, B.; Bendich, A.; Waysek, E. H.; *Food Technol.* **1988**, 42, 226.
- Parker, R. S.; *Food Nutr. Bullet.* **2000**, 21, 124.
- Subbulakshmi, G.; Chitra, L.; *J. Food Sci. Technol.* **1996**, 33, 267.
- Ball, G. F. M. Em *Fat-Soluble Vitamin Assays in Food Analysis. A Comprehensive Review*; Elsevier Science Publishers Ltd.; England, 2<sup>nd</sup> ed., 1988.
- Association of Official Analytical Chemists, Em *Official methods of analysis*, Deutsch, M. J., ed.; 19<sup>th</sup> ed., Washington: D.C., 1998, cap. 45, p. 1-79.
- Eitenmiller, R. R.; *J. Food Quality* **1990**, 13, 7.
- Jenke, D. R.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1996**, 19, 719.
- Jenke, D. R.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1996**, 19, 737.
- Jenke, D. R.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1996**, 19, 1873.
- Leenheer, A. P.; Nelis, H. J.; Lambert, W. E.; Bauwens, R. M.; *J. Chromatogr.* **1988**, 429, 3.
- Araújo, R. R.; Paixão, J. A.; *Resumos da 3<sup>a</sup> Jornada de Iniciação Científica da Facepe/CNPq*, Recife, Brasil, 1999.
- Paixão, J. A.; Godoy, H. T.; *Resumos do 3<sup>th</sup> International Congress on Chemistry of Cuban Society of Chemistry*, Havana, Cuba, 1999.
- Paixão, J. A.; Stamford, T. L. M.; *Resumos do 4<sup>th</sup> International Congress on Chemistry of Cuban Society of Chemistry*, Havana, Cuba, 2001.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization; *Codex Alimentarius Commission*, Joint, Advisory Lists of Mineral Salts and Vitamin, Compounds for use in foods for infants and children, 2<sup>nd</sup> ed., Rome, 1994.
- Cohen, H.; Lapointe, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 1210.
- Burns, D. T.; Mackay, C.; *J. Chromatogr.* **1980**, 200, 300.
- Woollard, C.; Woollard, G. A.; *J. Dairy Sci. Technol.* **1981**, 16, 99.
- Landen, Jr, W. O.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1982**, 65, 810.
- Murthi, T. N.; Jacob, G.; Devdharma, V. D.; *Indian J. Dairy Sci.* **1989**, 42, 330.
- Holick, M. F.; Shao, Q.; Liu, W. W.; Chen, T. C.; *New Engl. J. Med.* **1992**, 326, 1178.
- Takeuchi, A.; Okano, T.; Tsugawa, N.; Katayama, M.; Mimura, Y.; Kobayashi, T.; *J. Micron. Anal.* **1988**, 4, 193.
- Qian, H.; Sheng, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, 825, 127.
- Mills, R. S.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1985**, 68, 56.
- Pozo, R. G.; Saitua, E. S.; Uncilla, I.; Montoya, J. A.; *J. Food Sci.* **1990**, 55, 77.
- Brubacher, G.; Muller-Mulot, W.; Southgate, D. A. T. Em *Methods for the determination of vitamins in food*; Elsevier Applied Science Publishers: London, 1985.
- Landen Jr., W. O.; Eitenmiller, R. R.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1979**, 62, 283.
- Mauldin, R. E.; Johnston, J. J.; Riekens, C. A.; *J. AOAC Int.* **1999**, 82, 792.
- Snyder, L. R.; Kirkland, J. L.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC Method Development*, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley Interscience Publication and John Wiley & Sons Inc.: New York, 1997.
- Barnett, S. A.; Frick, L. W.; Baine, H. M.; *Anal. Chem.* **1980**, 5, 610.
- Bueno, M. P.; Villalobos, M. C.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1983**, 66, 1063.
- Hwang, S.-M.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1985**, 68, 684.
- Santoro, M. I. R. M.; Magalhães, J. F.; Hackmann, E. R. M.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1982**, 65, 619.
- Blanco, D.; Pajares, M.; Escotet, V. J.; Gutiérrez, M. D.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1994**, 17, 4513.
- Gomis, D. B.; Fernández, M. P.; Alvarez, M. D. G.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 891, 109.
- Gomis, D. B.; Fernández, M. P.; Alvarez, M. D. G.; *Analyst* **2000**, 125, 427.
- Turner, C.; King, J. W.; Mathiasson, L.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 553.
- Turner, C.; Pearson, M.; Mathiasson, L.; Adlercreutz, P.; King, J. W.; *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, 29, 111.
- Turner, C.; Mathiasson, L.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 870, 275.
- Berg, H.; Turner, C.; Dahlberg, L.; Mathiasson, L. J.; *Biochem. Biophys. Methods* **2000**, 43, 391.
- Salo-Väänänen, P. S.; Ollilainen, V.; Mattila, P.; Lehtikoinen, K.; Salmela-Mölsa, E.; Piironen, V.; *Food Chem.* **2000**, 71, 535.
- Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons: New York, 1995.
- Paixão, J. A.; Stamford, T. L. M.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2002**, 25, 217.
- Paixão, J. A.; Campos, J. M.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, 26, 641.
- Borenstein, B.; *C. R. C. Crit. Rev. Food Technol.* **1971**, 2, 171.
- Thompson, J. N.; Maxwell, W. B.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1977**, 60, 766.
- Henderson, S. K.; McLean, L. A.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1979**, 62, 1358.
- Indyk, H. E.; *Analyst* **1988**, 113, 1217.
- Indyk, H. E.; *New Z. J. Dairy Sci. Technol.* **1982**, 17, 257.
- Indyk, H. E.; Woollard, D. C.; *J. Micron. Anal.* **1985**, 1, 121.
- Indyk, H. E.; Woollard, D. C.; *New Z. J. Dairy Sci. Technol.* **1985**, 20, 19.
- Muniz, J. F.; Wehr, C. T.; Wehr, H. M.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1982**, 65, 791.
- Delgado-Zamarreño, M. M.; Sanchez-Perez, A.; Gomez-Perez, M. E.; Hernandez-Mendez, J.; *J. Chromatogr., A* **1995**, 694, 399.
- Reynolds, S. L.; Judd, H. J.; *Analyst* **1984**, 109, 489.

59. Otlés, S.; Hisil, Y.; *Die Nahrung* **1991**, 35, 391.
60. Zonta, F.; Stancher, B.; Bielawny, J.; *J. Chromatogr. A* **1982**, 246, 106.
61. Ollilainen, V.; Heinonen, M.; Linkola, E.; Varo, P.; Koivistoinen, P.; *J. Dairy Sci.* **1989**, 72, 2257.
62. Söderhjelm, P.; Andersson, B.; *J. Sci. Food Agric.* **1978**, 29, 697.
63. Panfili, G.; Manzi, P.; Pizzoferrato, L.; *Analyst* **1994**, 119, 1161.
64. Gong, B. Y.; Ho, J. W.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, 20, 2389.
65. Bianchini, R.; Penteadó, M. V. C.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1999**, 19, 349.
66. Ortiz-Boyer, F.; Fernandez-Romero, J. M.; Luque de Castro, M. D.; Quesada, J. M.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, 21, 503.
67. Campos, J. M.; Paixão, J. A.; *Resumos da 4ª Jornada de Iniciação Científica Centenário Gilberto Freire da Fapece/CNPq, Recife, Brasil, 2000.*
68. Eisses, J.; Vries, H.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1969**, 52, 1189.
69. Demopoulos, C. A.; Antonopoulou, S.; Andrikopoulos, N. K.; Kapoulas, V. M.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1996**, 19, 521.
70. Parrish, D. B.; *C. R. C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1977**, 9, 375.
71. Parrish, D. B.; *C. R. C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1979**, 19, 29.
72. Subramanyam, G. B.; Parrish, D. B.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1976**, 59, 1125.
73. Surai, P. F.; Ionov, I. A.; Roshal, A. D.; *SU pat. 1684-661* **1991**.
74. Paixão, J. A.; Godoy, H. T.; *Resumos do 7º Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins, Águas de São Pedro, Brasil, 1998*, p. 279.
75. Wielinski, S.; Olszanowski, A.; *Chromatographia* **1999**, 50, 109.
76. Skoog, D. A.; Leary, J. L.; *Principles of instrumental analysis*, 4<sup>th</sup> ed., Harcourt Brace College Publishers, Saunders College Publishing: New York, 1992.
77. Tuan, S.-; Lee, T. F.; Chou, C. C.; Wei, Q. K.; *J. Micronutr. Anal.* **1989**, 6, 35.
78. Ueda, T.; Igarashi, O.; *J. Micronutr. Anal.* **1990**, 7, 79.
79. Mulholand, M.; Dolphin, R. J.; *J. Chromatogr. A* **1985**, 350, 285.
80. Thorpe, V. A.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1990**, 73, 463.
81. Wahyuni, W. T.; Jinno, K.; *Chromatographia* **1987**, 23, 320.
82. Paixao, J. A.; Godoy, H. T.; *Resumos do 7º Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins, Águas de São Pedro, Brasil, 1998*, p. 146.
83. Singh, U.; Bradbury, J. H.; *J. Sci. Food Agric.* **1988**, 45, 87.
84. Milne, D. B.; Botnen, J.; *Clin. Chem.* **1986**, 32, 874.
85. Chuang, C. Z.; Trosclair, G.; Lopez-S., A.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1994**, 17, 3613.
86. Parris, N.; *J. Chromatogr.* **1978**, 157, 161.
87. Mawer, E. B.; Berry, J. L.; Bessone, J.; Shany, S.; Smith, H.; White, A.; *Steroids* **1985**, 46, 741.
88. Shimada, K.; Kobayashi, N.; *Trends Anal. Chem.* **1991**, 10, 103.
89. Stancher, B.; Zonta, F.; *J. Chromatogr.* **1982**, 256, 93.
90. Jackson, P. A.; Shelton, C. J.; Frier, P. J.; *Analyst* **1982**, 107, 1363.
91. Landen Jr., W. O.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1980**, 63, 131.
92. Moreno, P.; Salvadó, V.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 870, 207.
93. Papadoyannis, I. N.; Tsioni, G. K.; Samanidou, V. F.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, 20, 3203.
94. Abidi, S. L.; Mounts, T. L.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1996**, 19, 509.
95. Nsenguyumva, C.; DeBeer, J. O.; Van De Wauw, W.; Vlietinck, A. J.; Swaef, S.; Parmentier, F.; *Chromatographia* **1998**, 47, 401.
96. Osborne, L. M.; Miyakawa, T. W.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, 20, 501.
97. Gámiz-Gracia, L.; Velasco-Arjona, A.; LuqueDeCastro, M. D.; *Analyst* **1999**, 124, 801.