



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

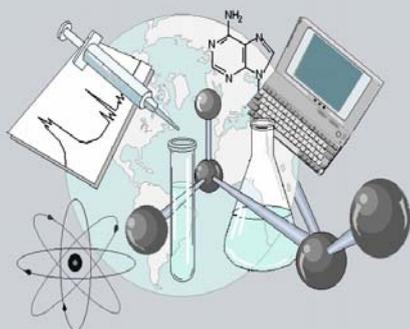
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Desenvolvimento de método cromatográfico limpo para a determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos explorando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ambientes micelares”**

Dissertação apresentada por **Vanessa Kienen** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química

CEE



Centro de  
Ciências Exatas

MARINGÁ, MARÇO/2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

K47d Kienen, Vanessa  
Desenvolvimento de método cromatográfico limpo para a determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos explorando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ambientes micelares / Vanessa Kienen. -- Maringá : [s.n.], 2007.  
92 f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Cláudio Celestino de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química, 2007.

1. CLAE. 2. Vitaminas lipossolúveis. 3. Química limpa. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química. II. Título.

CDD 21.ed. - 543.089



**Universidade Estadual de Maringá**  
**Centro de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**  
**Programa de Pós-graduação em Química**

Desenvolvimento de método cromatográfico limpo para a determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos explorando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ambientes micelares.

**Vanessa Kienen**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientador: Prof. Dr Cláudio Celestino de Oliveira**

Maringá, março de 2007.

*“Não digamos não, nem nunca mais. Não digamos sempre ou jamais. Digamos, simplesmente: ainda!... Ainda nos veremos um dia. Ainda nos encontraremos na estrada da vida. Ainda encontraremos a pousada, o afeto almejado, a guarida. Ainda haverá tempo de amar, sem medo, totalmente... infinitamente... sem ter medo de pedir, de implorar, ou chorar... Ainda haverá tempo, para ser feliz novamente. Ainda haverá tristeza, ainda haverá saudade, ainda haverá primavera, o sonho, a quimera. Ainda haverá alegria, apesar das cicatrizes. Ainda haverá esperança, porque amanhã será um novo dia!...”*

**Paulo Coelho**

## **DEDICATÓRIA**

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

Aos meus pais, pois de vocês recebi o dom mais precioso a Vida. Já por isso sou infinitamente grata. Mas vocês não se contentaram em presentear-me apenas com ela, mas sim revestiram minha existência com amor, carinho, incentivo, compreensão e dedicação.

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

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Cláudio, pela orientação, paciência, confiança, amizade, incentivo e por compartilhar não apenas seus conhecimentos acadêmicos, mas também suas experiências de vida;

Ao Prof. e amigo Willian, pelo incentivo, ajuda, colaboração, pelas idéias e pelos ensinamentos no laboratório e na vida.

A Prof<sup>ª</sup>. Maria Helena pela amizade, ajuda e incentivo;

Ao Prof. Nilson e Jesuí pela amizade, colaboração e incentivo;

Ao Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade;

Aos amigos Ana Cláudia, Ana Paula Ozima, Ana Paula, Ângela, André, Augusto, Cristiano, Danielle, Eliane, Elidia, Elisa, Flávia, Gisele, Higo, Lílian, Marcela, Marina, Milton, Rúbia, Simone, Silvia, Solange, Patrícia, Valquíria e Vanessa pela amizade, incentivo e por me ajudar sempre nas horas em que mais precisei;

Ao Claudemir, Cristina, Edson e Moacir pela amizade e disposição em ajudar sempre que necessário;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Aos meus pais, Waldemiro e Lia pelo carinho, incentivo e compreensão;

As minhas amigas Adriana, Daniele, Flávia, Francieli, Francielle, Juliana, Michely, Paula, Tatiana e Vânia pela amizade, incentivo, carinho e compreensão.

A toda minha família, amigos e a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>viii</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>xi</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>05</b>
2.1. Vitaminas Lipossolúveis.....	05
2.1.1. Vitamina A.....	06
2.1.2. Vitamina D.....	10
2.1.3. Vitamina E.....	12
2.1.4. Vitamina K.....	16
2.2. Análise química das vitaminas lipossolúveis.....	18
2.3. Formas de extração das vitaminas lipossolúveis.....	21
2.4. Cromatografia.....	23
2.4.1. Classificação pela forma física.....	25
2.4.2. Classificação cromatográfica pela fase móvel.....	25
2.4.3. Classificação pela fase estacionária.....	26
2.4.4. Classificação pelo modo de separação.....	26
2.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	27
2.6. Surfactantes e Ambientes Micelares.....	34

2.7. Química Limpa.....	37
2.8. Parâmetros Cromatográficos.....	39
2.9. Planejamento fatorial.....	43
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
3.1.Objetivo Geral.....	46
3.2.Objetivo Específico.....	46
<b>4.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
4.1.Reagentes e Soluções.....	47
4.1.1.Reagentes.....	47
4.1.2.Soluções.....	48
4.2.Equipamentos e Acessórios.....	49
4.2.1.Espectrofotômetro.....	49
4.2.2.Cromatógrafo.....	49
4.3.Métodos.....	51
4.3.1. Espectros UV-Vis.....	51
4.3.2. Testes preliminares.....	51
4.3.3. Planejamento fatorial para otimização do método cromatográfico para determinação das vitaminas lipossolúveis.....	52
4.3.4.Método convencional.....	53
4.4. Aplicações.....	54
4.4.1. Extração das vitaminas lipossolúveis (A, D3, E e K1) de alimentos.....	54

4.4.2. Extração das vitaminas lipossolúveis (A, D3, E e K1) dos complexos vitamínicos.....	56
<b>5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
5.1.Espectros de UV-Vis.....	57
5.2. Determinação de vitaminas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em ambientes micelares.....	59
5.2.1. Testes preliminares.....	59
5.2.2. Planejamento fatorial e otimização das variáveis.....	68
5.2.3. Determinação das vitaminas utilizando o método cromatográfico convencional.....	73
5.3. Aplicações.....	74
5.3.1. Figuras de mérito do método proposto.....	74
5.3.2. Figuras de mérito do método convencional.....	78
5.3.3. Comparação das características do método proposto e do método convencional.....	81
5.3.4. Determinação de vitaminas em amostras de alimentos e complexos vitamínicos.....	82
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
Figura 01. Fórmula estrutural do Retinol (Vitamina A).....	07
Figura 02. Fórmula estrutural do Acetato de Retinol.....	07
Figura 03. Fórmula estrutural do Ergocalciferol (Vitamina D2).....	10
Figura 04. Fórmula estrutural do Colecalciferol (Vitamina D3).....	10
Figura 05. Fórmula estrutural do Tocoferol (Vitamina E).....	13
Figura 06. Fórmula estrutural do $\alpha$ -Acetato de Tocoferol.....	14
Figura 07. Fórmula estrutural da Filoquinone (Vitamina K1).....	16
Figura 08. Fórmula estrutural da Menaquinone (Vitamina K2).....	16
Figura 09. Fórmula estrutural da Menadione (Vitamina K3).....	16
Figura 10. Formação do agregado micelar.....	35
Figura 11. Diferentes aglomerados de sistemas micelares.....	36
Figura 12. Medidas relacionadas à determinação da resolução.....	40
Figura 13. Medidas relacionadas ao cálculo do fator de assimetria e de alargamento...	41
Figura 14. Cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	50
Figura 15. Esquema da extração das vitaminas lipossolúveis das amostras de alimentos e complexos vitamínicos.....	55
Figura 16. Espectro eletrônico das vitaminas lipossolúveis em solução de álcool etílico.....	57
Figura 17. Espectro eletrônico da mistura dos surfactantes.....	59
Figura 18. Efeito da utilização de soluções aquosas do surfactante SDS na separação das vitaminas lipossolúveis.....	60

Figura 19. Efeito da utilização de soluções aquosas de álcool etílico na separação das vitaminas lipossolúveis.....	61
Figura 20. Efeito da concentração do surfactante SDS na separação das vitaminas lipossolúveis.....	62
Figura 21. Efeito da composição da fase móvel na separação das vitaminas lipossolúveis.....	63
Figura 22. Efeito da adição de modificadores químicos à fase móvel na separação das vitaminas lipossolúveis.....	64
Figura 23. Efeito da concentração de álcool etílico na separação das vitaminas lipossolúveis na temperatura de 30,0 °C.....	66
Figura 24. Efeito da vazão e da presença de álcool butílico na separação das vitaminas lipossolúveis.....	68
Figura 25. Otimização dos parâmetros experimentais utilizando planejamento fatorial na separação das vitaminas lipossolúveis.....	69
Figura 26. Cromatograma de uma solução padrão contendo as vitaminas D3, A, E, K1.....	72
Figura 27. Efeito do controle de temperatura na separação das vitaminas lipossolúveis D3, A, E.....	73
Figura 28. Determinação de vitaminas lipossolúveis empregando-se método cromatográfico convencional.....	74
Figura 29. Curva Analítica para a Vitamina A pelo método proposto.....	75
Figura 30. Curva Analítica para a Vitamina D3 pelo método proposto.....	76
Figura 31. Curva Analítica para a Vitamina E pelo método proposto.....	76

Figura 32. Curva Analítica para a Vitamina K1 pelo método proposto.....	77
Figura 33. Curva Analítica para a Vitamina A pelo método convencional.....	78
Figura 34. Curva Analítica para a Vitamina D3 pelo método convencional.....	79
Figura 35. Curva Analítica para a Vitamina E pelo método convencional.....	79
Figura 36. Curva Analítica para a Vitamina K1 pelo método convencional.....	80
Figura 37. Cromatograma de amostras de preparações farmacêuticas.....	85

## ÍNDICE DE TABELAS

	<b>Páginas</b>
Tabela 01. Estrutura relativa do tocoferol aos radicais R1 e R2.....	13
Tabela 02. Informações sobre a toxicidade de alguns solventes orgânicos em teste realizado com ratos.....	33
Tabela 03. Combinação dos ensaios de um planejamento fatorial $2^2$ .....	44
Tabela 04. Combinação dos ensaios de um planejamento fatorial $2^3$ .....	45
Tabela 05. Fatores utilizados no planejamento fatorial $2^3$ para a separação das vitaminas lipossolúveis.....	52
Tabela 06. Resoluções cromatográficas para planejamento fatorial $2^3$ para determinação das vitaminas lipossolúveis.....	71
Tabela 07. Características do método cromatográfico proposto para a determinação das vitaminas lipossolúveis.....	77
Tabela 08. Características do método cromatográfico convencional para a determinação das vitaminas lipossolúveis.....	80
Tabela 09. Comparação das características do método cromatográfico proposto e do método convencional para a determinação das vitaminas lipossolúveis.....	81
Tabela 10. Ensaio de recuperação das vitaminas lipossolúveis em amostras de leite fortificado, leite em pó, óleo e repolho através do método proposto e do método convencional utilizando adição de padrão.....	83

**Desenvolvimento de método cromatográfico limpo para a determinação  
de vitaminas lipossolúveis em alimentos explorando a cromatografia  
líquida de alta eficiência (CLAE) e ambientes micelares**

Autora: Vanessa Kienen

Orientador: Prof. Dr Cláudio C. Oliveira

**Resumo**

Neste trabalho é proposta a separação e determinação de vitaminas lipossolúveis utilizando-se CLAE associada a ambientes micelares, sem a utilização de reagentes potencialmente tóxicos como fase móvel. Como aplicação foi selecionada a determinação de vitaminas lipossolúveis em amostras de alimentos, complexos vitamínicos e similares, sempre utilizando como fase estacionária uma coluna cromatográfica C18, sendo esta temporariamente modificada, durante a análise química, pelos constituintes da própria fase móvel, o que amplia as possibilidades de aplicação da estratégia e possibilita o desenvolvimento de métodos analíticos limpos explorando a CLAE. O método cromatográfico desenvolvido para a determinação de vitaminas lipossolúveis utilizou como fase móvel álcool butílico 15,0 % (v/v), SDS 3,00 % (m/v) e solução tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,00, temperatura de 30,0°C, associada a uma vazão de 2,00 mL/min e como fase estacionária uma coluna C18. A metodologia mostrou-se seletiva, sensível, robusta, simples, alta frequência analítica, com tempos de retenção de 4,0; 9,6; 13,0 e 22,7 min e limites de detecção e quantificação de 0,94; 0,89; 1,18 e 0,87 mg/L e 3,12; 3,00; 4,00 e 2,90

mg/L respectivamente para as vitaminas D3, A, E e K1 com desvio padrão de *ca* 5,0 %.

Quando o método proposto foi aplicado a amostras reais os resultados obtidos foram concordantes com aqueles obtidos pelo procedimento convencional.

**Development of a green chromatographic method for determination of fat soluble vitamins in foods exploiting high performance liquid chromatograph (HPLC) and micellar media**

Author: Vanessa Kienen

Adviser: Prof. Cláudio C. Oliveira

**Abstract**

In the present work is proposed the separation and determination of fat soluble vitamins by using HPLC associated to micellar media, without usage of potentially toxic reagents as mobile phase. The determination of fat soluble vitamins in food, vitamin complex and similar samples were selected as application, always using a RP-18 column as stationary phase, which was temporary modified during the chemical analysis by the mobile phase constituents, increasing the applicability of the strategy and becoming possible the development of green analytical methods exploiting HPLC. The proposed method for determination of fat soluble vitamins was carried out by using 15.0 % (v/v) butyl alcohol, 3.00 % (w/v) SDS and 0.02 mol/L phosphate buffer, pH 7.00, temperature of 30.0° C, associated to a flow rate of 2.00 mL/min and a RP-18 as stationary phase. The analytical method is selective, sensitive, robust, simple, presents high analytical frequency, with retention times of 4.0; 9.6; 13.0 e 22.7 min, detection and quantification limits of 0.94; 0.89; 1.18 e 0.87 mg/L and 3.12; 3.00; 4.00 and 2.90 mg/L, respectively for D3, A, E and K1 vitamins with standard deviation of *ca* 5.0 %. When the proposed method was applied

to real samples the obtained results were in agreement with those obtained by the conventional method.

## **1. Introdução**

Com o avanço da química analítica tem sido possível desenvolver métodos analíticos mais seletivos e sensíveis para a determinação, por exemplo, de substâncias químicas como contaminantes, nutrientes, vitaminas e dentre outras. Assim, existe uma demanda crescente por métodos analíticos que possibilitem análises de diversas amostras em diferentes áreas da ciência, bem como a necessidade de automação dos procedimentos de análises, com o objetivo de aumentar a capacidade de processamento de amostras e obter resultados com um maior grau de confiabilidade que possam ajudar no desenvolvimento científico e tecnológico.

Durante muito tempo o valor nutritivo de um alimento foi definido com base no seu teor de proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais, uma vez que unicamente essas substâncias eram consideradas necessárias para o crescimento e desenvolvimento dos organismos. No entanto, há aproximadamente 100 anos foi reconhecido o fato de que o organismo também necessita de pequenas quantidades de substâncias orgânicas específicas e essenciais que foram denominadas de vitaminas [1].

Vitaminas são substâncias orgânicas presentes em muitos alimentos em pequenas quantidades e são indispensáveis ao funcionamento do organismo estando presentes na forma de co-fatores. Sua ausência sistemática na dieta resulta, quase sempre, em crescimento e desenvolvimento deficientes e outras perturbações no organismo, configurando-se um quadro sintomatológico característico de carência [2].

À medida que os cientistas foram associando os fatores encontrados nos alimentos com as doenças carências, estas substâncias foram sendo designadas por letras em ordem alfabética [3]. Assim o fator encontrado na manteiga e que tinha atividade em vitamina A foi denominado de fator lipossolúvel A, o fator cuja

deficiência era responsável pelo desenvolvimento do beribéri<sup>1</sup> foi chamado de fator hidrossolúvel B e o fator antiescorbúutico<sup>2</sup> foi denominado de fator hidrossolúvel C. A partir de então, muitos fatores foram descobertos, sendo a eles atribuídas letras do alfabeto [3].

Apesar deste sistema descritivo ter sido abandonado porque muitos destes fatores tratavam-se da mesma substância e a nomenclatura química estava ausente nestas primeiras designações, ainda hoje se utilizam letras para designar as vitaminas ou grupos de compostos com atividades vitamínicas, colocando-se após a letra que indica a vitamina, índices numéricos que identificam estes fatores, assim tem-se a vitamina D2 e D3, as vitaminas K1, K2, K3 e entre outras [3].

Tradicionalmente, as vitaminas são classificadas em lipossolúveis compreendendo o grupo das vitaminas A, D, E, K e hidrossolúveis compreendendo o grupo do complexo B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12) e a Vitamina C, de acordo com propriedades fisiológicas e físico-químicas [2].

Independentemente dos fatores do ambiente, a maioria dos organismos é incapaz de sintetizá-las por via anabólica, razão pela qual as vitaminas precisam ser incluídas na dieta alimentar. Em geral, são necessárias micro-quantidades de vitaminas que variam em função da idade, sexo, estado fisiológico e atividade física do indivíduo. As necessidades nutricionais desses micro-nutrientes aumentam durante os períodos de crescimento, gestação e lactação, nas condições de trabalho intenso e na ocorrência de determinadas doenças, notadamente as infecciosas [2].

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,

---

<sup>1</sup> Doença provocada por carência de vitamina B1, provoca desordens do sistema nervoso, fraqueza muscular, dificuldades respiratórias e também pode afetar o coração.

<sup>2</sup> Escorbuto - doença provocada por carências graves de vitamina C, provoca hemorragias nas gengivas, inchaço, dores nas articulações e enfraquecimento das estruturas de colágeno.

os fortificados ou enriquecidos e os vitamínados. Lamentavelmente, a adição desses micro-nutrientes a produtos industrializados também tem sido utilizada como mera estratégia de “marketing”, onde os interesses comerciais prevalecem, em detrimento das reais necessidades do indivíduo [2].

Devido à importância nutricional das vitaminas lipossolúveis, várias metodologias têm sido desenvolvidas para a determinação destas substâncias em amostras de alimentos, produtos farmacêuticos e fluidos biológicos [4]. No entanto, a padronização de métodos para determinação das vitaminas lipossolúveis é dificultada devido à diversidade de procedimentos descritos na literatura e à morosidade da aplicação da técnica oficial da “Association Official of Analytical Chemistry” (AOAC) [5]. 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 [2]. Além disso, um outro fator determinante na análise de vitaminas são os erros nas análises, pouco frequentes com outras substâncias, devido à 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-redução, fatores que devem ser considerados pelos métodos analíticos [2].

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que se efetua a separação, identificação e quantificação das espécies químicas [6].

Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem se destacando entre as demais técnicas analíticas devido a sua grande versatilidade e confiabilidade em análises de compostos químicos orgânicos, que necessitam de uma separação prévia, antes de sua quantificação. Porém, esta técnica analítica normalmente está associada a solventes orgânicos que são utilizados como fase móvel, provocando a

geração de resíduos tóxicos após a análise química, sendo que estes solventes nem sempre são degradados no meio ambiente.

Na tentativa de solucionar esta deficiência, tem sido desenvolvida recentemente a cromatografia líquida micelar (CLM) devida à possibilidade de se conseguir a separação de compostos iônicos e não iônicos utilizando a CLAE em fase reversa. O efeito da formação da micela, o baixo custo da análise, a baixa volatilidade da fase móvel são alguns dos fatores que favorecem a utilização da técnica [4]. Deve-se ressaltar que estes métodos analíticos minimizam a utilização de solventes orgânicos potencialmente tóxicos, mas não os eliminam completamente, pois muitas vezes, estes solventes são utilizados como modificadores químicos. Assim, esta técnica analítica não está de acordo com a tendência internacional moderna que exige o desenvolvimento de métodos analíticos limpos.

Considerando estes aspectos, o presente trabalho tem o objetivo de verificar a possibilidade de se determinar vitaminas lipossolúveis utilizando a CLAE associada a ambiente micelar sem a utilização de solventes de alta toxicidade. Desta forma, é proposta a exploração de ambientes micelares, com a utilização de reagentes de baixa toxicidade como fase móvel, para a determinação de vitaminas lipossolúveis sempre utilizando como fase estacionária uma coluna cromatográfica C18, sendo esta, temporariamente modificada durante a análise química pelos constituintes da própria fase móvel, ampliando as possibilidades de aplicação da estratégia e possibilitando o desenvolvimento de métodos cromatográficos limpos.

## **2. Revisão Bibliográfica**

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de método cromatográfico limpo explorando ambientes micelares para a determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos, complexo vitamínico e similares. Devido às características dos métodos cromatográficos e dos ambientes micelares que permitem separar espécies químicas e solvatar moléculas orgânicas de baixa polaridade em meio aquoso, é possível prever que a união destas duas ferramentas possa dar origem a sistemas cromatográficos com características benéficas de ambos, possibilitando o desenvolvimento de métodos cromatográficos com a utilização de solventes orgânicos de baixa toxicidade que poderão ser classificados como limpos e estando de acordo com a tendência internacional moderna. Assim, esta revisão foi subdividida de forma a destacar as características das vitaminas lipossolúveis; os fundamentos da cromatografia, mais especificamente a cromatografia líquida de alta eficiência; os surfactantes e os ambientes micelares, a química limpa e informações sobre parâmetros cromatográficos e planejamento fatorial.

### **2.1. Vitaminas Lipossolúveis**

As vitaminas lipossolúveis são substâncias que apresentam uma baixa polaridade e subdividem-se em quatro grupos, vitaminas A, D, E, K, sendo que a atividade biológica atribuída a estas substâncias está relacionada à estrutura de cada vitamina. As vitaminas lipossolúveis são normalmente solúveis em lipídios e nos solventes orgânicos,

sendo geralmente armazenadas no organismo nos mesmos locais das células adiposas [3].

As vitaminas são nutricionalmente essenciais ao organismo na forma de micronutrientes, pois estão presentes na maioria dos alimentos em pequenas quantidades [7]. Os alimentos representam a maior e mais importante fonte de vitaminas consumidas, pois elas estão naturalmente presentes nas plantas, animais e também podem ser adicionadas na fortificação dos alimentos. Uma outra fonte de vitamina são os suplementos vitamínicos na forma de cápsulas, soluções intravenosas, dentre outras [7].

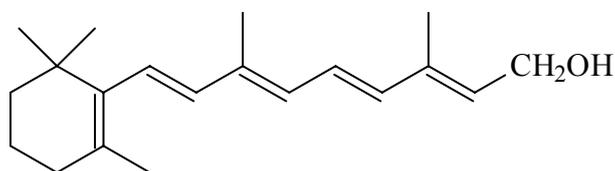
A deficiência de nutrientes, aqui especificamente as vitaminas, representa uns dos maiores problemas de saúde do ser humano, por isso, a adição destas substâncias promove uma melhora nutricional na qualidade dos alimentos industrializados. Deve ser salientado que no caso de alimentos fortificados deve-se adicionar vitaminas nas formas estáveis [7].

### **2.1.1. Vitamina A**

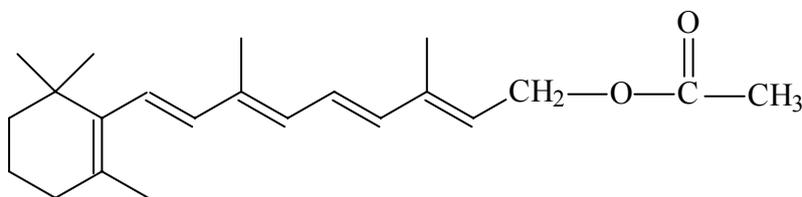
O grupo da vitamina A inclui o retinol (Fig. 01) e os carotenóides. O termo retinóis refere-se à classe de compostos incluindo o retinol e seus derivados químicos; vários retinóis desempenham atividades nutricionais semelhantes. Algumas enzimas presentes no organismo podem converter estruturas químicas semelhantes ao retinol à forma da vitamina ou ainda converter as substâncias que são equivalentes ao retinol, como o seu aldeído ou o seu éster [7]. O  $\beta$ -caroteno é um precursor de vitamina A e também atua como antioxidante na remoção dos radicais livres no organismo, prevenindo a formação de peróxidos e como atenuador físico, dissipando a energia extra

contida no oxigênio singlete que é tido como forte agente mutagênico em razão da peroxidação de lipídios [8].

De acordo com a necessidade do organismo o  $\beta$ -caroteno é convertido em vitamina A, sendo que uma molécula de  $\beta$ -caroteno pode ser clivada por uma enzima intestinal específica em duas moléculas de vitamina A [7]. As formas sintéticas do acetato de retinol (Fig. 02) e palmitato de retinol são, também, utilizadas na fabricação de alimentos fortificados [7].



**Figura 01. Fórmula estrutural do Retinol (Vitamina A) [7].**



**Figura 02. Fórmula estrutural do Acetato de Retinol [7].**

Além destas formas químicas, a vitamina A pode apresentar diversos isômeros espaciais, estes isômeros são formados por modificações da cadeia lateral da forma “trans” para a forma “cis” [3].

A Vitamina A ou retinol (Fig. 01) é armazenada no fígado e de acordo com a demanda pode ser liberada na corrente sanguínea. Esta vitamina é essencial para o bom

funcionamento da visão, para o crescimento, para a diferenciação dos tecidos, na manutenção do sistema imunológico e reprodutor [9-10].

Um dos sintomas iniciais de deficiência em vitamina A é a cegueira noturna, ou uma capacidade diminuída para ver na penumbra. A deficiência grave produz a xerofthalmia, uma doença degenerativa da córnea do olho que se não tratada pode causar cegueira total. A deficiência de vitamina A também pode causar o desenvolvimento anormal nos ossos e distúrbios do sistema reprodutivo [11]. O mecanismo de atuação da vitamina A no organismo ainda não está completamente esclarecido, mas existem claras indicações de um importante papel na síntese de glicoproteínas, que ocorrem nas membranas das células mucosas, e cuja falta pode aumentar a suscetibilidade a infecções seguindo a degeneração do epitélio que reveste o trato respiratório e digestivo [11].

Atualmente, tem-se dado atenção considerável à possibilidade de a vitamina A ter uma função anticâncer. Experimentos em laboratórios com altas doses da vitamina mostram alguns resultados promissores, mas ainda não existem provas concretas de seu efeito terapêutico. Grandes doses aumentam as reservas do fígado e os riscos de hipervitaminose, mas não aumentam a concentração da vitamina nos tecidos alvo [11].

O efeito benéfico da vitamina A, também, está relacionado à sua atividade antioxidante, pois tanto o retinol quanto o  $\beta$ -caroteno são antioxidantes fracos, que podem ajudar na eliminação de substâncias nocivas formadas em algumas reações envolvendo oxigênio [11].

Dentre as fontes naturais de vitamina A temos o fígado bovino, gema de ovo, óleos de fígado de peixe, derivados do leite, manteiga e margarina. Já os carotenóides (convertidos em vitamina A no intestino) estão presentes em vegetais folhosos verdes escuros (agrião, brócolis, repolho), vegetais e frutas amarelas (banana, laranja, cenoura)

[1]. As fontes sintéticas são as cápsulas de gelatina mole; comprimidos mastigáveis, efervescentes, ampolas e ainda na maioria dos suplementos multi-vitamínicos.

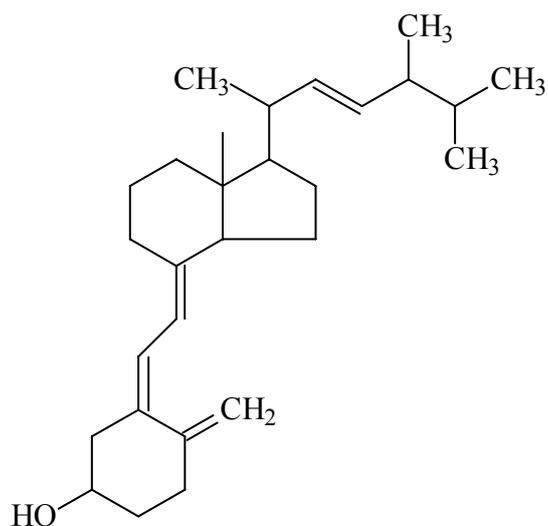
Deve ser considerado que o excesso de vitamina A pode ser tóxico ao ser humano. Como esta vitamina é armazenada no fígado, a administração de quantidades elevadas de vitamina A durante um longo período de tempo, pode eventualmente exceder a capacidade de armazenamento do fígado, passando para a corrente sanguínea podendo provocar efeitos adversos como cefaléia (dor de cabeça), descamação da pele, aumento do baço e dos rins, espessamento dos ossos e dores articulares [11]. Por outro lado, o  $\beta$ -caroteno, convertido lentamente em vitamina A no organismo, pode ser consumido em grandes quantidades sem causar intoxicação; o único efeito secundário observado é o surgimento de um tom amarelo-escuro (carotenose) nas palmas das mãos e nas plantas dos pés [11].

A vitamina A é estável em meio alcalino e instável em meio ácido e oxidante, sendo a perda de sua atividade acelerada pelo calor e pela exposição à luz [7]. Por serem mais estáveis a oxidação que a forma alcoólica, os ésteres de retinol, especialmente o acetato de retinol e o palmitato de retinol, são utilizados nos alimentos fortificados [3].

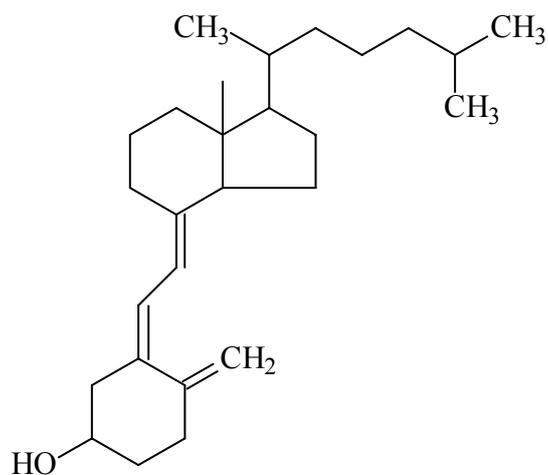
A degradação da vitamina A, geralmente, ocorre juntamente com a degradação dos lipídios insaturados. Assim, fatores que promovem a oxidação dos lipídios insaturados também promovem a degradação da vitamina A; ambas causadas pela oxidação direta ou por efeitos indiretos dos radicais livres [7]. As perdas da atividade da vitamina A em alimentos ocorrem através das reações envolvendo as insaturações da cadeia lateral, reações de autooxidação ou pela isomerização [7].

### 2.1.2. Vitamina D

O grupo da vitamina D compreende a ergocalciferol (vitamina D2) e a colecalciferol (vitamina D3). A vitamina D2 (Fig. 03) é produzida a partir do ergosterol e a vitamina D3 (Fig. 04) é produzida a partir do 7-deidrocolesterol [3].



**Figura 03. Fórmula estrutural do Ergocalciferol (Vitamina D2) [6].**



**Figura 04. Fórmula estrutural do Colecalciferol (Vitamina D3) [6].**

O ergosterol é uma pró-vitamina D2 existente nas plantas, fermentos e fungos; por ação da radiação ultravioleta a molécula de ergosterol sofre um rearranjo intramolecular formando a vitamina D2 [3]. A substância 7-deidrocolesterol também é uma pró-vitamina que é biosintetizada na pele quando a substância é exposta à radiação solar, ocorrendo rearranjo estrutural e a formação da vitamina D3 [9-10]. As duas formas desta vitamina são utilizadas na forma sintética para a produção de alimentos fortificados [7].

A vitamina D é essencial para o desenvolvimento ósseo e na prevenção de doenças relacionadas aos ossos como a osteoporose, a osteomalácia (adultos) e o raquitismo (crianças). Também atua na absorção do cálcio e do fósforo no intestino grosso, para a sua mobilização a partir dos ossos e na reabsorção nos rins. Através destas três funções, a vitamina D tem um papel importante que é assegurar o funcionamento correto dos músculos, nervos, coagulação sanguínea, crescimento celular e utilização de energia [9-10]. O organismo é capaz de manter estoques desta vitamina, mas diferentemente das outras vitaminas lipossolúveis, ela não é armazenada no fígado, mas nas células lipídicas da maioria dos tecidos, sobretudo no tecido adiposo [11].

Na deficiência de vitamina D, o primeiro distúrbio observado no ser humano é a perda de minerais dos tecidos ósseos e das cartilagens; a concentração de cálcio e de fósforo no sangue diminui, provocando doenças ósseas [11]. O raquitismo e a osteomalácia são as manifestações mais amplamente reconhecidas da deficiência de vitamina D, ambas caracterizadas pela perda de mineral a partir dos ossos, resultando em deformidades do esqueleto como: pernas arqueadas nas crianças, retardamento do crescimento de ossos longos (perna e braços) ou até mesmo mineralização inadequada do esmalte dos dentes e da dentina [12]. Na osteoporose, ocorre uma perda óssea e não

apenas desmineralização, que pode estar associada com uma perturbação do metabolismo da vitamina D [12].

As fontes naturais de vitamina D são os óleos de fígado de peixe, ovos, leite enriquecido, queijo, manteiga e margarina [1]. As fontes sintéticas são os comprimidos, cápsulas, soluções oleosas e injeções.

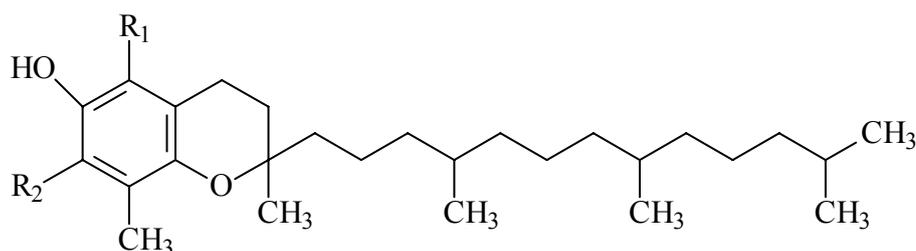
O excesso de vitamina D pode causar intoxicação, acarretando num aumento da concentração de cálcio no sangue. O cálcio pode depositar-se por todo o corpo, sobretudo nos rins e pulmões, podendo causar a calcificação dos tecidos moles. Quantidade elevada desta vitamina no organismo não está associada à exposição exagerada à radiação solar, mas sim, à ingestão exagerada de complexos vitamínicos que contém vitamina D [11].

A vitamina D é relativamente estável em meio ácido e instável em meio alcalino e oxidante, sendo sensível à luz e a temperatura [7].

### **2.1.3. Vitamina E**

Vitamina E é um nome coletivo que engloba oito diferentes produtos sintetizados pelos vegetais, os quais podem ser divididos em duas classes: os tocoferóis que podem ser encontrados na natureza na forma de tocoferol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) e os tocotrienóis [9-10].

Os tocoferóis (Fig.05 e Tab.01) e tocotrienóis quando não estão na forma esterificada, atuam como substâncias antioxidantes [7].



**Figura 05. Fórmula estrutural do Tocoferol (Vitamina E) [7].**

**Tabela 01. Estrutura relativa do tocoferol aos radicais R1 e R2 [7].**

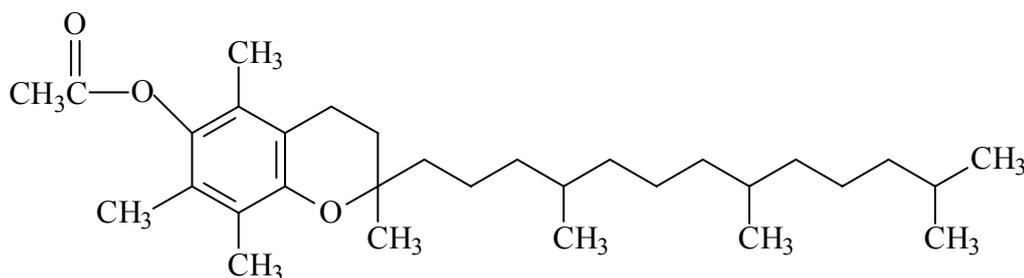
Tocoferol	R1	R2
$\alpha$	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$	CH <sub>3</sub>	H
$\gamma$	H	CH <sub>3</sub>
$\delta$	H	H

As substâncias antioxidantes previnem a ocorrência de danos oxidativos em macromoléculas biológicas provocada pelas espécies reativas provenientes do oxigênio, tais alterações oxidativas podem contribuir para o desenvolvimento de várias doenças [8]. A hipótese antioxidante sugere que os agentes redutores possuem a capacidade de prevenir as alterações oxidativas, pois desempenham a função de remover os radicais livres e também de atenuar o efeito físico do oxigênio singlete, assim, níveis elevados destas substâncias reduzem o risco do aparecimento de doenças crônicas [8]. Dietas ricas em substâncias que atuam como antioxidantes; como a ingestão de frutas, vegetais, cereais, óleo e grãos são benéficas à defesa celular, protegendo os componentes da célula de alterações oxidativas [8]. De uma forma geral, estas substâncias não tornarão saudáveis as células ou tecidos doentes, entretanto inibirão ou tornarão o progresso mais

lento [8]. Existem evidências crescentes mostrando que a vitamina E, a vitamina A, o selênio (componente da enzima glutathione peroxidase) e o ácido ascórbico (vitamina C) funcionam coletivamente como compostos antioxidantes do organismo [11].

Os tocoferóis (Fig. 05) são compostos biologicamente ativos, que se diferenciam somente no número e nas posições de radicais metila (-CH<sub>3</sub>) da sua molécula, embora mínimas estas mudanças estruturais influenciam na atividade biológica destas moléculas [7]. Os tocoferóis são eficientes receptores do oxigênio singlete, sendo o  $\alpha$ -tocoferol o mais reativo dentre os quatro tipos de tocoferóis, combinando processos físico e químico [8]. Sua reatividade frente ao oxigênio singlete está relacionada com a atividade da vitamina E, sendo a forma alfa 100,0 % reativa enquanto as formas beta, gama e delta são 50,0; 26,0 e 10,0 % reativas, respectivamente. A atividade biológica dos tocoferóis está relacionada com a habilidade de inibir a oxidação de ácidos graxos insaturados, interrompendo a reação em cadeia da membrana [8].

As formas sintéticas da vitamina são utilizadas para a produção de alimentos fortificados. Dentre essas formas temos o  $\alpha$  - acetato de tocoferol (Fig. 06), no entanto esta forma, não apresenta atividade antioxidante [7].



**Figura 06. Fórmula estrutural do  $\alpha$  – Acetato de Tocoferol [7].**

A vitamina E protege as membranas das células dos radicais peroxil, atua na proteção dos tecidos, nas reações de peroxidação, nos processos metabólicos e na

prevenção das doenças cardiovasculares e coronárias [13]. A vitamina E é armazenada no fígado e no tecido adiposo, existindo uma relação intrínseca entre o envelhecimento humano e o teor de vitamina E nos tecidos [3].

A deficiência da vitamina E em seres humanos é muito rara, não ocorrendo casos de deficiência clínica em adultos saudáveis sob quaisquer circunstâncias normais. A manutenção dos níveis satisfatórios da vitamina E nos tecidos está diretamente relacionada à quantidade de ácidos graxos polinsaturados ingeridos na dieta [11].

As fontes naturais de vitamina E são óleos vegetais (amendoim, soja, palma, milho, girassol), o gérmen de trigo, a castanha do Pará, os vegetais de folhas verdes (espinafre e alface), leite fortificados e ovos [1]. As fontes sintéticas de vitamina E são as cápsulas de gelatina mole, comprimidos mastigáveis ou efervescentes, ampolas e suplementos multivitamínicos.

A vitamina E é estável em meio alcalino e ácido. Apresenta instabilidade à luz, oxigênio, calor e longos períodos de armazenagem [7]. Deve-se ter muito cuidado para prevenir a oxidação durante os processos de extração utilizando a saponificação e outros tratamentos preliminares [7]. Em extratos de óleos vegetais a vitamina E é bastante estável, a menos que existam condições que permitam a auto-oxidação dos ácidos graxos [11]. Sua presença nos óleos impede o início do processo de rancificação do produto, mas o desenvolvimento dos peróxidos pode superar a quantidade de tocoferóis causando a oxidação. A atividade da vitamina é rapidamente perdida no processo de frituras; e durante a estocagem nem mesmo baixas temperaturas impedem a perda da maior parte da atividade da vitamina [11].

### 2.1.4. Vitamina K

O grupo da vitamina K compreende as vitaminas K1 (filoquinone), K2 (menaquinone) e a vitamina K3 (menadione). A vitamina K1 (Fig. 07) é encontrada em vegetais de folhas verde enquanto a vitamina K2 (Fig. 08) é formada pela ação de bactérias presentes no intestino dos vertebrados [9-10]. Já a vitamina K3 (Fig. 09) é uma forma sintética utilizada na produção de alimentos fortificados [7].

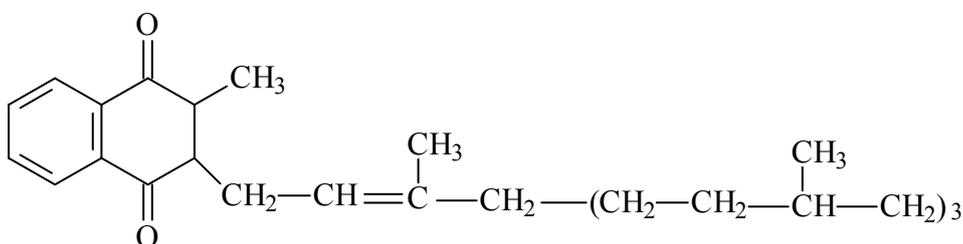


Figura 07. Fórmula estrutural da Filoquinone (Vitamina K1) [7].

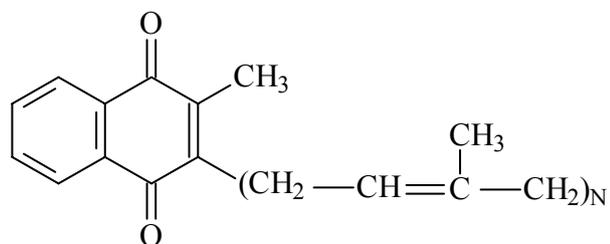


Figura 08. Fórmula estrutural da Menaquinone (Vitamina K2) [7].

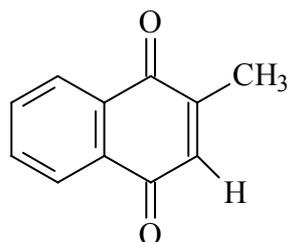


Figura 09. Fórmula estrutural Menadione (Vitamina K3) [7].

A Vitamina K é essencial na ativação da protombina, proteína que converte o fibrinogênio solúvel numa proteína bastante insolúvel chamada fibrina, componente principal da coagulação sanguínea, atua na prevenção das hemorragias internas e também no metabolismo dos ossos [14]. A administração da vitamina K nos estados pré-operatórios melhora o nível de protombina prevenindo as hemorragias [3].

A deficiência de vitamina K é algo muito raro em pessoas adultas por causa da abundante presença de vitamina K1 presente nos alimentos e por causa das bactérias da flora intestinal que sintetizam a vitamina K2 [7]. No entanto, a deficiência pode estar associada com má absorção intestinal ou devido à utilização medicamentos anticoagulantes [7]. Esta deficiência pode resultar numa redução do nível de protombina do sangue com conseqüente retardamento no tempo de coagulação do sangue, podendo provocar sérias hemorragias [3]. Tratamento prolongado com antibióticos associado à falta de uma dieta alimentar e a problemas hepáticos podem levar à deficiência de vitamina K [3]. Os recém nascidos podem sofrer da deficiência desta vitamina que se manifesta através da chamada doença hemorrágica do recém nascido, no entanto, devido à transferência da mãe para o feto a administração de vitamina K as gestantes diminui consideravelmente a incidência da doença [3].

A ingestão de quantidades excessivas de óleo mineral ou de ácidos graxos pode impedir a absorção da vitamina K interferindo diretamente na coagulação sanguínea.

As melhores fontes naturais de vitamina K são os vegetais de folhas verdes (espinafre, brócolis, couve, repolho e alface), fígado bovino, leite fortificado e ovo [1], podendo ser encontrada em quantidades menores em tomates, batatas e nos óleos vegetais [7]. As fontes sintéticas da vitamina K são as cápsulas, ampolas e suplementos multivitamínicos.

O excesso de vitamina K é algo incomum, pois o organismo apresenta uma grande tolerância a esta vitamina. Somente em duas situações a vitamina K possui atividade tóxica quando utilizada em altas doses em recém-nascidos e quando administrada em injeções intravenosas em adultos. O excesso de vitamina K3 (menadione) pode causar náuseas, anemia, entre outros sintomas [12].

A vitamina K é moderadamente estável ao calor e a oxidação, mas é sensível aos meios ácidos, alcalinos e a exposição à luz [7]. Aparentemente a vitamina K é bastante estável nas condições normais de processamento dos alimentos [11].

## **2.2. Análise química das vitaminas lipossolúveis**

O interesse crescente em relação à demanda orgânica por nutrientes, o estabelecimento de padrões nutricionais de ingestão, a preocupação mundial quanto à confiabilidade dos valores nutricionais declarados nos rótulos dos alimentos enriquecidos e a possível toxicidade das doses elevadas tem ressaltado a necessidade de se determinar a composição química das vitaminas nos alimentos [2].

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 pela falta de padrões. Desta forma, foram observados os efeitos anti-xeroftálmico (lesão da córnea) e o fator anti-raquítico do óleo de fígado de peixes e gorduras animais, indicativo inicial da relação entre doença e alimentos. A partir destas observações consolidaram-se os ensaios biológicos em cobaias, enquanto que os testes microbiológicos surgiram na década de 60 [2].

Os ensaios biológicos e microbiológicos são fundamentados em estudo dose e resposta, tomando-se indicativos morfofisiológicos e bioquímicos avaliados contra um

placebo, através de comparações de fontes naturais de vitaminas ou formas químicas diretamente [2].

Os métodos químicos de identificação e quantificação através de derivatização para avaliação das vitaminas A e D 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”, os ácidos trifluoracético e tricloroacético são igualmente recomendados para o mesmo fim [2]. Estes agentes de derivatização também reagem com carotenóides, com produtos da degradação da vitamina A, esteróides (com e sem função vitamínica) e colesterol, constituindo-se estes compostos em interferentes intrínsecos a análise de vitaminas. Outros reagentes mais específicos disponíveis são o de “Emmerie-Engel” (cloreto férrico e 2-bipiridil em solução etanólica) para a vitamina E e o de “Irreverre-Sullivan” (dietilditiocarbamato de sódio em solução etanólica) para a vitamina K [2]. Analisadas individualmente ou em conjunto, estas substâncias, quando derivatizadas, produzem cor instável do amarelo-alaranjado ao salmão [2].

Os métodos espectrofotométricos nas regiões do UV-Vis, consistem na determinação da concentração do analito relacionada à medida de absorbância. Apesar da simplicidade desta técnica, do bom limite de detecção e da boa sensibilidade [15] ela não é a mais indicada para a identificação das vitaminas lipossolúveis, pois estas apresentam um máximo de absorção na região do ultravioleta, fato que inviabiliza a determinação conjunta devido à possibilidade de apresentar a mesma região de absorção.

Um outro fato que inviabiliza a utilização desta técnica é quando as substâncias possuem grupos cromóforos semelhantes, assim a radiação incidente em um comprimento de onda específico poderá estar sendo absorvida pelos compostos

semelhantes [15]. Já na região do visível é necessária a separação da fração de interesse para que se minimizem problemas inerentes à estabilidade das reações envolvidas [2].

A eletroforese capilar (EC) foi muito utilizada para a separação e determinação de substâncias de importância biológica como as vitaminas na década passada. No entanto, as desvantagens da EC incluem a pobre sensibilidade para baixas concentrações e também a impossibilidade de aplicação do método desenvolvido em amostras reais como em alimentos, pois estas amostras na maioria das vezes apresentam uma baixa concentração [16].

A falta de um método analítico adequado para a análise das vitaminas é um problema sério, pois fatores que limitam a utilização dos métodos analíticos envolvem a falta de especificidade dos métodos químicos tradicionais, interferentes nos ensaios biológicos e espectrofotométricos, extração incompleta dos analitos dos alimentos e medidas incompletas das formas dos complexos vitamínicos [7]. Assim, o método de análise química mais recomendado para a separação de formas químicas distintas e avaliações quantitativas das vitaminas é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pois permite a separação destes compostos antes da etapa de quantificação. Através dos parâmetros de separação como a resolução cromatográfica ( $R_s$ ) e o fator de capacidade ( $k$ ) podem ser estudados extratos vitamínicos em presença de outras substâncias com ou sem função vitamínica como, por exemplo, produtos de degradação e isômeros em alimentos e tecidos [2].

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 derivatização) ou através da associação destas técnicas de separação analítica à espectrometria no infravermelho, de massas e à ressonância magnética

nuclear, que fornecem dados concludentes sobre a identificação dos picos, quando devidamente coletados [2].

Além destes métodos outras técnicas analíticas são utilizadas em menor escala nas análises das vitaminas como a polarografia e voltametria [17], fluorescência [18], quimiluminescência [19] e a cromatografia gasosa [20].

### **2.3. Formas de extração das vitaminas lipossolúveis**

A determinação das vitaminas lipossolúveis em alimentos utilizando CLAE, em geral, não é realizada diretamente, pois esta requer algumas etapas prévias como a extração do analito da matriz, muitas vezes complexa; a remoção de interferentes, que são extraídos junto com os analitos, a separação, identificação e quantificação dos compostos de interesse.

Entre os processos de extração para a remoção das vitaminas lipossolúveis de suas matrizes temos: a extração líquido-líquido, a extração sólido-líquido, a extração com fluido supercrítico e a extração em fase sólida [10].

A extração líquido-líquido (ELL) é muito comum para a extração das vitaminas lipossolúveis, pois utiliza uma grande variedade de solventes orgânicos puros ou em misturas, apresentando uma grande solubilidade dos compostos durante as análises [10]. Os equipamentos requeridos para a condução deste processo de separação são simples e, em muitos casos, os solventes utilizados são compatíveis com as fases móveis utilizadas nas análises cromatográficas [10].

A extração sólido-líquido (ESL) que é utilizada para amostra sólida ou semi-sólida, possui o papel principal de promover a separação prévia. Muitas vezes, esta etapa consiste numa simples extração com solventes orgânicos [10].

Algumas das desvantagens relacionadas com os processos convencionais como a extração líquido-líquido e a extração sólido-líquido é a utilização de grandes quantidades de solventes, tornando necessária a posterior remoção destes; podendo ocasionar problemas ambientais, aumentar o custo da análise. Ainda, a extração não é seletiva e, geralmente, outros processos subseqüentes de purificação do extrato são necessários, aumentando o tempo de extração, o que pode permitir que algumas substâncias possam se degradar devido exposição prolongada ao solvente aquecido [8].

Outra alternativa é a extração com fluido supercrítico (EFC) utilizando CO<sub>2</sub> como substância extratora [8]. Esta técnica tem se apresentado eficiente para a extração de amostras sólidas, pois o dióxido de carbono é um bom extrator de substâncias lipossolúveis em diferentes tipos de matrizes, reduzindo a quantidade de rejeitos produzidos após o processamento da amostra [10].

Deve ser ressaltado que a solubilidade de um composto em um solvente no estado supercrítico é dependente da densidade do solvente, bem como da afinidade físico-química do soluto pelo solvente [8]. Os compostos dissolvidos podem ser recuperados simplesmente pela diminuição da temperatura ou da pressão que reduzem a densidade do fluido. A densidade do fluido supercrítico é muito sensível a pequenas alterações de temperatura ou pressão quando perto da região do seu ponto crítico [8].

Assim, a extração com fluido supercrítico baseia-se no controle da solubilidade via manipulação da temperatura e pressão, a solubilidade de determinado soluto tende a aumentar com a temperatura e pressão de operação [8]. A temperatura deve ser mantida abaixo do nível em que o material a ser extraído inicia o processo de degradação térmica, enquanto o valor da pressão deve ser fixado também se levando em consideração questões econômicas como o custo da operação [8].

A extração em fase sólida (EFS) tem sido a técnica mais utilizada para a extração e purificação da amostra. Esta técnica possibilita a utilização de métodos rápidos, versáteis, seletivos e proporciona boa recuperação do analito mesmo quando este está presente em pequenas quantidades [10]. O uso da EFS tem se apresentado muito eficiente na purificação “clean-up” e na pré-concentração de vitaminas para posterior determinação cromatográfica [10].

## **2.4. Cromatografia**

Cromatografia é uma das técnicas analíticas mais poderosas e versáteis, pois em uma única análise pode-se separar uma mistura de substâncias em seus componentes individuais e simultaneamente realizar a determinação quantitativa de cada espécie química presente na amostra [21]. As amostras podem ser gasosas, líquidas ou sólidas e, dependendo de sua natureza, podem variar em complexidade de uma única substância para uma mistura [21].

Os termos “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, que em 1906, descreveu suas experiências com colunas de vidro recheadas com vários sólidos, finamente divididos, para separar componentes de extrato de folhas e gema de ovo que eram arrastados através da coluna com éter de petróleo. O nome deriva-se das palavras gregas “chrom” (cor) e “graphe” (escrever), embora hoje seja sabido que o processo não depende da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados [22]. Paralelamente aos desenvolvimentos de Tswett, Reed na Inglaterra e Day nos Estados Unidos que empregaram colunas contendo sólidos e misturas de solventes orgânicos para a

separação de sais orgânicos e amostras de petróleo [21-22]. Apesar destes estudos e de outros anteriores, que também poderiam ser considerados precursores do uso dessa técnica, a cromatografia foi praticamente ignorada até a década de 30, quando foi redescoberta. A partir daí, diversos trabalhos na área possibilitaram seu aperfeiçoamento e em conjunto com os avanços tecnológicos, levaram-na a um elevado grau de sofisticação, o qual resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas da ciência [23].

Assim, apenas em 1930 que se iniciou a época moderna da cromatografia, quando Kuhn e Lederer redescobriram e aperfeiçoaram a cromatografia em coluna. Em 1941, Martin e Synge publicaram um trabalho sobre a cromatografia por partição (cromatografia líquido-líquido), aplicaram o conceito de altura equivalente a um prato teórico e anteciparam o surgimento de duas técnicas cromatográficas, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência [21-22].

Devido a todos os estudos e avanços que ocorreram com os métodos cromatográficos, atualmente a cromatografia é definida como um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através da primeira [22]. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes da mistura é seletivamente retido na fase estacionária e redissolvido na fase móvel, resultando em migrações diferenciais que provocam a separação dos compostos presentes na amostra [22].

Compostos que apresentam alta afinidade pela coluna cromatográfica (fase estacionária) apresentarão tempo de retenção mais elevado, enquanto que aqueles que

apresentam baixa afinidade pela coluna cromatográfica serão caracterizados por um baixo tempo de retenção e serão eluídos rapidamente da coluna. E esta diferença de interação que permite que compostos químicos sejam separados utilizando a cromatografia.

Os diferentes métodos cromatográficos podem ser classificados considerando-se diversos critérios como a classificação pela forma física, pela fase móvel, pela fase estacionária e pelo modo separação do sistema cromatográfico [6].

### **2.4.1. Classificação pela forma física**

O sistema cromatográfico pode ser subdividido em cromatografia planar e cromatografia em coluna. A cromatografia planar resume-se à cromatografia em papel (CP) e cromatografia em camada delgada (CCD), enquanto que a cromatografia em coluna é dividida em vários tipos de cromatografia, classificados através da fase móvel, fase estacionária e pelo modo de separação [6].

### **2.4.2. Classificação cromatográfica pela fase móvel**

A classificação pelo tipo de fase móvel utilizada é dividida em três tipos de cromatografia: a cromatografia gasosa (CG) que utiliza como fase móvel um gás inerte, a cromatografia supercrítica (CSC) que utiliza um vapor pressurizado, acima de sua temperatura crítica, e a cromatografia líquida (CL) que apresenta uma subdivisão: cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel (líquido) é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade e a cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE) que normalmente utiliza colunas metálicas empacotadas com partículas de diâmetro menores, sendo necessário à utilização de equipamentos sofisticados para propulsão dos fluidos [6, 23].

### **2.4.3. Classificação pela fase estacionária**

Esta pode ser classificada diferenciando fases estacionárias sólidas, líquidas e quimicamente ligada. No caso da fase estacionária ser constituída por um líquido, este pode estar suportado sobre um sólido ou imobilizado sobre este [23]. A imobilização pode envolver ligações químicas entre o líquido e o suporte, ou somente entre as cadeias do próprio líquido. É comum considerar as fases estacionárias contendo líquido ativo na separação, como fases quimicamente ligadas, esta distinção justifica-se pelo fato de seu mecanismo de separação apresentar frequência diferente dos mecanismos atribuídos às fases estacionárias líquidas ou sólidas [6].

### **2.4.4. Classificação pelo modo de separação**

As separações cromatográficas ocorrem devido a processos de adsorção, partição, troca iônica, exclusão, bioafinidade ou misturas desses mecanismos:

Cromatografia por adsorção - utiliza uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida ou gasosa. O soluto é adsorvido na superfície da partícula sólida. O equilíbrio entre as duas fases justifica a separação dos diferentes solutos [6].

Cromatografia por partição - utiliza uma fase estacionária líquida que forma um filme fino na superfície de um suporte sólido e o soluto fica em equilíbrio entre a fase estacionária (líquida) e a fase móvel [6].

Cromatografia de troca iônica - utiliza ânions ou cátions ligados covalentemente ao suporte sólido, geralmente uma resina. Os íons de carga oposta do soluto são atraídos para a fase estacionária por forças eletrostáticas [6].

Cromatografia por exclusão molecular - esta técnica separa as moléculas pelo tamanho, com os solutos maiores passando por ela com maior velocidade enquanto os analitos de menor tamanho passam pelos poros da fase estacionária sendo retidos na coluna por maior intervalo de tempo. Ao contrário de outros tipos de cromatografia, não há interação atrativa entre a fase estacionária [6].

Cromatografia por bioafinidade - esta se baseia no isolamento de macromoléculas biológicas, através da utilização das propriedades dessas substâncias de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos [6].

Somente a partir da década de 1970, com o desenvolvimento tecnológico para construir bombas de alta pressão e fases estacionárias de menor diâmetro, conseguiu-se um avanço considerável na cromatografia líquida que até então era subdesenvolvida e baseava-se nos experimentos da cromatografia em coluna [6].

## **2.5.Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Através do desenvolvimento de suportes para fase estacionária com partículas de diâmetros pequenos, que foi responsável por melhores separações quando comparado com a cromatografia líquida clássica (CLC) e, com o consequente desenvolvimento de bombas de alta pressão para vencer a alta pressão hidrodinâmica gerada devido à baixa

permeabilidade da fase móvel [23] é que se passou a fazer a distinção entre CLAE e CLC.

A CLAE possui a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, com menor tempo de análise, com alta resolução cromatográfica, eficiência e detectabilidade [6]. Devido a sua versatilidade e confiabilidade, a CLAE tem sido amplamente utilizada como técnica de análise em várias áreas da ciência. As colunas analíticas mais utilizadas são de dois tipos: as de fase normal e as de fase reversa [2]. As de fase normal são polares (sílica e outros materiais) e produzem separação em fases móveis de baixa polaridade, enquanto as de fase reversa são revestidas em grau variável (de 6,0 a 18,0%) com polímeros de baixa polaridade, octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18), que propiciam melhor resposta com fases móveis polares [2].

Substâncias hidrofílicas como aminoácidos, carboidratos e pigmentos solúveis em solventes de alta polaridade, são separáveis por cromatografia de fase normal. Compostos lipofílicos como lipídios e pigmentos solúveis em solventes com baixa polaridade, podem ser separados por cromatografia de fase reversa [8].

As colunas de fase reversa principalmente a octadecilsilano (C18) são as mais utilizadas para sistemas simultâneos de separação analítica das vitaminas lipossolúveis. 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, sendo eficazes para a utilização de fases móveis de média polaridade [2].

Uma das etapas mais importantes na CLAE é a seleção da fase móvel e, para se obter os melhores resultados a escolha deve considerar as propriedades químicas e físicas, além da pureza dos solventes [24]. Ainda, fatores como a compatibilidade com o detector; viscosidade e ponto de ebulição; miscibilidade dos componentes da fase

móvel; dissolução da amostra e não decompor seus componentes, pureza do solvente e a toxicidade são fundamentais na escolha da fase móvel [24].

#### ✓ **Compatibilidade com o detector**

Um dos detectores mais utilizados na CLAE é o detector UV-Vis incluindo o de comprimento de onda fixo, o de comprimento de onda variável ou o detector por arranjo de diodos. Sendo assim, deve ser avaliada a absorbância do solvente na região UV-Vis e cuidar para que este não absorva no mesmo comprimento de onda dos componentes da amostra a serem analisados [24].

Um outro fator determinante é quanto à forma de eluição utilizada que pode ser pode ser isocrática ou por gradiente [6]. A eluição isocrática é aquela na qual a polaridade da fase móvel permanece constante durante todo o processo de separação, enquanto na eluição por gradiente a composição da fase móvel varia durante o processo de separação, de modo que a polaridade é variada gradativamente [6]. A eluição isocrática é o modo preferido de eluição devido a sua simplicidade, conveniência e repetibilidade das análises e menor custo. Além disso, comparando a eluição isocrática e a por gradiente temos que na eluição por gradiente não pode ser utilizada com alguns tipos detectores, como os de índice de refração e por condutividade elétrica. Ainda, na eluição por gradiente os ruídos da linha base são mais comuns, sendo recomendado o uso de solventes de alta pureza e rigorosamente degaseificados [6].

#### ✓ **Viscosidade e Ponto de Ebulição**

A viscosidade da fase móvel pode influenciar consideravelmente na separação cromatográfica, pois o equilíbrio na troca de massa do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária pode se desenvolver de forma mais lenta [24]. A viscosidade é uma

propriedade que afeta a queda de pressão dentro da coluna e a eficiência, pois quanto mais viscosa for a fase móvel mais será afetado o coeficiente de difusão da substância, acarretando numa perda considerável no número de pratos teóricos [25].

Uma outra variável determinante é o ponto de ebulição que está relacionado com a perda por evaporação e com a consequente possibilidade de contaminação do ambiente de trabalho e de acidentes por ignição. Solventes muito voláteis ou mesmo solventes pouco voláteis operados a altas temperaturas, podem causar fenômenos de cavitação no bombeamento, fato que acarreta perda da reprodutibilidade da vazão e, conseqüentemente, do tempo de retenção [25].

#### ✓ **Miscibilidade dos solventes**

A necessidade de se efetuar análises por gradiente ou empregando misturas de solventes, requer que eles sejam miscíveis entre si. A insolubilidade leva à formação de gotículas de solventes suspensas na saída da coluna, produzindo ruído nos detectores [25]. No sistema cromatográfico a falta de miscibilidade dos componentes da fase móvel provoca aumento da pressão do sistema [24].

Solventes parcialmente miscíveis podem ser utilizados como fase móvel, no entanto, a miscibilidade destes componentes deve ser testada em todas as proporções em que serão utilizadas para a separação ou um outro componente que facilite a solubilização dos componentes da fase móvel deve ser adicionado ao sistema [24].

Um outro caso importante é a adição de solução tampão à fase móvel que com o decorrer do tempo os componentes desta solução tendem a precipitar na própria fase móvel dificultando a separação [24]. Assim, em fases móveis em que há a necessidade da adição de solução tampão a concentração desta não deve ser muito alta e as colunas nunca devem ser guardadas antes da limpeza para retirar fases tamponadas [24].

✓ **Compatibilidade com os componentes da amostra**

A substância a ser analisada deve de preferência ser dissolvida na própria fase móvel ou em um de seus componentes para que não ocorra precipitação no injetor ou na fase estacionária e posterior queda na resolução [24].

✓ **Pureza dos solventes**

A presença de impurezas nos solventes pode interferir na separação cromatográfica, pois as impurezas presentes podem afetar a região de absorção do solvente que pode estar próximo ao comprimento de onda utilizado na detecção [24]. Um outro aspecto é que essas impurezas geralmente variam conforme o lote de fabricação, assim estas variações podem afetar a reprodutibilidade nas separações [24].

✓ **Toxicidade**

Na escolha da fase móvel, deve se levar em consideração à toxicidade e a inflamabilidade do solvente orgânico [24]. Muitos dos solventes utilizados na CLAE possuem um baixo valor de limite de toxidez e uma alta pressão de vapor sendo extremamente perigosos [25].

Atualmente existe uma tendência internacional para se buscar o desenvolvimento de metodologias analíticas que eliminem ou minimizem a utilização de solventes orgânicos e reagentes tóxicos [26]. Na cromatografia, esta tendência exige a utilização e o desenvolvimento de fases móveis que utilizem solventes de baixa toxicidade e que sejam degradáveis no meio ambiente para substituírem as fases móveis normalmente utilizadas na CLAE como acetonitrila, álcool metílico, clorofórmio, tetraidrofurano, dentre outros. Algumas informações referentes sobre a possível

toxicidade destes solventes orgânicos estão apresentadas (Tab. 2) em teste realizado com ratos.

- **Acetonitrila**

Produz vapores tóxicos quando aquecido, os vapores produzidos apresentam uma alta densidade em relação ao ar e podem se deslocar a uma distância considerável. Caso haja contato com uma fonte de ignição pode provocar a combustão do solvente. O líquido é prejudicial se ingerido, irritante para os olhos, a pele e apresenta capacidade mutagênica [27]. A inalação do vapor pode causar fadiga, náusea, diarreia e dor abdominal e, em casos severos podem ocorrer delírios, convulsões, paralisia e coma [24] além da contaminação do meio ambiente [27].

- **Álcool Metílico**

Produz vapores irritantes e inflamáveis. Apresenta capacidade mutagênica e cumulativa no organismo [27]. A inalação do vapor em altas concentrações pode causar vertigens, distúrbios digestivos e paralisia de alguns músculos além da perda da consciência e cegueira [24]. O líquido é irritante para a pele, olhos e venenoso se ingerido e em altas concentrações [27].

- **Clorofórmio**

Produz gases venenosos e irritantes quando aquecido, embora não seja um produto inflamável. O solvente na forma líquida é irritante para a pele, olhos e prejudicial se ingerido [27]. Apresenta capacidade mutagênica e carcinogênica aos seres vivos. Na forma de vapor é irritante para os olhos, nariz, garganta e se inalado pode causar dor de cabeça, náusea, tontura ou perda de consciência. Em altas concentrações pode provocar a contaminação do meio ambiente, pois é um solvente tóxico [27].

▪ **Tetraidrofurano**

Produz vapores irritantes e inflamáveis. Apresenta capacidade mutagênica e uma alta toxicidade aos organismos e ao ambiente [27]. O vapor é irritante para os olhos e ao sistema respiratório, altas concentrações têm efeito alucinógeno provocando perda de consciência [24]. O líquido é irritante para a pele, olhos e venenoso se ingerido e em altas concentrações pode haver contaminação do meio ambiente [27].

▪ **Álcool Butílico**

Produz vapores irritantes e inflamáveis. O álcool butílico é considerado como não cancerígeno e mutagênico [27]. Deve se tomar cuidado para o produto não contaminar o solo e a água, por não ser totalmente solúvel. É esperada uma rápida biodegradação no ambiente e não apresenta atividade de bioacumulação, em altas concentrações pode haver contaminação do meio ambiente [27].

**Tabela 02. Informações sobre a toxicidade de alguns solventes orgânicos em teste realizado com ratos.**

<b>Solvente</b>	<b>Via Respiração</b>	<b>Via Oral</b>	<b>Via Cutânea</b>
<b>Orgânico</b>	<b>(CL 50)</b>	<b>(DL 50)</b>	<b>(DL 50)</b>
Acetonitrila	7.500 ppm em 8 h	200 mg/kg	5.000 mg/kg
Álcool Metílico	64.000 ppm em 4 h	5.628 mg/kg	Não disponível
Clorofórmio	8.000 ppm em 4 h	300 mg/kg	Não disponível
Tetraidrofurano	60.000 ppm em 2h	3.000 mg/kg	500 mg/kg
Álcool Butílico	8.000 ppm em 4h	790 mg/kg	970 mg/kg

(CL 50 = concentração letal a 50,0%) e (DL 50 = dose letal a 50,0%)

Fonte: CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - ([www.cetesb.com.br](http://www.cetesb.com.br)); acesso em janeiro de 2007.

Na tentativa de solucionar esta deficiência dos solventes orgânicos, tem sido desenvolvida recentemente a CLAE associada a ambientes micelares, pois na cromatografia líquida micelar pode-se ter uma alta precisão na retenção dos compostos analisados, simplificando a otimização da composição da fase móvel [28]. Os modificadores orgânicos de fase móvel mais comuns são os álcoois, principalmente os que apresentam uma baixa toxicidade e são menos inflamáveis quando comparado com fases móveis tradicionais. Estes ainda apresentam características como baixo custo, baixa toxicidade, biodegradabilidade, podendo co-solubilizar compostos hidrofóbico e a hidrófilo em matrizes complexas [28].

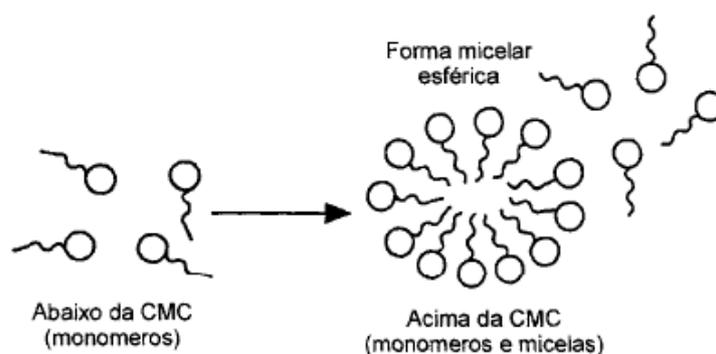
## **2.6. Surfactantes e Ambientes Micelares**

Os surfactantes (tensoativos) são moléculas anfifílicas, compostas por uma cabeça polar ou hidrofílica e uma cadeia carbônica apolar ou hidrofóbica, sendo que a cabeça pode ser carregada positiva ou negativamente, catiônica ou aniônica, respectivamente, pode ser dipolar (zwitteriônica) ou não carregada. A palavra surfactante é originada de “surface-active agent” (agente que atua na superfície), pois estes compostos apresentam a propriedade de formar filme molecular ordenado nas interfaces, reduzindo a tensão interfacial e superficial [29].

Os surfactantes são classificados de acordo com a carga do grupo polar, podendo ser catiônicos quando possuem carga positiva, aniônicos quando possuem a carga negativa, neutros quando não possuem carga e zwitteriônicos quando a carga líquida é nula em virtude destas moléculas possuírem dois grupos na cabeça polar, um positivo e outro negativo [30].

Entre os surfactantes sintéticos, os aniônicos são mais largamente produzidos, sendo os catiônicos produzidos em menor escala, uma razão para o menor uso dos surfactantes catiônicos é a sua alta toxicidade em água quando comparada com a de outros surfactantes. Os surfactantes zwitteriônicos são amplamente utilizados na fabricação de cosméticos, pois não irritam a pele e os olhos. Os surfactantes não iônicos são tão produzidos quanto os aniônicos e, geralmente, são compatíveis com outros tipos de surfactantes [30]. Além desta classificação, os surfactantes podem ser divididos em dois grandes grupos: os surfactantes sintéticos e os naturais [30].

Quando as moléculas do surfactante são dissolvidas em água em concentrações maiores que a concentração micelar crítica (CMC), elas formam as micelas. Micelas são agregados moleculares, possuindo regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais, chamados micelas [30]. Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma de monômeros e quando a concentração do surfactante está abaixo, porém próxima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas (Fig. 10).



**Figura 10. Formação do agregado micelar [30].**

A termodinâmica da formação micelar é regida por forças eletrostáticas entre as moléculas, forças de solvatação (ou da estrutura do líquido), hidrofóbicas e de tensão superficial, que determinam o melhor empacotamento das moléculas que dependem também da geometria e da estrutura do solvente, sendo a formação das micelas predominantemente um efeito entrópico [29]. Estes sistemas micelares tendem a se associar em aglomerados (Fig. 11) na forma de esferas, cilindros, lamelas entre outros.



**Figura 11. Diferentes aglomerados de sistemas micelares [29].**

Cada micela é composta por um número determinado de moléculas de surfactante, denominado número de agregação, que rege o tamanho e a geometria do sistema micelar. O termo “micela normal” é utilizado para se referir aos agregados de surfactantes em meio aquoso, isto indica que a cabeça hidrofílica está direcionada para a solução aquosa formando uma superfície polar, enquanto que a cadeia linear (cauda) está em sentido inverso ao da água, formando um núcleo central não polar [30].

A formação de associações de colóides pode também ocorrer em vários solventes não-polares; neste caso, os agregados dos surfactantes são denominados “micelas reversas” ou “micelas invertidas”. Nos sistemas de micelas reversas, as cabeças polares anfílicas estão concentradas no interior do agregado e por esta razão formam um núcleo central hidrofílico [30].

Uma propriedade importante das micelas é o seu poder de solubilizar os mais variados solutos ou espécies pouco solúveis. A quantidade de soluto solubilizada é, em geral, diretamente proporcional à concentração do surfactante, desde que a concentração

do surfactante seja igual ou superior que a CMC e que existam várias possibilidades de solubilização no sistema da micela [30]. As micelas são termodinamicamente estáveis e facilmente reprodutíveis e são destruídas pela diluição com água quando a concentração do surfactante fica abaixo da CMC [30].

Nas últimas décadas, o uso de surfactantes teve um aumento significativo em praticamente todos os campos da química analítica onde são frequentemente empregados para modificar o meio reacional permitindo solubilizar espécies polares e de baixa polaridade ou promover um novo meio que altere a velocidade reacional. Estes compostos também podem propiciar um aumento de sensibilidade e seletividade em um grande número de reações [30]. Outros fatores positivos dos surfactantes é que podem ser adicionados ou substituir os solventes orgânicos e serem biodegradáveis o que os inclui no conceito da “Química Limpa”.

## **2.7. Química Limpa**

Química limpa ou química verde pode ser definida como desenvolvimento e implementação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente [31]. Esta idéia, ética e politicamente poderosa, representa a suposição de que processos químicos que geram problemas ambientais possam ser substituídos por alternativas menos poluentes ou não poluentes [31]. Tecnologia limpa, prevenção primária, redução na fonte, química ambientalmente benigna, ou ainda “green chemistry”, são termos que surgiram para definir esta importante idéia. “Green Chemistry”, o termo mais utilizado atualmente, foi

adotado pela IUPAC, pois visa o desenvolvimento auto-sustentável aliado à redução do impacto da atividade química ao meio ambiente [31].

A filosofia da Química Limpa está baseada atualmente em doze princípios, sendo estes:

- 1. Prevenção** – evitar a produção do resíduo é melhor do que tratá-lo ou “limpá-lo” após sua geração [31-32].
- 2. Economia de Átomos** - deve-se procurar desenvolver metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final [31-32].
- 3. Síntese de Produtos Menos Perigosos** - sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente [31-32].
- 4. Desenvolvimento de Produtos Seguros** - os produtos químicos devem ser desenvolvidos de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos [31-32].
- 5. Solventes e Auxiliares mais Seguros** - o uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes e entre outros) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas [31-32].
- 6. Busca pela Eficiência de Energia** - a utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes [31-32].
- 7. Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima** - sempre que a técnica possibilitar e for economicamente viável, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não renováveis [31-32].

**8. Evitar a Formação de Derivados** - a derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção, desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos [31-32].

**9. Catálise** - reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos [31-32].

**10. Planejamento para a Degradação** - os produtos químicos precisam ser desenvolvidos de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente [31-32].

**11. Prevenção da Poluição** - desenvolvimento de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas [31-32].

**12. Prevenção de Acidentes** - as substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios [31-32].

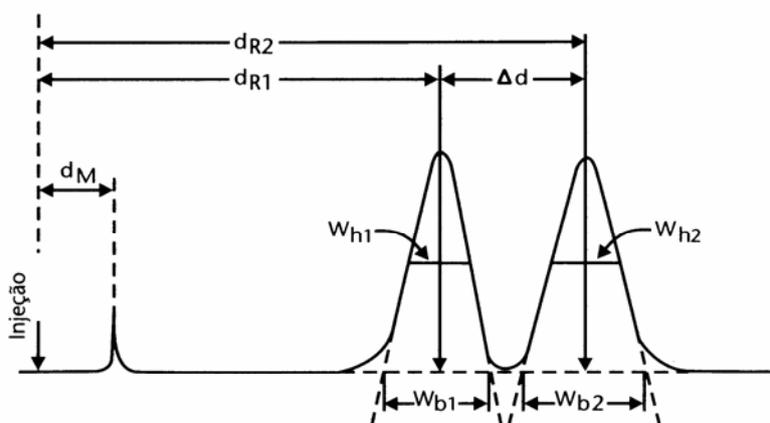
Cada vez que conseguimos cumprir com alguns dos quesitos da Química Limpa, estamos caminhando para uma utilização mais consciente dos nossos recursos naturais e para a manutenção da vida no planeta [32].

## **2.8. Parâmetros Cromatográficos**

Os parâmetros cromatográficos são utilizados para comprovar a eficiência de uma separação, estes parâmetros são obtidos a partir de um cromatograma (Fig.12) e são calculados para os picos mais retidos [24].

Para avaliar a força cromatográfica da fase móvel, ou seja, sua capacidade de separação dos componentes de uma mistura, os parâmetros cromatográficos que podem ser analisados são:

**Resolução** – é calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da média das larguras de suas respectivas bases, ou seja, para a medida da largura da base toma-se sempre à distância entre as tangentes traçadas nas laterais do pico (Fig.12) [6].



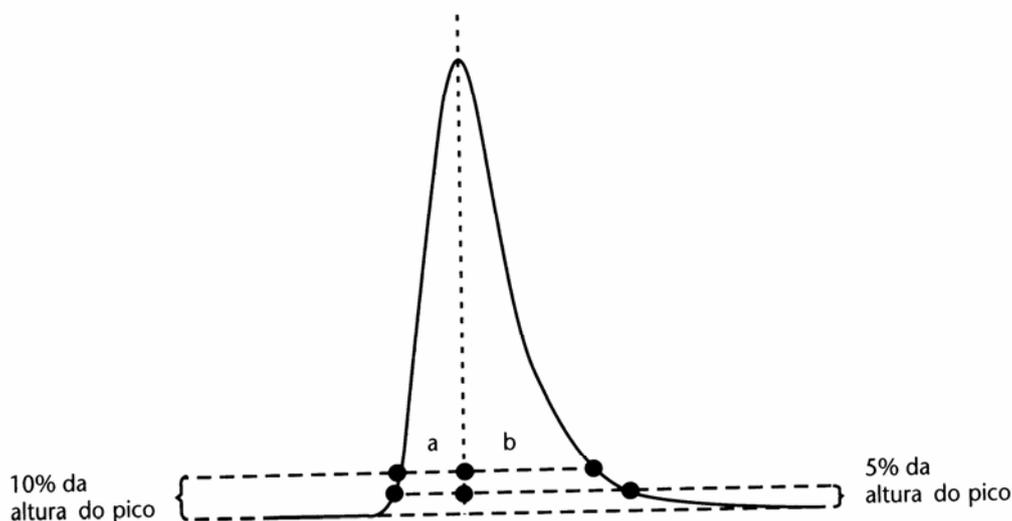
**Figura 12.** Medidas relacionadas à determinação da resolução [6].

A resolução é um termo sem unidades, o que implica na necessidade de utilizar sempre as mesmas unidades para as distâncias (tempos) de retenção e para as larguras de base [6], assim temos:

$$Rs = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b2} + w_{b1})}$$

A resolução entre dois picos depende das características de retenção de cada componente, a capacidade da fase estacionária reter seletivamente cada componente e também da eficiência da coluna (N). Para fins quantitativos, a resolução mínima requerida é de 1,5 para todos os picos de interesse [24].

**Simetria dos picos** – o fator de assimetria,  $A_s$ , é normalmente calculado a 10,0% da altura do pico; e o fator de alargamento,  $TF$ , é calculado a 5,0% de sua altura (Fig.13) [6].



**Figura 13.** Medidas relacionadas ao cálculo do fator de assimetria e fator de alargamento [6].

Assim temos que  $A_s$  e  $TF$  são calculados da seguinte forma:

$$A_s = \frac{b}{a}$$

$$TF = \frac{(a + b)}{2a}$$

Picos com uma baixa simetria podem resultar em (a) análises quantitativas imprecisas; (b) menor resolução e bandas menores não detectadas na cauda de outro pico e (c) problemas com reprodutibilidade na retenção [24].

**Fator de retenção** – também conhecido como fator de capacidade, que corresponde à máxima quantidade a ser injetada. Este fator é determinado pela razão das quantidades das suas moléculas que ficam retidas na fase estacionária ( $n_s$ ) ou

percorrendo a coluna na fase móvel ( $n_M$ )[6]. O fator de retenção também é relacionado à razão dos tempos que as moléculas ficam na fase estacionária e na fase móvel [6]. Esse termo é calculado por:

$$k = \frac{n_S}{n_M} = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

Este parâmetro é importante para avaliar o tempo de retenção de um pico no sistema cromatográfico em relação ao tempo de retenção de um composto não retido no processo cromatográfico ( $t_M$ ), valores pequenos de  $k$  indicam que o soluto é pouco retido na fase estacionária [24].

**Constante de distribuição** – está relacionado à distribuição do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel, onde  $C_{FE}$  é a concentração do soluto na fase estacionária e  $C_{FM}$  é a concentração do soluto na fase móvel [24], assim temos:

$$K = \frac{C_{FE}}{C_{FM}}$$

Os fatores que influenciam a constante de distribuição ( $K$ ) de um soluto no sistema cromatográfico são: (a) forças intermoleculares entre o soluto e as fases móvel e estacionária; (b) composição e propriedade da fase móvel; (c) tipo e propriedades da fase estacionária e (d) temperatura [24].

**Eficiência da coluna** – a eficiência representada por um cromatograma é medida em termos do número de pratos ( $N$ ) gerados. Um prato pode ser considerado equivalente a uma etapa de equilíbrio entre as duas fases, quanto maior o número de pratos mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência e, portanto melhor a separação [6]. Assim temos a seguinte equação:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2$$

O número de pratos obtidos pode ser afetado por vários fatores, incluindo as condições de análise, o tamanho da amostra, o tipo de soluto e principalmente o comprimento da coluna, fato que torna difícil uma comparação do número de pratos entre diferentes colunas. Por isso, que a avaliação comparativa entre colunas é feita utilizando a medida da altura equivalente da coluna ( $L$ ) e o número de pratos, eliminando a influência dos diferentes comprimentos da coluna [6]. O valor da altura equivalente a um prato ( $H$ ) é dado por:

$$H = \frac{L}{N}$$

A finalidade mais importante de qualquer separação cromatográfica é o de considerar os parâmetros experimentais que influenciam a resolução. Desta forma, uma má eficiência e seletividade resultam em uma má resolução. Já quando a seletividade é boa, pode-se compensar a má eficiência, obtendo uma boa resolução. O ideal é uma boa resolução conquistada com boa eficiência e seletividade [6].

## 2.9. Planejamento fatorial

O planejamento fatorial permite avaliar simultaneamente a influência de uma ou mais variáveis sobre um determinado sistema em estudo. Este é estabelecido a partir de fatores e níveis pré-determinados pelo experimentador, atribuindo  $k$  fatores e  $n$  níveis e fazendo-se experimentos cujo número total deve contemplar todas as combinações possíveis entre os níveis e fatores [24].

Nos planejamentos temos os níveis superiores e inferiores, os quais podem ser quantitativos ou qualitativos. Normalmente, atribui-se para o nível superior o sinal (+) e para o nível inferior o sinal de (-) [24].

Por exemplo, em um experimento que possui dois fatores e dois níveis pode ser definido como um planejamento fatorial  $2^2$  e o estabelecimento de todas as combinações possíveis nos fornecerão quatro ensaios diferentes (Tab. 03). No caso deste tipo de planejamento teremos os efeitos principais representados por  $k_1$  e  $k_2$  e o efeito de interação entre  $k_1k_2$  que permitirá otimizar cada variável e calcular a interação entre elas, ou seja, neste tipo de experimento pode-se avaliar o efeito do concomitante o que ajuda no processo de otimização e no entendimento dos processos químicos envolvidos [24].

**Tabela 03. Combinação dos ensaios de um planejamento fatorial  $2^2$  [24].**

Ensaio	$k_1$	$k_2$
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

Adicionando-se mais um fator ao planejamento fatorial  $k_3$ , tem-se o planejamento fatorial  $2^3$ . Assim o planejamento fatorial completo passará a requerer a realização de oito ensaios (Tab. 04). No caso de um planejamento fatorial  $2^3$ , além dos efeitos principais  $k_1$ ,  $k_2$  e  $k_3$  tem-se os efeitos de interação de dois fatores  $k_1k_2$ ,  $k_1k_3$  e  $k_2k_3$  e o efeito de interação de três fatores  $k_1k_2k_3$  [24].

**Tabela 04. Combinação dos ensaios de um planejamento fatorial  $2^3$  [24].**

Ensaio	k1	k2	k3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Considerando as características dos métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência que utilizam solventes orgânicos como fase móvel e as características dos ambientes micelares, pode-se prever que a exploração da CLAE associada a ambientes micelares pode dar origem a métodos cromatográficos que utilizem reagentes de baixa toxicidade como fase móvel. Neste trabalho específico, será priorizado o desenvolvimento de método analítico para a determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos, complexo vitamínico e similares, sempre utilizando como fase estacionária uma coluna cromatográfica C18 que será temporariamente modificada, durante a análise química, pelos constituintes da própria fase móvel, o que poderá ampliar as possibilidades de aplicação da estratégia e possibilitar o desenvolvimento de métodos analíticos limpos explorando a CLAE. Deve ser enfatizado que a otimização da fase móvel será feita utilizando-se planejamento fatorial.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Desenvolver método cromatográfico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associada a fases móveis de baixa toxicidade explorando ambientes micelares. Visualiza-se o desenvolvimento de método analítico seletivo, sensível, robusto, simples, apresentando alta frequência analítica e que possa ser classificado como limpo, visto que os reagentes utilizados apresentam baixo grau de toxicidade. Será utilizada a coluna cromatográfica C18 em todos os procedimentos, pois esta é a coluna mais utilizada em laboratórios de cromatografia dedicados a análise de rotina.

#### **3.2. Objetivo Específico**

Desenvolver método cromatográfico limpo utilizando CLAE para determinar as vitaminas lipossolúveis A, D3, E, K1 em amostras de alimento, complexos vitamínicos e similares.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Reagentes e Soluções

#### 4.1.1. Reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico e água desionizada foi utilizada no preparo das soluções aquosas. Como fase móvel foram utilizados soluções contendo  $\text{CH}_3\text{OH}$  (metanol-grau HPLC/SPECTRO),  $\text{CH}_3\text{CN}$  (acetonitrila-grau HPLC/SPECTRO),  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (álcool etílico),  $\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$  (álcool butílico),  $\text{C}_6\text{H}_{14}$  (hexano), Triton X-100 (polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol), CTAB (brometo de cetiltrimetil amônio), SDBS (dodecil benzeno sulfonato de sódio), SDS (dodecil sulfato de sódio), KOH (hidróxido de potássio),  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  (ácido ascórbico),  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$  (trietanolamina),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (fosfato dibásico de sódio anidro) e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (cloreto de amônio) em diferentes concentrações e composições.

Para o preparo das soluções padrão das vitaminas lipossolúveis A (acetato de retinol) e E ( $\alpha$ -acetato de tocoferol) foram utilizados reativos da Merck, enquanto que para as vitaminas D3 (colecalfiferol) e vitamina K1 (filoquinone) as soluções padrão foram preparadas a partir de purificação de preparações farmacêuticas.

### 4.1.2. Soluções

Soluções padrão das vitaminas A, E, D3 e K1 foram preparadas dissolvendo-se os respectivos reativos em álcool etílico absoluto. Desta forma, foram preparadas soluções padrão das vitaminas lipossolúveis A, D3, E, K1 nas concentrações de 40,0; 11,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente. As vitaminas A e E apresentaram uma concentração maior, pois estas são provenientes da amostra padrão, o que possibilitou uma concentração maior além disso estas duas vitaminas são bastante viscosas. Já as vitaminas D3 e K1 são provenientes de preparações farmacêuticas que apresentam uma concentração menor em relação ao padrão, além disso, o volume de álcool etílico utilizado foi o mesmo para todas as vitaminas o que fez com que estas apresentassem uma concentração mais baixa.

Após a solubilização das vitaminas, as soluções foram filtradas através de membrana millipore 0,45 µm com auxílio de vácuo, sendo armazenadas em temperatura abaixo de 0° C.

As soluções das fases móveis utilizadas foram preparadas diariamente adicionando as percentagens estabelecidas de cada reagente (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH, SDS, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e NH<sub>4</sub>Cl ) conforme a composição de cada fase móvel em 100,0 mL de água desionizada, ou seja, para uma fase móvel contendo 12,0% (v/v) de álcool butílico, 2,20% (m/v) de SDS, 0,02 mol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e pH 7,00 foi preparada pela dissolução de 12,00 mL de álcool butílico em aproximadamente 60,00 mL de água desionizada, após foi acrescentado a solução 2,20 g de SDS e 0,280 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mantendo o sistema sob agitação para a homogeneização da solução. Com a solução homogeneizada foi realizado o ajuste do pH para 7,00 com NaOH ou HCl mantendo sempre o sistema sob agitação. Na seqüência o volume foi completado para 100,0 mL

em balão volumétrico, sendo as soluções filtradas através de membrana millipore 0,45 µm com auxílio de vácuo e mantidas a temperatura ambiente. Todas as demais fases móveis utilizadas neste trabalho foram preparadas seguindo-se estas mesmas etapas; apenas modificando as percentagens de cada reagente.

Soluções dos surfactantes: CTAB (brometo de cetiltrimetil amônio) 0,50 % (m/v) e SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,50 % (m/v) foram preparadas pela dissolução de 0,500 g dos surfactantes em 100,0 mL de água desionizada, SDBS (dodecil benzeno sulfonato de sódio) 0,50 % (v/v) e Triton X-100 (polioxietileno (9-10) p-tercetil fenol) 0,50 % (v/v) foram preparadas pela dissolução de 0,50 mL dos surfactantes em 100,0 mL de água desionizada.

## **4.2. Equipamentos e acessórios**

### **4.2.1. Espectrofotômetro**

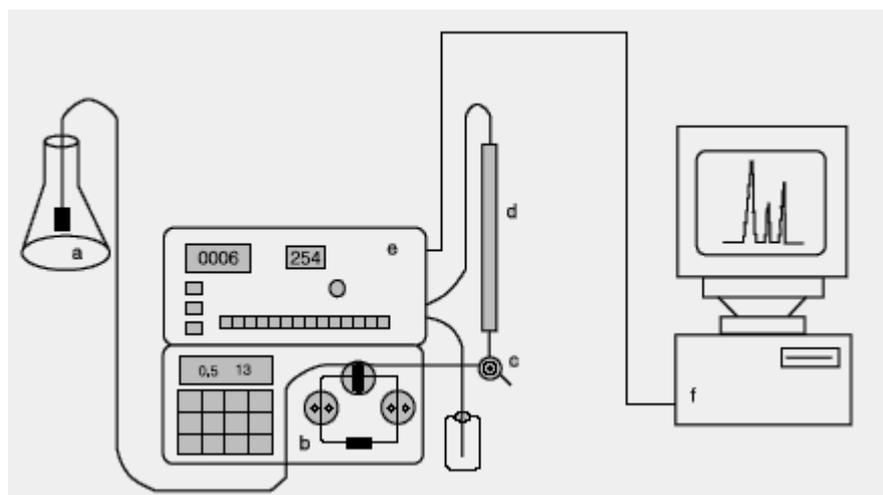
Para a obtenção de espectros de UV-Vis das diferentes espécies químicas foi utilizado um espectrofotômetro de varredura marca Varian modelo Cary -50.

### **4.2.2. Cromatógrafo**

Para a obtenção dos cromatogramas, foi utilizada uma Estação de Trabalho Cromatográfica Star (Fig.14) com programa de gerenciamento Varian Instrumentos contendo:

- bomba de pistão recíprocante com três vias, modelo 240 série 00752;
- injetor automático Varian (Auto Sample ProStar 410) com alça de amostragem de 100  $\mu\text{L}$ ;
- coluna cromatográfica C18 (microsorb 250 x 4,6 mm com partículas de 5  $\mu\text{m}$ );
- detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodos modelo ProStar 350 com programa Polyview e Aurora.

Os sinais dos compostos eluídos da coluna cromatográfica foram monitorados em 230, 280 e 300 nm para todas as vitaminas. A aquisição de dados foi feita utilizando um microcomputador com programa de aquisição de dados da Varian.



**Figura 14. Cromatógrafo líquido de alta eficiência:** (a) reservatório da fase móvel, (b) bomba de alta pressão, (c) válvula de injeção, (d) coluna cromatográfica, (e) detector e (f) microcomputador. (Fonte: [23]).

Demais materiais e vidrarias utilizados são de uso comum em laboratórios de Química Analítica.

### **4.3. Métodos**

#### **4.3.1. Espectros UV-Vis**

A primeira etapa do trabalho consistiu em obter os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta e visível para as vitaminas lipossolúveis objetivando verificar a região de absorção de cada vitamina, o grau de pureza e as possibilidades de monitoramento dos sinais cromatográficos.

Na etapa seguinte foi realizada a escolha do agente surfactante mais adequado para ser utilizado como componente da fase móvel através da realização de espectros na região do UV-Vis de soluções contendo diferentes agentes surfactantes (Triton X-100 - surfactante não iônico, CTAB - surfactante catiônico, SDBS e SDS - ambos surfactantes aniônicos).

#### **4.3.2. Testes preliminares**

Diversas soluções contendo reagentes como: álcool etílico, álcool butílico, SDS,  $N(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  em diferentes concentrações e composições foram testadas como fase móvel objetivando verificar aquelas que poderiam apresentar maior eficiência de separação das vitaminas para possibilitar que, na seqüência, experimentos sistemáticos pudessem ser planejados. Deve ser ressaltado que nesta fase parâmetros como pH, vazão e composição das diferentes fases móveis foram investigados.

### 4.3.3. Planejamento fatorial para otimização do método cromatográfico para determinação das vitaminas lipossolúveis

Após os estudos preliminares, foi realizada a otimização dos parâmetros experimentais utilizando-se planejamento fatorial  $2^3$  (Tab. 05). Nesta fase as variáveis selecionadas foram: concentração de álcool butílico, concentração de SDS e vazão.

**Tabela 05. Fatores utilizados no planejamento fatorial  $2^3$  para a separação das vitaminas lipossolúveis\*.**

Ensaio	Álcool butílico	SDS	Vazão
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

\*Dados obtidos para uma concentração de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  de 0,02mol/L e pH=7,00. Níveis: álcool butílico (- corresponde à solução contendo 10,0% (v/v) e + a solução contendo 15,0% (v/v) ); SDS (- corresponde a solução contendo 1,50 % (m/v) e + a solução contendo 3,00 % (m/v); vazão (- corresponde a vazão de 1,0 mL/min e + a vazão de 2,0 mL/min).

#### 4.3.4. Método Convencional

As principais características do método analítico limpo para determinação das vitaminas lipossolúveis foram comparadas com o método cromatográfico convencional que utiliza coluna cromatográfica C18, detector de arranjo de diodos com medidas em 280 nm e como fase móvel gradiente de dois solventes (solução A: acetonitrila; solução B: álcool metílico) [4].

O gradiente de eluição foi conduzido iniciando-se com 50,0% (v/v) de álcool metílico e 50,0% (v/v) de acetonitrila chegando-se em 25,0 min com a composição da fase móvel sendo constituída por 30,0% (v/v) de álcool metílico e 70,0% (v/v) de acetonitrila, a vazão constante de 1,3 mL/min e com um volume de injeção de amostra de 20,0 µL a temperatura ambiente [4].

Além deste método convencional existem outros que demonstram a possibilidade de determinação das vitaminas lipossolúveis dentre estes métodos temos:

O método que utiliza coluna cromatográfica C18, detector de arranjo de diodos com medidas em 285 nm, fase móvel álcool metílico e acetonitrila (95:5 (v/v)), associado a uma vazão de 2,0 mL/min, com um volume de injeção de amostra de 20,0 µL a temperatura ambiente [33].

Outro método utiliza também coluna cromatográfica C18, detector de arranjo de diodos com medidas em 292 e 325 nm, fase móvel álcool metílico, associada a uma vazão de 1,0 mL/min a temperatura de 50,0°C [34].

Um outro método utiliza coluna cromatográfica C18, detector de arranjo de diodos com medidas em 245, fase móvel constituída por álcool metílico e álcool etílico (85:15 v/v) com 0,10% de trietilamina associado a uma vazão de 1,0 mL/min, com um volume de injeção de amostra de 20,0 µL a temperatura ambiente [35].

Uma outra forma de análise consiste na utilização de uma coluna Nucleosil C18, detector de fluorescência, fase móvel acetonitrila, álcool metílico e diclorometano (50:45:5 v/v/v), associada a uma vazão de 0,7 mL/min e com um volume de injeção de amostra de 50,0 µL [36].

Além destes métodos de determinação citados, existe grande variedade de formas de análise e de fases móveis utilizadas, no entanto a grande maioria utiliza solventes orgânicos potencialmente tóxicos e com um alto custo de análise.

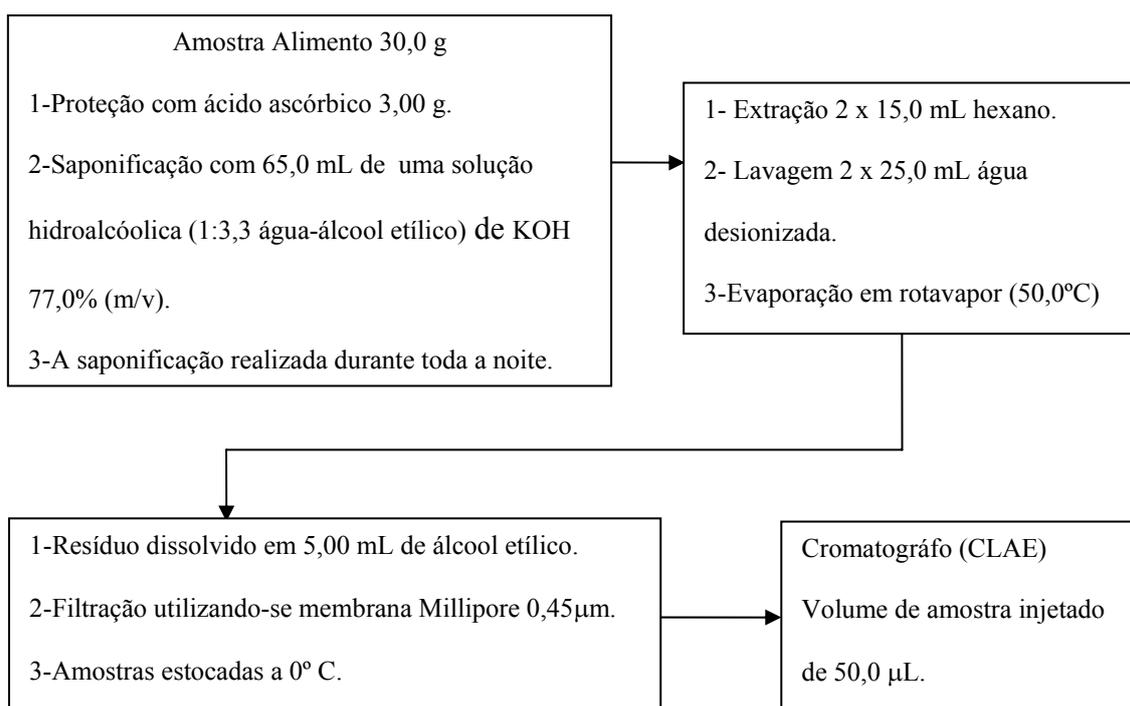
## **4.4. Aplicações**

### **4.4.1. Extração das vitaminas lipossolúveis (A, D3, E e K1) de alimentos**

Amostras de leite fortificado, leite em pó integral, óleo de soja e repolho (supermercado), foram pesadas *ca* 30,0 g em um béquer. A amostra de repolho foi previamente lavada, cortada em pequenos pedaços e macerada antes da etapa de pesagem.

As amostras foram transferidas para um erlemneyer de 125,0 mL, sendo adicionadas 3,00 g de ácido ascórbico, para evitar a oxidação das vitaminas, e 65,0 mL de uma solução hidroalcoólica (1:3,3 água-álcool etílico) de hidróxido de potássio (KOH) 77,0% (m/v). As amostras foram mantidas sob agitação durante 60,0 min, sendo que o processo de saponificação foi realizado durante toda a noite, a temperatura ambiente e na ausência de luz [37].

Após este processo, as amostras foram filtradas através de papel de filtro e posteriormente colocadas num funil de separação juntamente com 15,0 mL de hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) para extrair as vitaminas, sendo este processo repetido por duas vezes. Após, a fase hexânica foi colocada em funil de separação juntamente com 25,0 mL de água desionizada, sendo repetido este procedimento por duas vezes. Na seqüência, a fase hexânica foi evaporada em rotavapor em aproximadamente 50,0°C, e o resíduo foi dissolvido em 5,00 mL de álcool etílico. Esta solução final foi filtrada através de membrana Millipore 0,45 µm e em seguida 50,0 µL desta solução foi injetada no cromatógrafo [37]. Todas as fases necessárias para extrair as vitaminas podem ser resumidas através de um diagrama (Fig. 15)



**Figura 15. Esquema da extração das vitaminas lipossolúveis das amostras de alimentos e complexos vitamínicos** (Fonte: [37]).

#### **4.4.2. Extração das vitaminas lipossolúveis (A, D3, E e K1) dos complexos vitamínicos**

Os complexos vitamínicos na forma de ampola e cápsulas foram juntados e pesados *ca* 3,00 g, sendo adicionado 0,50 g de ácido ascórbico e 15,0 mL de solução solução hidroalcoólica (1:3,3 água-álcool etílico) de hidróxido de potássio (KOH) 77,0% (m/v). A amostra foi mantida em agitação durante 60,0 min, sendo que o processo de saponificação foi realizado durante toda à noite, a temperatura ambiente e na ausência de luz [37].

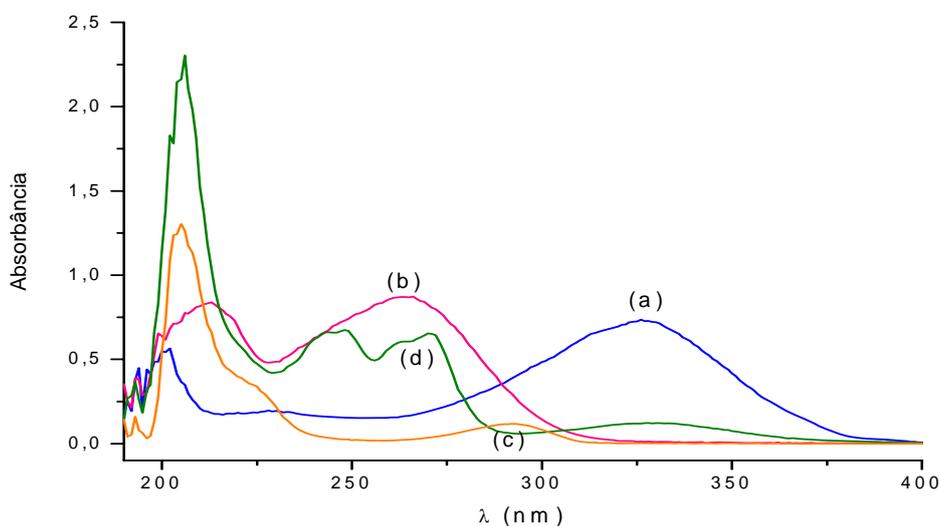
Após este processo de saponificação a amostra foi transferida para um funil de separação juntamente com 5,00 mL de hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) para extrair as vitaminas, sendo este processo repetido por duas vezes. Após, em um funil de separação foi colocado à fase hexânica obtido no processo de separação e foram adicionados 15,0 mL de água desionizada, sendo repetido este processo por duas vezes. A fase hexânica foi evaporada em rotavapor em aproximadamente 50,0°C e o resíduo foi dissolvido em 5,00 mL de álcool etílico conforme (Fig. 15). Esta solução final foi filtrada através de membrana Millipore 0,45 µm e em seguida foi injetada 50,0 µL no cromatógrafo [37].

Uma outra forma de extração utilizada consistiu na dissolução do complexo vitamínico em apenas álcool etílico, mas precisamente, 3,00 g de complexo vitamínico foi dissolvido em 25,0 mL de álcool etílico. Após esta solução foi condicionada a temperatura abaixo de 0° C para que o óleo não dissolvido na solução precipitasse e fosse retirado da solução. Esta solução final foi filtrada utilizando-se membrana Millipore 0,45 µm e em seguida foi injetada 50,0 µL no cromatógrafo.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Espectros de UV-Vis

Para a caracterização das vitaminas lipossolúveis foram obtidos espectros de radiação eletromagnética nas regiões do ultravioleta e visível. Os espectros das vitaminas lipossolúveis (A, D3, E, K1) mostram que estas moléculas absorvem fortemente radiação eletromagnética na região do ultravioleta (Fig. 16), sendo muito difícil proceder à determinação destes compostos sem uma separação prévia devido à interferência espectral, uma vez que, as vitaminas A, D3, E, K1 apresentam máximo de absorção na região de 325; 265; 290 e 250 nm, respectivamente e espectro na forma de bandas muito largas, ocorrendo sobreposição dos espectros.



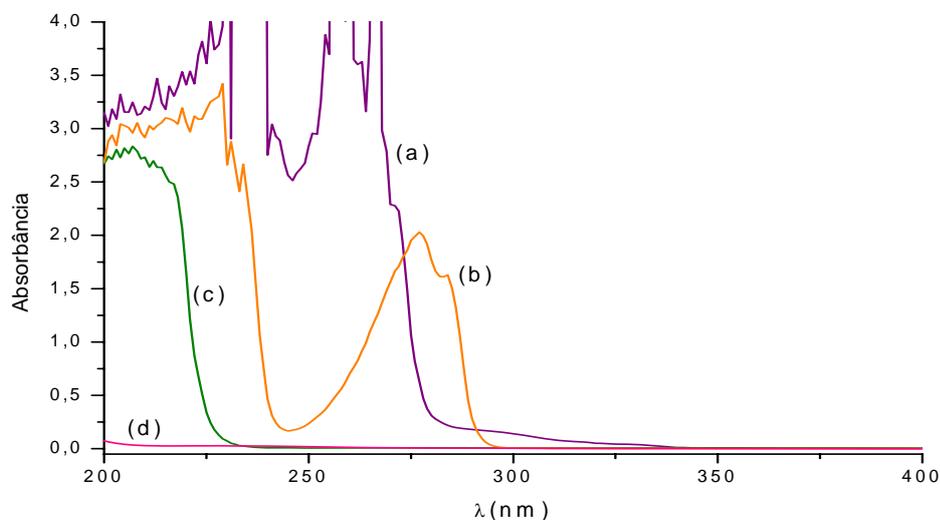
**Figura 16.** Espectro eletrônico das vitaminas lipossolúveis em solução de álcool etílico. (a) Vitamina A, (b) Vitamina D3, (c) Vitamina E, (d) Vitamina K1; (C = 5,0 mg/L).

Analisando o espectro eletrônico de cada vitamina, pode-se verificar que a análise das vitaminas está sujeita a uma série de erros, pouco frequentes em outras substâncias, inclusive pela facilidade de isomerização destes compostos que conduz à perda total ou parcial do valor vitamínico em condições extremas de pH, temperaturas elevadas e alto poder de oxi-redução, fatores que devem ser considerados pelos métodos analíticos [2]. Entre os métodos químicos de identificação e quantificação, os de maior eficiência envolvem a separação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência através da fase normal ou reversa, as quais são acoplados detectores espectrofotométrico com arranjo de diodos ou de fluorescência [2].

A CLAE é o método mais adequado para determinação destas espécies químicas, pois promove a separação das vitaminas antes da etapa de detecção evitando interferências espectrais e permite que seja efetuada a determinação de compostos não voláteis e solúveis na fase móvel.

Após a escolha da técnica analítica que seria utilizada, foram realizadas medidas dos espectros eletromagnéticos na região do ultravioleta (Fig. 17) dos surfactantes, pois o método escolhido estaria associado a ambientes micelares.

A utilização de soluções dos surfactantes Triton X-100 (surfactante não iônico), CTAB (surfactante catiônico) e SDBS (surfactante aniônico) foram descartadas devido ao intenso espalhamento de luz que estes compostos provocavam na região do ultravioleta (Fig. 17), o que impossibilitava qualquer determinação analítica das vitaminas em estudo, já que estas vitaminas também apresentam absorção de radiação eletromagnética nesta mesma região do espectro. Desta forma, por exclusão, o surfactante SDS (surfactante aniônico), foi escolhido como agente modificador da fase móvel e da fase estacionária, por apresentar uma baixa absorção na região do ultravioleta.

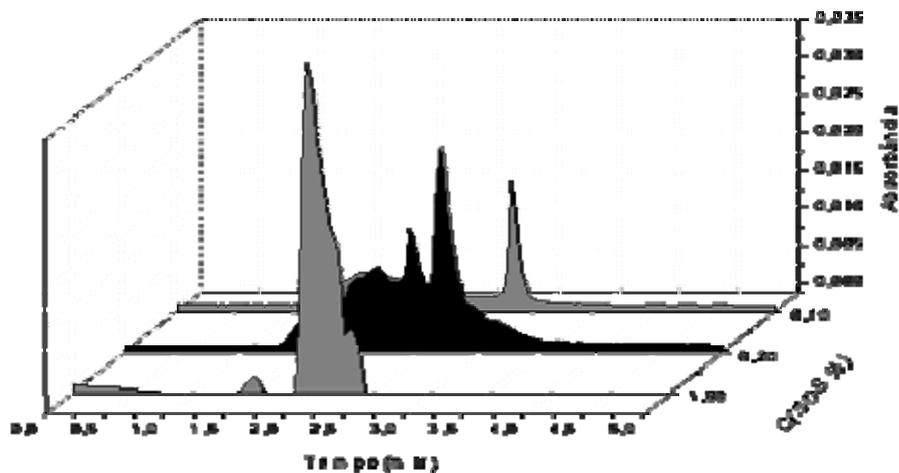


**Figura 17. Espectro eletrônico da mistura dos surfactantes:** (a) SDBS, (b) Triton X-100 (C=0,5% (v/v)), (c) CTAB, (d) SDS (C = 0,5% (m/v)).

## 5.2. Determinação de vitaminas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em ambientes micelares

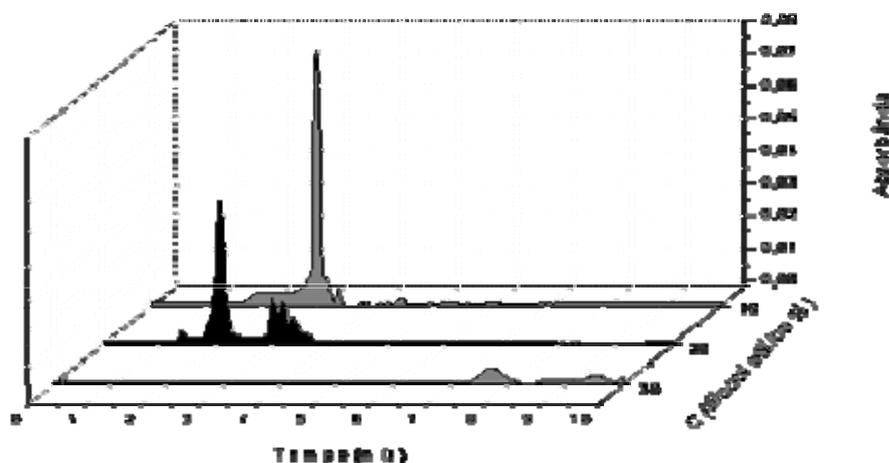
### 5.2.1. Testes preliminares

Estudos preliminares demonstraram não ser possível conduzir a separação cromatográfica das vitaminas lipossolúveis utilizando-se apenas solução aquosa com diferentes percentagens do agente surfactante SDS (Fig. 18) principalmente devido à baixa afinidade que vitaminas apresentaram pela fase móvel, fato que promoveu a eluição de apenas parte das vitaminas em estudo, não promovendo a separação das vitaminas lipossolúveis de uma forma efetiva e apresentando baixos valores de resolução cromatográfica, impedindo que medidas quantitativas fossem realizadas.



**Figura 18.** Efeito da utilização de soluções aquosas do surfactante SDS na separação das vitaminas lipossolúveis. Dados obtidos para concentrações das vitaminas A, D3, E, K1 de 40,0; 11,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente. Volume de solução padrão injetado de 20,0  $\mu$ L com fase móvel contendo SDS nas concentrações de 0,10; 0,20 e 1,00% (m/v), sob vazão de 1,0 mL/min e pH 7,00 .

Considerando que soluções de SDS em meio aquoso não possibilitaram a separação das vitaminas, soluções de álcool etílico foram testadas como fase móvel objetivando melhorar a interação desta com as vitaminas lipossolúveis. Quando foram utilizadas como fase móvel soluções aquosas contendo 10,0; 20,0 e 30,0% (v/v) de álcool etílico, sem a presença de surfactante, foi verificado que apenas parte das vitaminas apresentaram afinidade pela fase móvel, sendo eluídas rapidamente da coluna cromatográfica, enquanto que a maior parte das vitaminas não podiam ser eluídas quando da utilização destas fases móveis devido à baixa afinidade pelo solvente e alta afinidade pela fase estacionária (Fig. 19), não possibilitando a separação conjunta das quatro vitaminas lipossolúveis de uma forma efetiva e com boas resoluções cromatográficas.

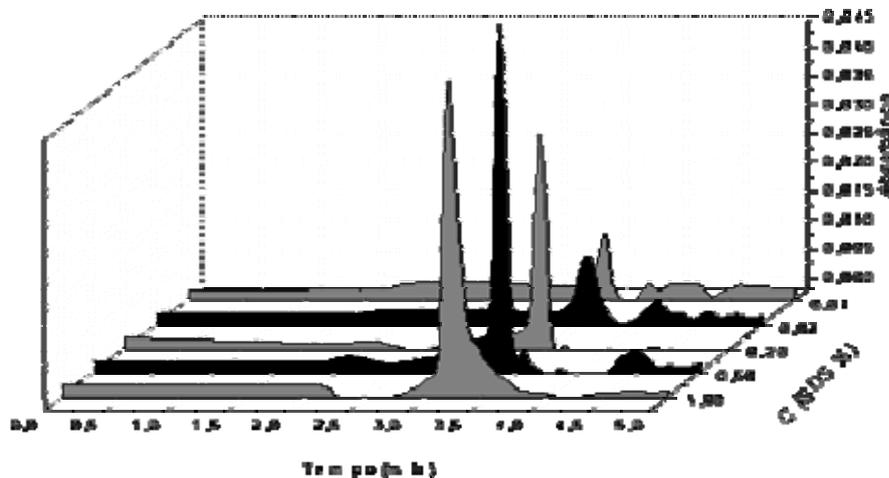


**Figura 19.** Efeito da utilização de soluções aquosas de álcool etílico na separação das vitaminas lipossolúveis. Dados obtidos para concentrações das vitaminas A, D3, E, K1 de 40,0; 11,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente. Volume de solução padrão injetado de 20,0  $\mu$ L com fase móvel contendo álcool etílico nas concentrações de 10,0; 20,0 e 30,0% (v/v), sob vazão de 0,8 mL/min e pH 7,00.

Com o objetivo de ajustar a polaridade da fase móvel para que esta apresentasse afinidade média para todas as vitaminas permitindo que houvesse interação efetiva e reversível com a fase estacionária, o que conseqüentemente, possibilitaria a completa eluição dos compostos em estudo em diferentes tempos de retenção e com resolução cromatográfica adequada para fins analíticos, foi utilizado como fase móvel uma solução aquosa contendo álcool etílico 20,0 % (v/v) com percentagens variadas de SDS.

Embora possa ser verificada uma melhora na interação das vitaminas com as fases móvel e estacionária (Fig. 20), fato evidenciado pelo perfil dos picos cromatográficos, os resultados obtidos nesta nova condição não podem ser considerados satisfatórios, pois apenas parte das vitaminas foram eluídas da coluna cromatográfica. Contudo, este experimento preliminar (Fig. 20) indica claramente que a concentração do surfactante é importante no processo de separação, pois ocorre aumento da área do pico em função da concentração de SDS, mesmo não sendo possível obter resoluções cromatográficas que permitissem a utilização dos dados para fins analíticos, devido à

rápida coeluição de apenas parte dos compostos, devido ainda, a deficiente afinidade das vitaminas pela fase móvel.

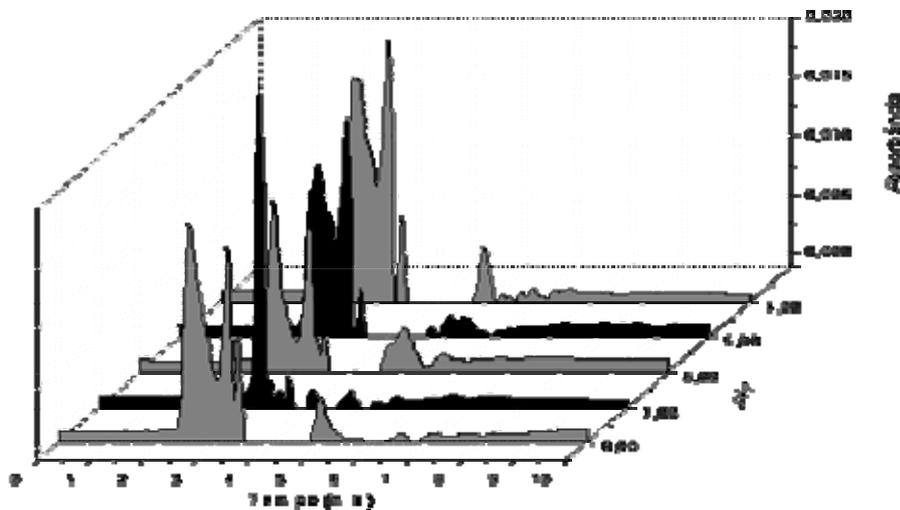


**Figura 20.** Efeito da concentração do surfactante SDS na separação das vitaminas lipossolúveis. Dados obtidos para concentrações das vitaminas A, D3, E, K1 de 40,0; 11,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente. Volume de solução padrão injetado de 20,0  $\mu$ L com fase móvel contendo álcool etílico 20,0% (v/v), SDS nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,20; 0,50 e 1,00% (m/v), sob vazão 0,70 mL/min, pH 7,00.

Como a resolução cromatográfica não era adequada buscou-se uma explicação teórica para explicar os dados obtidos e obter uma solução para este problema. Considerando que as vitaminas lipossolúveis e a fase estacionária não possuem carga e que o surfactante SDS é aniônico, provavelmente a falta de interação com a coluna cromatográfica estaria relacionada a este fator, pois o surfactante pode ser adsorvido pela fase estacionária (C18 – baixa polaridade) através de interação com a sua cauda lipofílica, deixando exposta para interação com as vitaminas a sua cabeça polar, que apresenta baixa afinidade por estas. Idealmente a escolha de um surfactante não iônico seria mais apropriada, no entanto, como explicado anteriormente, o surfactante não iônico, Triton X-100, provoca intenso espalhamento de luz na região do ultravioleta (Fig. 17), impedindo o monitoramento das vitaminas nesta região. Como alternativa

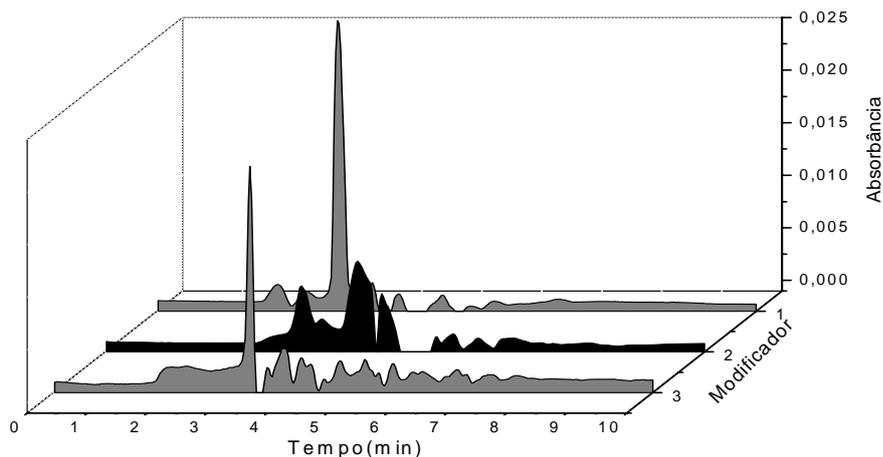
restou neutralizar as cargas do surfactante SDS através da adição de uma solução tampão. Assim, foi adicionado ao meio um sal de fosfato e a fase móvel passou a ser constituída por uma solução aquosa contendo álcool etílico 20,0% (v/v), SDS 1,0% (m/v) e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,10 mol/L em diferentes valores de pH (4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00).

Apesar de serem observadas algumas mudanças no cromatograma (Fig. 21) indicando uma provável melhora na separação das vitaminas, os picos não apresentam uma boa simetria e as resoluções cromatográficas são baixas, não apresentando melhora com a variação de pH. Sob esta nova condição novamente apenas parte das vitaminas foram eluídas da coluna cromatográfica, demonstrando o baixo grau de interação com a fase móvel, pois a maior parte das vitaminas apresentou uma afinidade maior pela fase estacionária (Fig. 21).



**Figura 21.** Efeito da composição da fase móvel na separação das vitaminas lipossolúveis. Dados obtidos para concentrações das vitaminas A, D3, E, K1 de 40,0; 11,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente. Volume de solução padrão injetado de 20,0 µL com fase móvel contendo álcool etílico 20,0% (v/v), SDS 1,0% (m/v), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,10 mol/L sob vazão 0,70 mL/min em diferentes valores de pH (4,00; 5,00; 6,00; 7,00 e 8,00)

Na tentativa de melhorar estas características, foi testada a adição de outros modificadores químicos como  $N(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Sob estas condições, a maioria das vitaminas não são eluidas da coluna cromatográfica (Fig. 22), evidenciando a impossibilidade de se determinar às vitaminas utilizando estas fases móveis.



**Figura 22. Efeito da adição de modificadores químicos à fase móvel na separação das vitaminas lipossolúveis.** 1-  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1% (m/v); 2-  $N(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$  0,1% (v/v); 3-  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,1% (m/v). Dados obtidos para concentração das vitaminas A, D3, E, K1 de 40,0; 11,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente. Volume de solução padrão injetado de 20,0 $\mu\text{L}$  com fase móvel contendo álcool etílico 20,0% (v/v), SDS 1,0% (m/v) sob vazão 0,70 mL/min em pH 7,00.

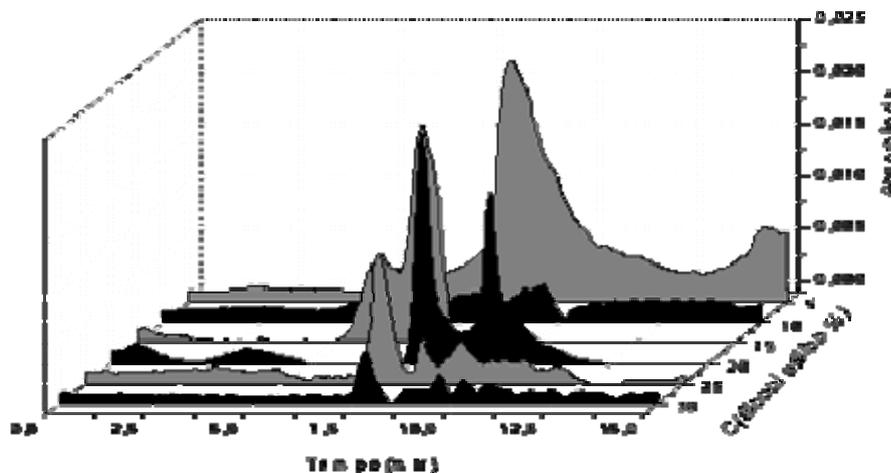
Com o intuito de melhorar a separação cromatográfica passou-se a realizar o controle da temperatura do sistema, pois na otimização dos parâmetros envolvidos em uma separação cromatográfica utilizando substâncias viscosas como fase móvel a temperatura é uma variável importante. Este aspecto é mais evidente na cromatografia líquida micelar porque a baixa eficiência da CLM quando comparada com a cromatografia convencional pode ser creditada à alta viscosidade da fase móvel que diminui a velocidade de difusão das moléculas do analito entre a fase móvel e estacionária, o que colabora para diminuir a interação das vitaminas entre as fases, fazendo com que a resolução cromatográfica seja baixa. Assim, tanto a resolução como

a eficiência da separação podem ser melhoradas aumentando-se a transferência de massa do soluto entre as fases cromatográficas, ou seja, aumentando-se a temperatura [4].

A primeira vantagem observada quando se aumenta a temperatura em cromatografia em ambiente micelar é a diminuição do tempo de análise devido à possibilidade de usar vazões mais altas da fase móvel devido à diminuição na pressão hidrodinâmica do sistema [6]. Ainda, o aumento da temperatura reduz o fator de retenção dos solutos, provocando diminuição no espaçamento entre os picos, ou seja, influencia na resolução cromatográfica do sistema, podendo ser um fator aplicável para a otimização nas separações cromatográficas [24]. A influência da temperatura na coluna envolve dois parâmetros básicos da equação mestra de van Deemter, o número de pratos teóricos (N) e o fator assimétrico (As) [6].

Neste sentido, novos estudos foram efetuados fixando-se a temperatura em 30,0°C, pois em temperaturas mais elevadas havia o risco de iniciar o processo de degradação das vitaminas. A composição química das fases móveis, utilizadas anteriormente, foi mantida variando apenas as percentagens de álcool etílico e mantendo-se as concentrações de SDS,  $N(CH_2CH_2OH)_3$  e  $Na_2HPO_4$  sob uma vazão constante de 0,30 mL/min.

Similarmente aos estudos realizados anteriormente, não foram obtidos resultados satisfatórios (Fig. 23), embora possa ser verificada uma tendência no aumento do tempo de retenção, indicando que os analitos interagiram de forma mais efetiva com a fase estacionária e a fase móvel, podendo este efeito ser interpretado como uma maior difusão das vitaminas para estas fases, estando de acordo com a teoria cromatográfica.



**Figura 23.** Efeito da concentração de álcool etílico na separação das vitaminas lipossolúveis na temperatura de 30,0 °C. Dados obtidos para concentração das vitaminas A, D3, E, K1 de 40,0; 11,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente. Volume de solução padrão de 20,0µL com fase móvel contendo SDS 1,0% (m/v) e  $N(CH_2CH_2OH)_3$  0,01 % (v/v) sob vazão 0,30 mL/min e pH de 7,00.

Devido à alta viscosidade que o álcool etílico possui que é de 1,08 [6] a concentração máxima utilizada deste reagente foi de 30,0 % (v/v), pois quanto mais viscosa a fase móvel maior o aumento da pressão no sistema cromatográfico, o que pode dificultar o bombeamento da fase móvel, podendo inclusive afetar o coeficiente de difusão da substância analisada, acarretando em perda considerável do número de pratos teóricos [25]. Mesmo com o aumento da concentração de álcool etílico não foi obtida separação cromatográfica que pudesse ser utilizada para determinação quantitativa das vitaminas lipossolúveis (Fig. 23).

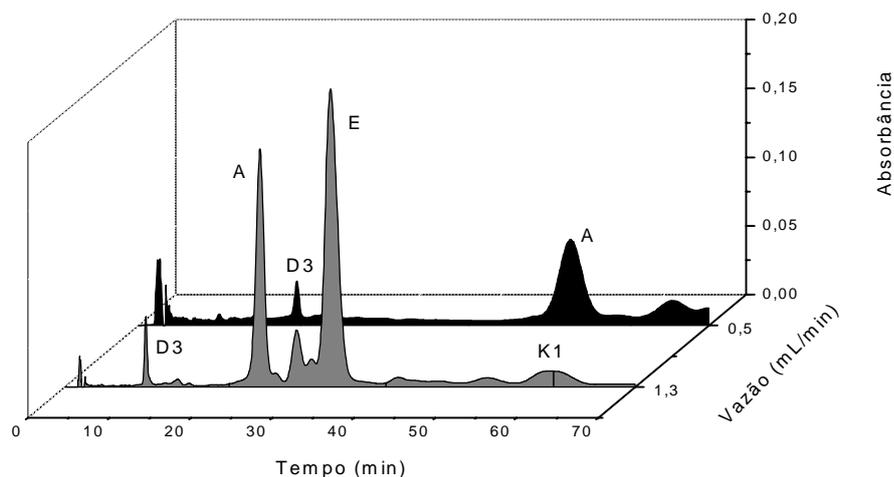
Em virtude dos resultados obtidos anteriormente concluiu-se que não seria possível desenvolver método analítico limpo para determinação de vitaminas lipossolúveis empregando fase móvel que tivesse álcool etílico como modificador químico orgânico. Os cromatogramas até aqui obtidos indicaram efeito benéfico do SDS na separação cromatográfica, enquanto que o álcool etílico não foi muito efetivo

para aumentar a resolução cromatográfica. Assim, decidiu-se por substituir o álcool etílico por outro modificador químico orgânico que também apresentasse baixa toxicidade, mas que pudesse contribuir de forma efetiva para melhora da resolução. Dentre os solventes avaliados o que apresentou melhores perspectivas foi o álcool butílico, pois apresenta uma polaridade menor quando comparado com o álcool etílico, podendo contribuir para a melhora na separação cromatográfica. No entanto, o álcool butílico apresenta uma viscosidade de 2,54 [6] que é considerada relativamente alta para ser utilizado como modificador químico orgânico na análise cromatográfica, por isso foi utilizada uma percentagem menor deste modificador a fase móvel para que o álcool butílico pudesse ser utilizado na composição da fase móvel.

Novas fases móveis foram preparadas, desta vez com a presença de álcool butílico em substituição ao álcool etílico, SDS e um dos modificadores  $N(CH_2CH_2OH)_3$  (trietanolamina),  $Na_2HPO_4$  (fosfato dibásico de sódio anidro) e  $NH_4Cl$  (cloreto de amônio). Os estudos foram iniciados com o  $Na_2HPO_4$ , pois quando fosse necessária a correção do pH da fase móvel, este atuaria como uma solução tampão. Assim, a composição da fase móvel foi constituída por solução aquosa contendo álcool butílico 12,0% (v/v), SDS 2,20% (m/v) e 0,02 mol/L de  $Na_2HPO_4$  em pH 7,00 associada a uma vazão de 0,50 mL/min em uma temperatura de 30,0° C.

Pode-se verificar que com esta fase móvel e com o controle da temperatura houve melhora significativa na separação cromatográfica (Fig. 24), com expressivo aumento no tempo de retenção das vitaminas, o que indica maior interação destas com a fase móvel. Embora a resolução cromatográfica ainda não seja a ideal para algumas vitaminas (Fig. 24), é possível verificar que com otimização destes parâmetros experimentais, é possível conseguir determinar as vitaminas lipossolúveis utilizando estes reagentes na composição da fase móvel. Ainda, é possível verificar que a vazão é

uma variável importante devido à excessiva distância entre algumas das vitaminas (Fig. 24) o que pode ser verificado quando a vazão foi aumentada ocorreu a eluição das quatro vitaminas lipossolúveis em aproximadamente 70,0min e com melhores resoluções cromatográficas do que foi apresentado anteriormente.



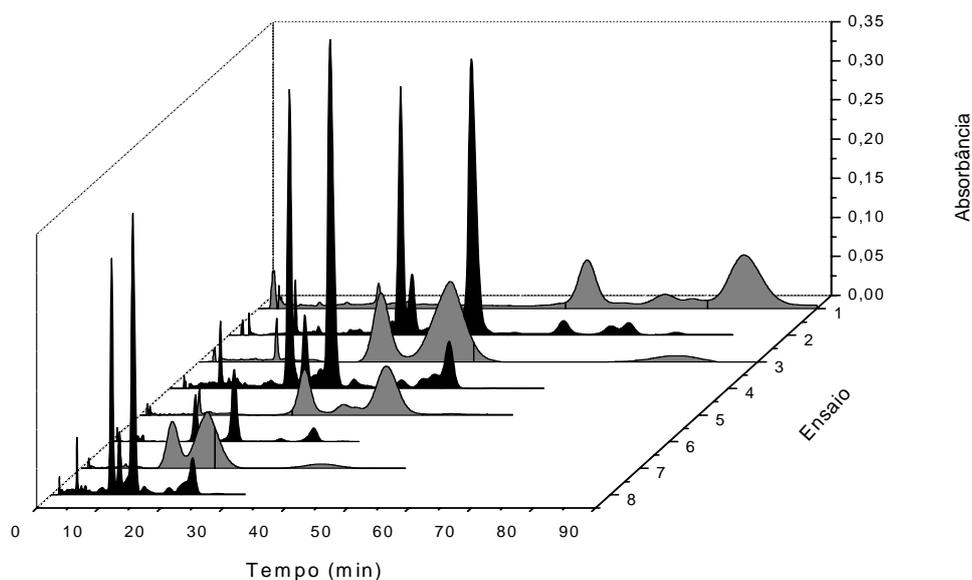
**Figura 24. Efeito da vazão e da presença de álcool butílico na separação das vitaminas lipossolúveis.** Dados obtidos para concentrações das vitaminas A, D3, E, K1 de 40,0; 11,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente. Volume da solução padrão de 40,0 $\mu$ L e fase móvel contendo álcool butílico 12,0% (v/v), SDS 2,20% (m/v) e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,02mol/L em pH 7,00 e T 30°C.

### 5.2.2. Planejamento fatorial e otimização das variáveis

Considerando-se que foi encontrada uma composição da fase móvel que indica que as vitaminas lipossolúveis podem ser separadas, na seqüência foram realizados experimentos para otimização das concentrações de álcool butílico e de SDS na fase móvel e da vazão, sendo estes fatores considerados simultaneamente através da realização de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Tab. 05 em Materiais e Métodos) partindo-se de uma fase móvel contendo álcool butílico 12,0% (v/v), SDS 2,20% (m/v) e 0,02mol/L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em pH 7,00 associada a uma vazão de 1,30 mL/min a uma temperatura de 30,0°C. Inicialmente o volume de amostra foi fixado em 40,0  $\mu\text{L}$ .

Através dos dados obtidos com este experimento (Fig. 25), pode-se verificar que houve uma intensa modificação do cromatograma em função dos diferentes níveis de álcool butílico, SDS e da vazão.



**Figura 25. Otimização dos parâmetros experimentais utilizando planejamento fatorial na separação das vitaminas lipossolúveis.** Dados obtidos para concentrações das vitaminas D3, A, E, K1 de 11,0; 40,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente. Volume da solução padrão de 40,0  $\mu\text{L}$ , pH 7,00 e temperatura de 30°C. Para dados da composição da fase móvel e de vazão vide Tabela 05.

Com relação à concentração do álcool butílico na fase móvel foi verificado que a concentração mínima deste componente para obtenção de separação cromatográfica com resolução adequada para fins quantitativos foi de 15,0 % (v/v) (Tab. 06). Para valores de concentração de álcool butílico menores que 15,0% (v/v) foi verificado alargamento dos picos e maior tempo de análise, sendo este efeito mais acentuado quanto menor a concentração de álcool butílico na fase móvel. Para valores de concentração de álcool butílico maiores que 15,0 % (v/v) há necessidade de se aumentar também a concentração de SDS, pois o surfactante ajuda a promover a homogeneização

do álcool butílico no meio aquoso; indicando a correlação entre as variáveis e a necessidade de estudá-las conjuntamente em experimento fatorial. Considerando-se estes dados a concentração de álcool butílico foi fixada em 15,0 % (v/v).

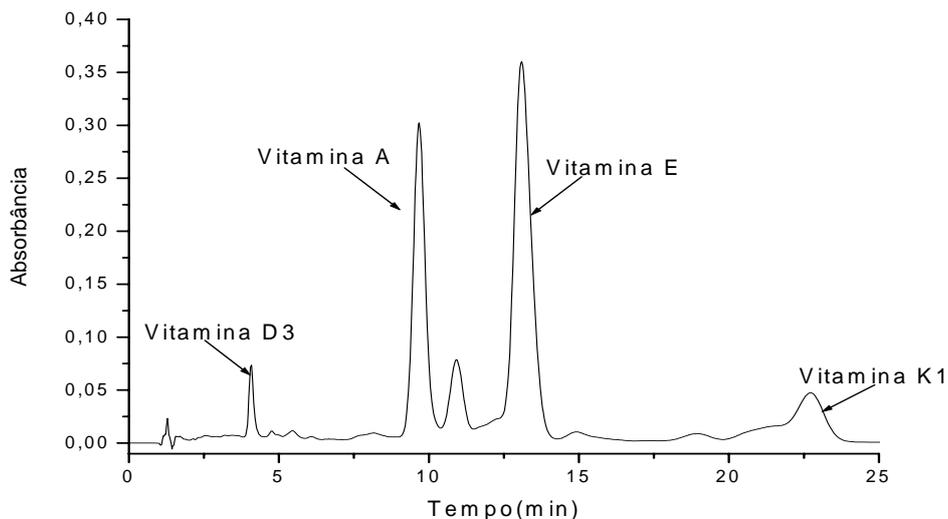
A presença de SDS é indispensável na fase móvel, pois sem o SDS não há a homogeneização entre o álcool butílico e o meio aquoso devido à baixa solubilidade deste álcool na fase aquosa. A quantidade mínima de SDS para se conseguir uma solução homogênea contendo 15,0% (v/v) de álcool butílico é de 1,50% (m/v). O SDS também influencia na separação cromatográfica, principalmente devido à formação de micelas no meio e à modificação da fase estacionária, pois parte do SDS é adsorvida nos grupamentos C18 alterando a polaridade desta fase. Aumentando a concentração de SDS verifica-se uma melhora na separação cromatográfica, aumento da resolução cromatográfica e, conseqüente, diminuição no tempo de análise (Fig. 25 e Tab. 06), mesmo nos casos em que a concentração de álcool butílico é inferior a 15,0% (v/v). Assim, a concentração de SDS foi fixada em 3,00% (m/v) como melhor compromisso entre tempo de análise, resolução cromatográfica e consumo de reagentes.

Verificou-se que a vazão possui papel fundamental na separação cromatográfica, pois influencia tanto no tempo de análise quanto na resolução cromatográfica (Fig. 25, Tab. 06). Para valores de vazão inferiores a 1,0 mL/min associado a baixas concentrações de álcool butílico e SDS o tempo de análise pode ser superior a 90,0 minutos, fator que contribui para o alargamento dos picos. Para vazões superiores a 1,0 mL/min ocorre diminuição no tempo de análise e melhora significativa na resolução cromatográfica (Fig. 25, Tab. 06), sendo que os melhores resultados foram obtidos para vazão de 2,0 mL/min. Desta forma, a vazão foi fixada em 2,0 mL/min em função do menor tempo de análise, menor consumo de reagentes e melhor resolução cromatográfica.

**Tabela 06. Resoluções cromatográficas para planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para determinação das vitaminas lipossolúveis.**

Ensaio	Rs (vita D3 - vita A)	Rs (vita A - vita E)	Rs (vita E - vita K1)
1	10,03	3,335	-
2	16,78	6,166	8,856
3	5,815	1,548	2,870
4	13,17	4,528	8,623
5	10,96	2,548	-
6	13,45	5,325	6,785
7	4,043	1,046	1,612
8	10,61	5,016	7,982

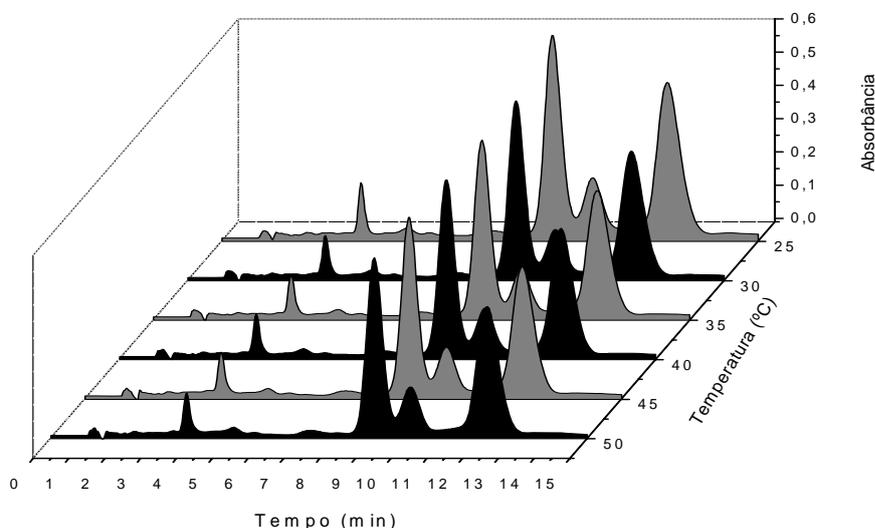
Desta forma, observa-se que as condições utilizadas no ensaio 08 do planejamento fatorial (Tab. 05) são as que fornecem a melhor relação custo/benefício para a determinação de vitaminas lipossolúveis (álcool butílico 15,0% (v/v), SDS 3,00 % (m/v) e vazão de 2,0 mL/min), pois os dados obtidos sob esta condição apresentaram as melhores características analíticas com relação a resolução cromatográfica (Tab. 06), ao menor consumo de reagentes, a sensibilidade e a frequência analítica (Figs. 25 e 26). Sob estas condições foi possível quantificar as vitaminas lipossolúveis em aproximadamente 25,0 min (Fig. 26), com tempos de retenção de 4,00; 9,60; 13,00 e 22,70 min, para as vitaminas D3, A, E, K1, respectivamente.



**Figura 26. Cromatograma de uma solução padrão contendo as vitaminas D3, A, E, K1.** Nas concentrações de 11,0; 40,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente para D3, A, E e K1. Dados obtidos para injeção de 40,0 $\mu$ L da solução padrão, vazão 2,0 mL/min, pH 7,00, álcool butílico 15,0%(v/v), SDS 3,00%(m/v), 0,02 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e temperatura de 30,0° C.

Para certificação das condições ótimas também foi realizado experimento para otimização da temperatura do sistema cromatográfico. Pôde-se verificar que aumentando-se a temperatura de 25,0° C até 50,0° C nenhuma modificação expressiva na separação cromatográfica ocorreu (Fig. 27). Deve-se enfatizar que, como esperado, o aumento da temperatura promoveu uma diminuição da pressão do sistema cromatográfico, no entanto, em temperaturas mais elevadas algumas reações indesejáveis podem ocorrer como, por exemplo, a decomposição das vitaminas ou da fase móvel, formação de bolhas no detector, influência no equilíbrio cromatográfico, particularmente nos equilíbrios iônicos, e aumento da solubilidade da sílica [4]. Deve ser ressaltado que a temperatura não pode ser aumentada indefinidamente em virtude da deterioração da coluna cromatográfica, para as colunas de sílica a temperatura máxima de operação é de 120°C e para fases quimicamente ligadas esta não deve exceder os 80°C [6]. Para temperaturas inferiores a 25,0° C ocorreu um aumento da pressão que

poderia inviabilizar a execução do método analítico. Considerando-se todos estes fatores, a temperatura do sistema foi fixada em 30,0° C.

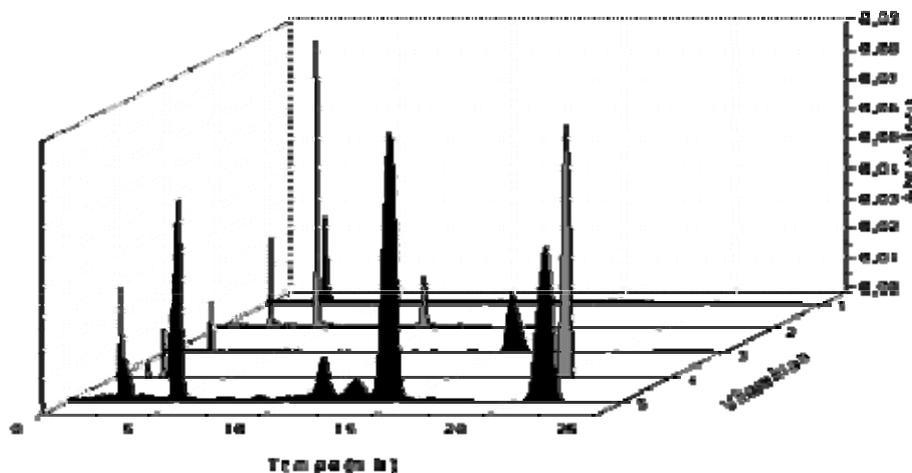


**Figura 27. Efeito do controle de temperatura na separação das vitaminas lipossolúveis D3, A, E.** Nas concentrações de 30,0; 80,0 e 60,0 mg/L, respectivamente para D3, A, E. Dados obtidos para injeção de 40,0µL da solução padrão, vazão 2,0 mL/min, pH 7,00, álcool butílico 15,0%(v/v), SDS 3,00%(m/v), 0,02 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e T de 25,0°C a 50,0 ° C.

### 5.2.3. Determinação das vitaminas utilizando o método cromatográfico convencional

Testes utilizando-se o método convencional que utiliza coluna cromatográfica C18, detector de arranjo de diodos com aquisição dos dados em 280 nm e fase móvel constituída por dois solventes diferentes (solução A: acetonitrila; solução B: álcool metílico) e gradiente da fase móvel iniciando-se com 50,0 % (v/v) de álcool metílico e 50,0 % (v/v) de acetonitrila e chegando em 25,0 min com 30,0% (v/v) de álcool metílico e 70,0% (v/v) de acetonitrila sempre com vazão constante de 1,30 mL/min demonstraram que as vitaminas lipossolúveis podem ser separadas em

aproximadamente 25,0 minutos (Fig. 28) com boa seletividade, sensibilidade e frequência analítica, no entanto consumindo solventes orgânicos considerados tóxicos.



**Figura 28. Determinação de vitaminas lipossolúveis empregando-se método cromatográfico convencional.** 1-Vitamina A; 2-Vitamina A e D3; 3-Vitamina E; 4-Vitamina K1; 5-Mistura das vitaminas A, D3, E, K1. Dados obtidos para concentrações das vitaminas A, D3, E, K1 de 40,0; 11,0; 60,0 e 10,0 mg/L, respectivamente. Volume de solução padrão injetado de 20,0 $\mu$ L e vazão de 1,30 mL/min.

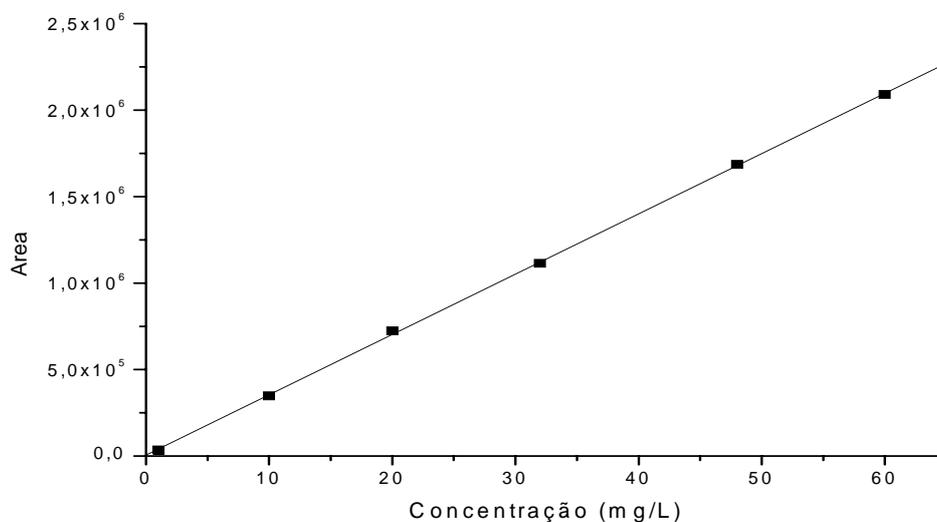
### 5.3. Aplicações

#### 5.3.1. Figuras de mérito do método proposto

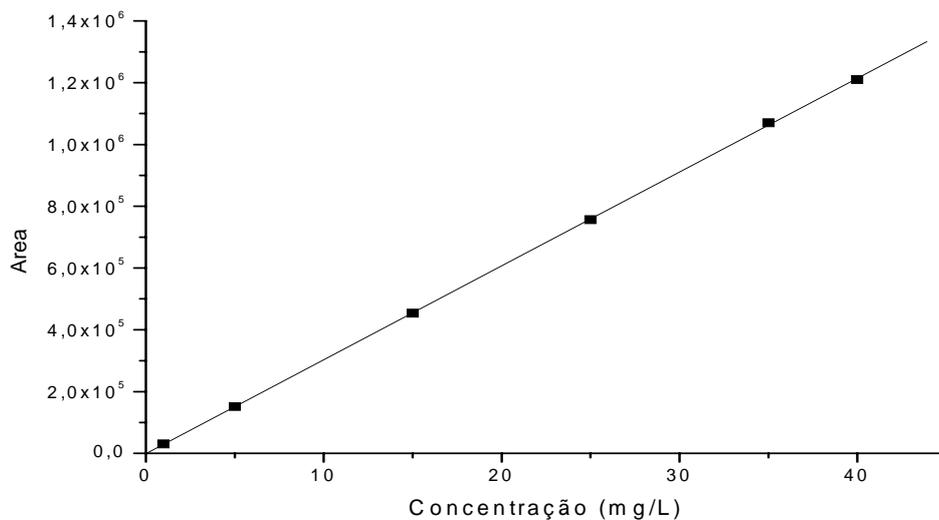
Utilizando as condições otimizadas, fase móvel contendo: álcool butílico 15,0% (v/v), SDS 3,00% (m/v), 0,02 mol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,00, associada a uma vazão de 2,00 mL/min e a uma temperatura de 30,0 °C conseguiu-se obter as melhores características analíticas com relação à resolução cromatográfica. As resoluções cromatográficas obtidas foram de 10,6 (entre os picos das vitaminas D3 e A), 5,0 (entre os picos das vitaminas A e E) e de 8,0 (entre os picos das vitaminas E e K1) (Tab. 06).

Ainda sob estas condições foram obtidos os melhores dados com relação ao menor consumo de reagentes, sensibilidade e frequência analítica (Fig.24).

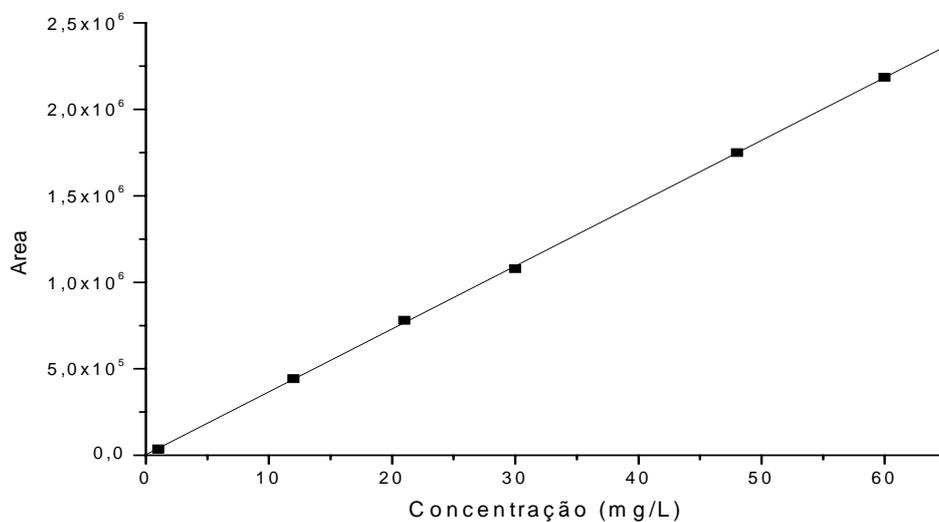
Curvas analíticas (Figs. 29-32) obtidas para as quatro vitaminas lipossolúveis em estudo foram lineares na faixa de concentração de interesse (1,00 – 60,0 mg/L para as vitaminas A, E e K1 e de 1,00 - 40,0 mg/L para a vitamina D3) quando foram injetados 50,0 µL da solução padrão. Os limites de detecção e quantificação foram compatíveis com as concentrações esperadas das vitaminas para as amostras de alimentos e complexos vitamínicos (Tab. 07).



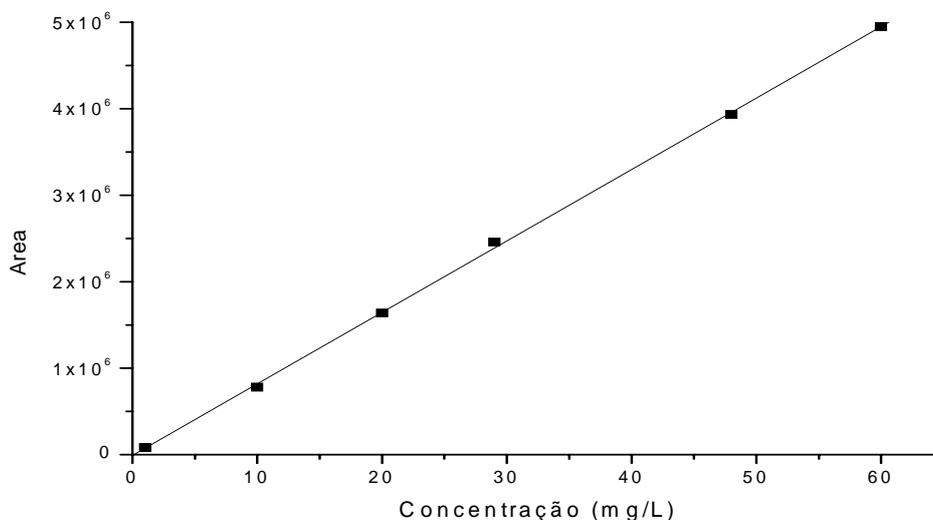
**Figura 29. Curva Analítica para a Vitamina A pelo método proposto.** Nas concentrações de 60,0; 48,0; 32,0; 20,0; 10,0 e 1,00 mg/L.



**Figura 30. Curva Analítica para a Vitamina D3 pelo método proposto.** Nas concentrações de 40,0; 35,0; 25,0; 15,0; 5,00 e 1,00 mg/L.



**Figura 31. Curva Analítica para a Vitamina E pelo método proposto.** Nas concentrações de 60,0; 48,0; 30,0; 21,0; 12,0 e 1,00 mg/L.



**Figura 32. Curva Analítica para a Vitamina K1 pelo método proposto.** Nas concentrações de 60,0; 48,0; 29,0; 20,0; 10,0 e 1,00 mg/L.

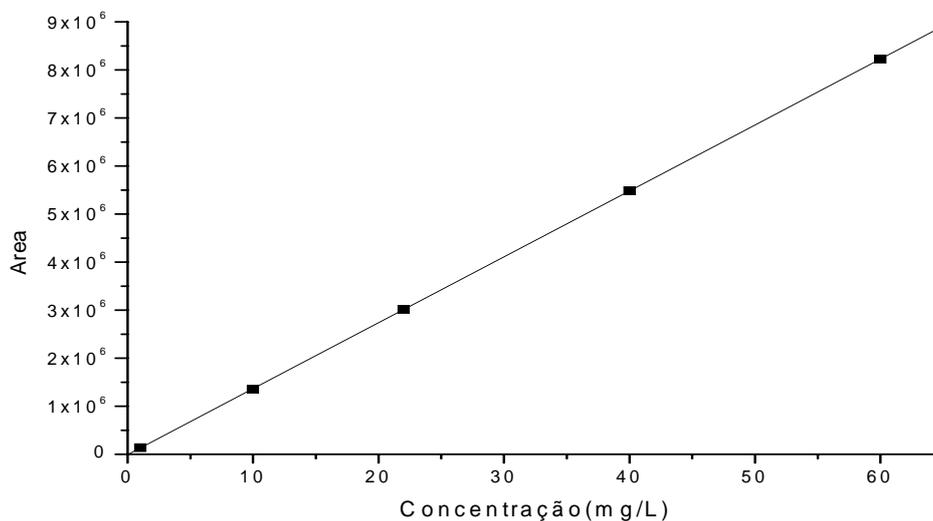
Deve ser ressaltado que os limites de detecção e quantificação (Tab. 07) foram estimados considerando-se a relação sinal/ruído de 3,00 e 10,0 vezes, respectivamente.

**Tabela 07. Características do método cromatográfico proposto para a determinação das vitaminas lipossolúveis.**

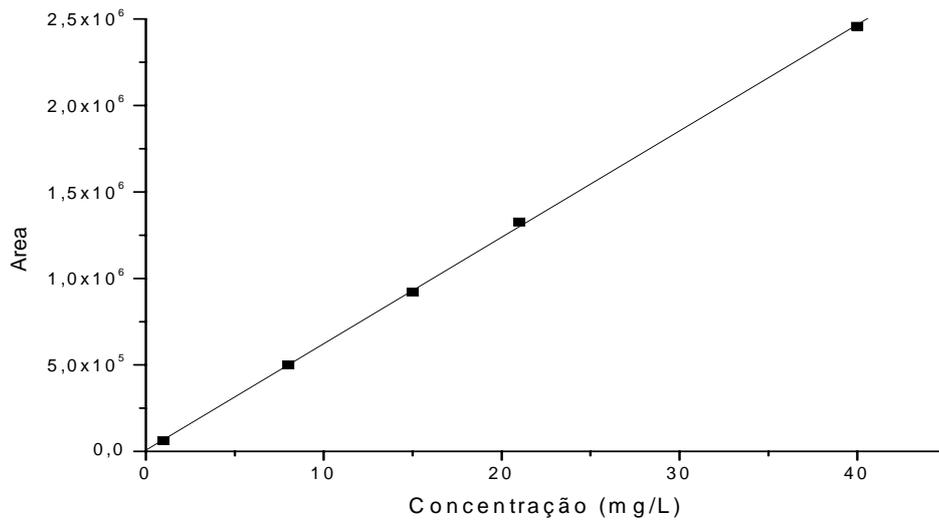
	Vitamina A	Vitamina D3	Vitamina E	Vitamina K1
<b>Equação da</b>	$y = 34852x + 6290$	$y = 30382x - 794$	$y = 36333x + 4092$	$y = 82621x - 7175$
<b>reta</b>	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9998$
<b>Limite de</b>				
<b>detecção</b>	0,89 mg/L	0,94 mg/L	1,18 mg/L	0,87 mg/L
<b>Limite de</b>				
<b>quantificação</b>	3,00 mg/L	3,12 mg/L	4,00 mg/L	2,90 mg/L

### 5.3.2. Figuras de mérito do método convencional

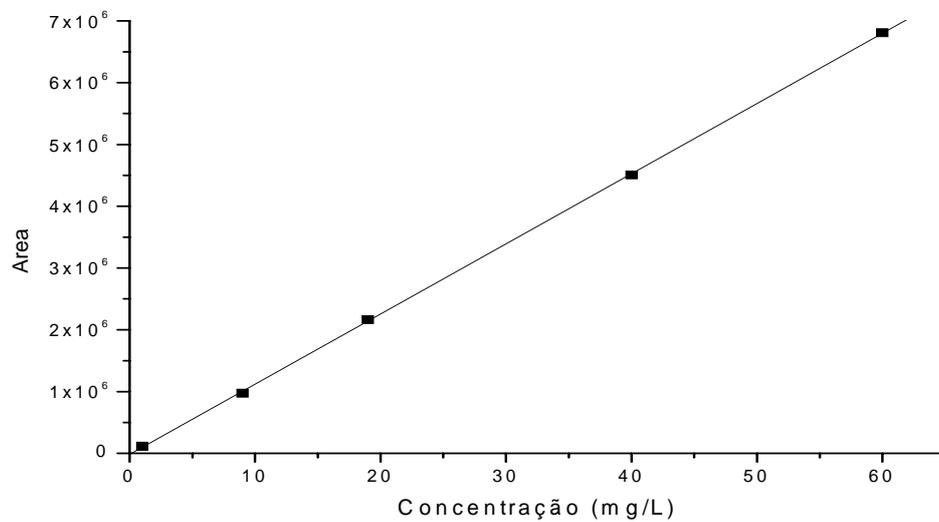
As curvas analíticas obtidas para o método convencional (Figs. 33-36) bem como os limites de detecção e quantificação estimados (Tab. 08) indicam semelhanças nas características analíticas dos dois métodos analíticos, sendo a substituição dos solventes orgânicos tóxicos a principal diferença entre ambos. A exemplo do método proposto, no método convencional as curvas analíticas puderam ser realizadas para as mesmas faixas de concentração (1,00 – 60,0 mg/L para as vitaminas A, E e K1 e de 1,00 – 40,0 mg/L para a vitamina D3) com diferença apenas no volume de amostra injetado 20,0  $\mu$ L (Tab. 08).



**Figura 33. Curva Analítica para a Vitamina A pelo método convencional.** Nas concentrações de 60,0; 40,0; 22,0; 10,0 e 1,00 mg/L.



**Figura 34. Curva Analítica para a Vitamina D3 pelo método convencional.** Nas concentrações de 40,0; 21,0; 15,0; 8,00 e 1,00 mg/L.



**Figura 35. Curva Analítica para a Vitamina E pelo método convencional.** Nas concentrações de 60,0; 40,0; 19,0; 9,0 e 1,00 mg/L.

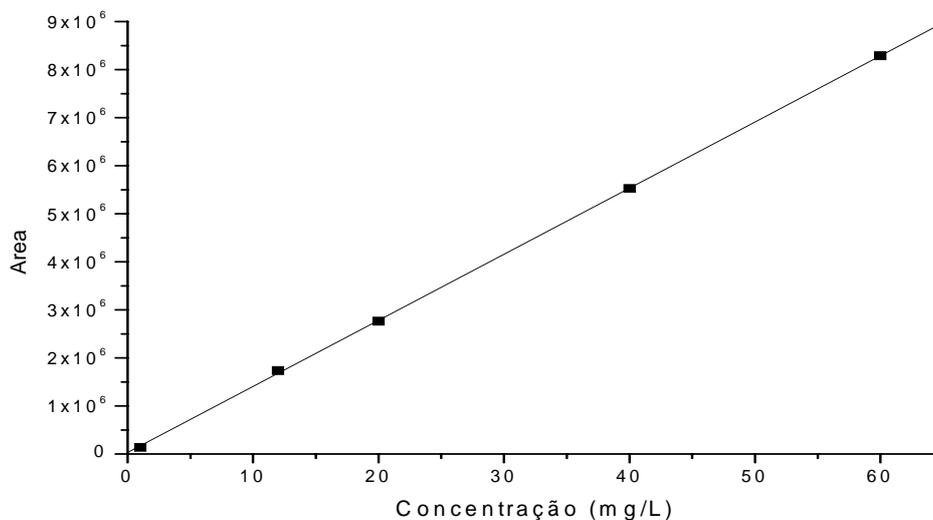


Figura 36. Curva analítica para Vitamina K1 pelo método convencional. Nas concentrações de 60,0; 40,0; 20,0; 12,0 e 1,00 mg/L.

Tabela 08. Características do método cromatográfico convencional para a determinação das vitaminas lipossolúveis.

	Vitamina A	Vitamina D3	Vitamina E	Vitamina K1
<b>Equação da</b>	$y = 137185x -$	$y = 61511x +$	$y = 113589x -$	$y = 137589x +$
<b>reta</b>	5456	7729	16356	30631
	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9998$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$
<b>Limite de</b>				
<b>deteção</b>	0,77 mg/L	0,92 mg/L	0,90 mg/L	0,63 mg/L
<b>Limite de</b>				
<b>quantificação</b>	2,60 mg/L	3,10 mg/L	3,00 mg/L	2,10 mg/L

### 5.3.3. Comparação das características do método proposto e do método convencional

Para a verificação dos resultados obtidos foi realizada a comparação das características entre o método proposto e o convencional (Tab. 09). O que possibilitou verificar que os métodos possuem características semelhantes quanto ao limite de detecção e de quantificação, no entanto, o método proposto apresenta a vantagem de utilizar reagentes de baixa toxicidade como fase móvel estando de acordo com a Química Limpa.

**Tabela 09. Comparação das características do método cromatográfico proposto e do método convencional para a determinação das vitaminas lipossolúveis.**

Vitaminas	Método proposto (volume injetado de 50,0 µL)			Método convencional (volume injetado de 20,0 µL)		
	Área	L. D (mg/L)	L. Q (mg/L)	Área	L. D (mg/L)	L.Q (mg/L)
<b>A</b>	2,1 x 10 <sup>6</sup>	0,89	3,00	8,2 x 10 <sup>6</sup>	0,77	2,60
<b>D3</b>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	0,94	3,12	2,5 x 10 <sup>6</sup>	0,92	3,10
<b>E</b>	2,2 x 10 <sup>6</sup>	1,18	4,00	6,8 x 10 <sup>6</sup>	0,90	3,00
<b>K1</b>	4,9 x 10 <sup>6</sup>	0,87	2,90	8,3 x 10 <sup>6</sup>	0,63	2,10

L. D = limite de detecção

L. Q = limite de quantificação

### 5.3.4. Determinação de vitaminas em amostras de alimentos e complexos vitamínicos

#### Alimentos

Quando o método proposto foi aplicado para determinação das vitaminas A, D3, E e K1 em amostras de leite fortificado, óleo de soja, repolho e complexo vitamínico os resultados obtidos foram concordantes com os resultados do método convencional e ambos apresentaram desvio padrão de *ca* 5,0 %.

Para amostra de leite fortificado, empregando o método limpo, foram encontradas concentrações de 0,19 mg/g e 0,86 mg/g das vitaminas A e E, respectivamente. Para a amostra de óleo de soja foi encontrada concentração de 0,84 mg/g de vitamina E. Estes valores são concordantes com aqueles obtidos pelo método convencional que apresentou concentrações de 0,18 mg/g e 0,74 mg/g das vitaminas A e E, respectivamente para amostra de leite fortificado e 0,78 mg/g de vitamina E na amostra de óleo de soja. Deve ser enfatizado que por ambos os métodos as vitaminas D3 e K1 não foram detectadas em nenhuma das amostras, apesar de apresentarem percentagens de recuperação semelhantes por ambos os métodos (Tab. 10).

A validação do método analítico foi realizada através de ensaios de recuperação (Tab. 10) e também através de comparação dos resultados com aqueles obtidos quando da utilização do procedimento convencional que emprega solvente orgânico. Os resultados obtidos através do método proposto e do método convencional mostraram-se concordantes, os valores médios das percentagens de recuperação não são estatisticamente diferentes ao nível de 95 % (teste *t* de student), evidenciando assim a exatidão dos resultados obtidos quando da utilização do método proposto, não apresentando variação significativa entre dois métodos em teste *t* pareado.

Os ensaios de recuperação indicaram que o método proposto apresentou percentagens de recuperação variando entre 85,0 e 95,0 % enquanto que o método convencional apresentou percentagens de recuperação entre 81,0 e 92,0 %.

**Tabela 10. Ensaio de recuperação das vitaminas lipossolúveis em amostras de leite fortificado, leite em pó, óleo e repolho através do método proposto e método convencional utilizando adição de padrão.**

Amostras	Concentração (mg/L)	Método proposto (recuperação %)				Método convencional (recuperação %)			
		A	D3	E	K1	A	D3	E	K1
Leite fortificado	20,0	85,00	-----	95,00	-----	83,00	-----	82,00	-----
Leite em pó	15,0	-----	93,00	-----	-----	-----	85,00	-----	-----
Óleo	20,0	-----	-----	88,00	-----	-----	-----	81,00	-----
Repolho	20,0	-----	-----	-----	89,00	-----	-----	-----	92,00

A não detecção das vitaminas K1 e D3 pode ter ocorrido porque as concentrações destas estavam abaixo do limite de detecção devido à influência do tipo de cultivo ou estocagem do alimento. Deve ser considerado que a distribuição de vitamina K1 nas plantas não é uniforme, as maiores concentrações da vitamina são encontradas nas folhas externas quando comparadas às folhas mais internas. As cascas das frutas e dos vegetais possuem maiores concentrações da vitamina do que a polpa. Fatores como a estação do ano, o clima, local geográfico e a fertilização do solo afetam as concentrações de vitamina K1 nos alimentos [38].

Ainda, a determinação de vitamina D3 e combinações na forma de vitamina D é uma tarefa difícil e laboriosa devido às baixas concentrações destas nos alimentos. A

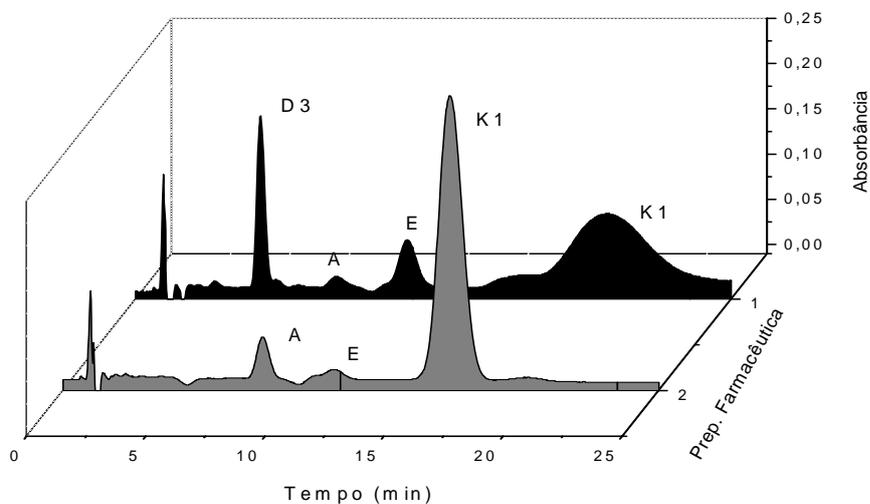
maioria dos métodos de extração e análise utiliza a saponificação, purificação cromatográfica e quantificação através da CLAE, utilizando a adição de padrão interno [39].

### **Complexos Vitamínicos**

As amostras de complexos vitamínicos e preparações farmacêuticas foram analisadas apenas pelo método proposto, pois as concentrações esperadas das vitaminas foram fornecidas pelo fabricante.

Para estas amostras foi verificada maior eficiência de extração quando as amostras foram submetidas à etapa de saponificação (Fig. 37), principalmente quando a preparação possuía como excipiente óleo, que é o caso das vitaminas D3 e E. Para as vitaminas A e K1 que possuem como excipiente uma solução de micelas mistas que se dissolve facilmente em solventes orgânicos polares a maior eficiência ocorreu quando a dissolução da preparação farmacêutica foi feita apenas em álcool etílico (Fig. 37) e, neste caso, a excessiva preparação da amostra adicionava reativos que contribuem para alargamento dos picos. No entanto, a dissolução de amostras de vitaminas em álcool etílico não permite a solubilização da vitamina D3.

Assim, foi verificado que procedimentos de extração que possuem etapa de saponificação são indicados para extração de vitaminas lipossolúveis de amostras contendo óleo (Fig. 37).



**Figura 37. Cromatograma de amostras de preparações farmacêuticas.** 1-Extração utilizando saponificação e 2-Extração sem saponificação. Dados obtidos para injeção de 50,0  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra, vazão 2,0 mL/min, pH 7,00, álcool butílico 15,0% (v/v), SDS 3,00% (m/v), 0,02 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e T 30,0° C.

Deve ser ressaltado que os dados da (Fig. 37) referem-se a quatro amostras de preparações farmacêuticas cada uma contendo apenas uma das vitaminas que foram juntadas antes da etapa de extração. Foram obtidas concentrações de 5,70; 3,40; 3,00 e 8,50 mg/mL para as vitaminas D3, A, E, K1, respectivamente na extração utilizando a saponificação. Para a extração que foi realizada sem saponificação as concentrações obtidas foram de 4,60; 1,23 e 9,0 mg/mL para as vitaminas A, E, K1, respectivamente. Estes valores estão de acordo com os descritos pelos fabricantes que foram de 6,00 mg/mL para a vitamina D3; 5,00 mg/mL para a vitamina A; 4,00 mg/L para a vitamina E e 10,00 mg/mL para a vitamina K1.

## 6. Conclusões

É possível desenvolver métodos cromatográficos limpos explorando ambientes micelares e sem utilizar solventes orgânicos de alta toxicidade.

O método cromatográfico desenvolvido para a determinação das vitaminas lipossolúveis utiliza como fase móvel álcool butílico 15,0 % (v/v), SDS 3,00 % (m/v), 0,02 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,00 em água desionizada, associada a uma vazão de 2,0 mL/min e a uma temperatura de 30,0°C como fase estacionária uma coluna C18. O método mostrou-se seletivo, sensível, robusto, simples, de alta frequência analítica, sendo os resultados obtidos comparáveis àqueles fornecidos quando da utilização do procedimento convencional, mas com a vantagem de utilizar reagentes orgânicos de baixa toxicidade.

Deve ser ressaltado que as características analíticas do método proposto são superiores ao método convencional, pois o tempo de análise é praticamente o mesmo, a seletividade são similares e o método analítico pode ser considerado limpo.

Apesar das vitaminas K1 e D3 não serem determinadas nas amostras de alimentos sem adição de padrão, fica evidente que o método proposto pode ser utilizado para determinação das quatro vitaminas lipossolúveis, pois apresentou resultados concordantes com os do método convencional, o que era o objetivo desta presente dissertação, desenvolver método analítico limpo para determinação de vitaminas em alimentos, complexos vitamínicos e similares.

Finalmente, deve ser enfatizado que o método analítico necessita ser utilizado para determinação de vitaminas em outras amostras. Neste trabalho esta tarefa não foi realizada porque o objetivo principal era desenvolver método analítico limpo para determinação de vitaminas utilizando CLAE e ambientes micelares e o tempo exíguo

para a conclusão de um mestrado não permitiu um estudo mais completo sobre aplicação do método às amostras reais.

## 7. Referências

- [1] BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução à química dos alimentos. 2ª Ed., São Paulo-SP, Editora Livraria Varela, 1992. p.163-173.
- [2] PAIXÃO, J. A.; STAMFORD, T. L. M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos - uma abordagem analítica. Quím. Nova, v. 27, nº.1, p. 96-97, 100-101. 2004.
- [3] ISLABÃO, N. Vitaminas seu metabolismo no homem e nos animais domésticos. 2ª Ed., São Paulo-SP, Editora Livraria Nobel, 1983. p. 17, 25, 30-31, 50, 64. 86-87.
- [4] MOMENI, Z.; KHORASANI, J.H. Separation and determination of Vitamins E and A in multivitamin syrup using micellar liquid chromatography and simplex optimization. J. Pharma. Biome. Anal, v. 37, p. 383–384, 2005.
- [5] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, Official methods of analysis, Deustch, M. J.; 19<sup>th</sup> ed., Washington: D.C., cap. 45, p.1-79, 1998.
- [6] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. 1º Ed., Campinas, Editora da Unicamp, 2006. p. 17-42, 273-274, 280-302, 365-367.
- [7] FENNEMA, O. R.; Food Chemistry. Publishing Marcel Dekker, Nova Yorque - USA, 1996. p.532-537, 539-540, 545-559.
- [8] ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos teoria e prática. 3º Ed., Viçosa - MG, Editora Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2006. p.120-125, 425, 430-434.
- [9] CHATZIMICHALAKIS, P. F.; SAMANIDOU, V.F.; PAPADOYANNIS, I.N. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. J. Chromatogr. B, v. 805, p. 289, 2004.

- [10] LUQUE, J.L.; GARCIA M.D.; LUQUE C. Extraction of fat-soluble vitamins. J. Chromatogr. A, v. 935, p.3-7, 2001.
- [11] COULTATE, T. P. Alimentos: A química de seus componentes. 3º Ed., Porto Alegre - RS, Editora Artmed, 2004. p. 237-247.
- [12] SEBREL, W. H. J.; HARRIS, R. S. The Vitamins: chemistry, physiology, pathology, methods. 2º Ed., Vol. 3, New York and London, Publishing Academic Press, 1971. p.270-278,
- [13] SWIGLO, A. G.; SIKORSKA E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. J. Chromatogr. A, v.1048, p.195, 2004.
- [14] DAMON, M.; ZHANG, N.Z.; HAYTOWITZ, D.B.; BOOTH, S. L. Phylloquinone (vitamin K1) content of vegetables. J. Food. Composit. Anal., v. 18, p.751-752, 2005.
- [15] LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice, 1º Ed., London, Publishing Blackie Academic & Professional, 1996. p. 4.
- [16] ZAMARRENO, M.M. D.; MAZA, I. G.; PEREZ, A. S.; MARTINEZ, R. C.; Separation and simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins by electrokinetic capillary chromatography. J. Chromatogr A, v. 953, p. 257, 2002.
- [17] WEBSTER, R. D. Voltammetric studies on the  $\alpha$ -tocopherol anion and  $\alpha$  tocopheroxyl (Vitamin E) radical in acetonitrile. Electrochem Communica., v.1, p. 581–582, 1999.

- [18] RUIZ, T. P.; LOZANO, C. M.; GARCIA, M. D.; MARTIN, J. High-performance liquid chromatography–photochemical reduction in aerobic conditions for determination of K vitamins using fluorescence detection. J. Chromatogr. A, v.1141, p.67–68, 2007.
- [19] SONG, Z.; HOU, S. Sub-picogram determination of Vitamin B12 in pharmaceuticals and human serum using flow injection with chemiluminescence detection. Anal. Chimi. Acta, v. 488, p.71, 2003.
- [20] DEMIRKAYA, F.; KADIOGLU, Y. Simple GC-FID method development and validation for determination of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) in human plasma. J. Biochem. Biophys. Methods, Artigo in Press, 2006.
- [21] SCOTT, R. P. W. Techniques and Practise of Chromatography, Vol. 70, Publishing Marcel Dekker, Nova Yorque - USA, 1995. p.3-10.
- [22] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos, 5ª Ed., Campinas-SP, Editora da Unicamp, 1993. p. 13-16.
- [23] DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. Quím. Nova Escola, v. 7, p. 21, 1998.
- [24] Ribeiro, R. L. V. Uso de etanol como modificador orgânico da fase móvel para cromatografia líquida de alta eficiência. Campinas. 1999. Dissertação (Mestrado), Instituto de Química – Unicamp, p.1-14, 27-30.
- [25] CIOLA, R. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho HPLC, 1ª Ed., São Paulo-SP, Editora Edgard Blücher, 1998. p. 64-67.
- [26] VIDOTTI, E. C.; COSTA, W. F.; OLIVEIRA, C. C. Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples. Talanta, v. 68, p. 516, 2006.

- [27] Manual de Produtos Químicos e Segurança de laboratório - CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Citação de referência e documentos eletrônicos. Disponível em: [www.cetesb.com.br](http://www.cetesb.com.br). Acessada em 3 de janeiro de 2007.
- [28] ROMERO, J.E.; PEIRO, M.E.C.; PONS, L. M.; AGUSTI, M.G. Micellar liquid chromatography in clinical chemistry: application to the monitorization of B6 vitamins. *Cli. Chimi. Acta*, v. 348, p. 70, 2004.
- [29] UEDA, A. C. Aplicação de Micelas Reversas na Remoção de Corantes Têxteis Catiônicos. Florianópolis. 2006. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina - Centro Tecnológico, p. 17-21.
- [30] MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Quím. Nova*, v. 24, p. 87-92, 2001.
- [31] LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C.; SILVEIRA, C. C. “Green Chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quím. Nova*, v. 26, nº.1, p.123-124, 2003.
- [32] SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JONES, J.J. Desenvolvimento sustentável e Química Verde. *Quím. Nova*, v. 28, nº.1, p.103-104 e 110, 2005.
- [33] MORENO, P., SALVADO, V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 870, p. 209, 2000.
- [34] MENDOZA, B. R.; PONS, S. M.; BARGALLÓ, A.I. C.; SABATER, M.C. L. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. *J. Chromatogr. A*, v.1018, p.199, 2003.

- [35] PO, E S. M.; HO, J. W.; GONG, B. Y., Simultaneous chromatographic analysis of eight fat-soluble vitamins in plasma. J. Biochem. Biophys. Methods, v. 34, p. 101, 1997.
- [36] YAKUSHINA L.; TARANOVA, A. Rapid HPLC simultaneous determination of fat-soluble vitamins, including carotenoids, in human serum. J. Pharma. Biome. Anal., v. 13, no. 4/5, p. 716, 1995.
- [37] ZAMARRENO, M.M.D.; PEREZ, A. S.; RODRIGUEZ, M. S.; PEREZ, M.C. G.; MENDEZ, J. H. Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection. Talanta, v. 43, p.1559-1561, 1996.
- [38] DORES, S. M. C.; PAIVA, S. A. R.; CAMPANA, A.O. Vitamina K: Metabolismo e Nutrição. Rev. Nutr., Campinas, v.14, nº 3, p. 209, 2001.
- [39] MATTILA, P. H.; PIIRONEN, V. I.; RAUVA, E. J. U.; KOIVISTOINEN, P. E. New analytical aspects of vitamin D in foods. Food Chem., v. 57, No. 1, p. 95, 1996.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)