

Análise de Vitamina A em Leite por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Analysis of vitamin A in milk by High Performance Liquid Chromatography

Maria Thaís Bezerra Vasconcelos, Yuri Mouzinho Ramos Tanaka, Zuleide Mirele
Barbosa de Arruda, Clayton Anderson de Azevedo Filho*

Centro Universitário Tabosa de Almeida, Pernambuco, Brasil

* Correspondência eletrônica: claytonfilho@asces.edu.br. Endereço: Avenida Portugal, 584, Bairro
Universitário, Caruaru/PE – Brasil. CEP: 55016-901.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação da vitamina A em amostras de leite. Sabe-se que esta vitamina é importante na manutenção de determinadas funções no corpo e a ausência desta pode provocar doenças de carência, como na xerofthalmia por exemplo. A análise da vitamina em matrizes alimentares consideradas fontes desta vitamina é extremamente importante para garantir na dieta a presença desta substância em quantidades adequadas. Neste estudo, desenvolveu-se um método isocrático (100% metanol) em coluna de fase reversa C18 (150 X 4,6mm, 5µm) por CLAE. Obteve-se uma curva de calibração com coeficiente linear $R= 0,9993$ e faixa de linearidade entre 1 e 30µg/mL. Extração líquido-líquido com solventes orgânicos foi realizado em amostras de leite e a repetibilidade e precisão intermediária a partir dessas amostras foram determinadas em dois diferentes dias de análise. Os resultados foram comparados com os valores dos rótulos (quando aplicável). O método mostrou-se adequado para a análise quantitativa da vitamina A.

Palavras-Chave: CLAE; Vitamina A; Leite.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop an analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of vitamin A in milk samples. We know that this vitamin is important to maintaining some functions in the body and the absence of the vitamin can cause lack's diseases, as in xerophthalmia for example. The analysis of the vitamin in food matrices considered sources of this vitamin is extremely to guarantee in the diet the presence of this substance in adequate amounts. In this study, an isocratic (100% methanol) method was developed in a C18 reverse phase column (150 X 4.6mm, 5 μ m) by HPLC. A calibration curve with linear coefficient R = 0.99993 and linearity range between 1 and 30 μ g / mL was obtained. Liquid-liquid extraction with organic solvents was performed on milk samples and the repeatability and intermediate accuracy from these samples were determined on two different days of analysis. The results were compared with the values of the labels (where applicable). The method was suitable for the quantitative analysis of vitamin A.

Keywords: HPLC, vitamin A, milk.

INTRODUÇÃO

Vitaminas são micronutrientes essenciais para as diversas funções do organismo, classificadas em lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) e hidrossolúveis (vitaminas do complexo B e vitamina C (CASERTA, PILOTO, 2016).

Dentre as vitaminas lipossolúveis destaca-se a vitamina A, componente importante para o desenvolvimento da visão, na expressão gênica, no crescimento e desenvolvimento físico, na conservação da integridade celular e no sistema imunológico (GURGEL, et al, 2016). Essa vitamina pode ser encontrada apenas em tecidos animais, tendo o fígado, óleo de fígado de peixes, leites integrais e derivados, ovos e carnes de aves como principais fontes (DIAS, et al, 2017).

A deficiência de vitamina A (DVA) pode levar a desordens como: cegueira noturna, xeroftalmia, assim como anemia e uma baixa resistência a infecções (GRILO, et al, 2014), porém, em excesso pode acumular-se no organismo e alcançar níveis tóxicos (SOUSA, 2016). A causa principal da deficiência de vitamina A está voltada à dieta cronicamente insuficiente da mesma, que pode desencadear baixos estoques corporais o que gera falha em atender as necessidades fisiológicas (KURIHAYASHI, et al, 2015).

Dentre as carências nutricionais mais importantes do ponto de vista epidemiológico, a carência de vitaminas é considerada a principal no contexto de saúde pública em todo o mundo (SUCUPIRA, et al, 2012). A DVA é considerada um problema emergente na saúde pública que afeta principalmente os países subdesenvolvidos, contribuindo de forma significativa para o aumento da morbidade e mortalidade em populações de risco. No Brasil, há significativa prevalência de DVA em crianças em idade pré-escolar, recém-nascidos, gestantes e nutrízes (PAIVA et al, 2011). No mundo, a cegueira noturna afeta 5,2 milhões de crianças em idade pré-escolar e 9,8 milhões mulheres grávidas, que corresponde a 0,9% e 7,8% da população em risco de DVA (WHO, 2009).

Segundo Ricker e Schellenberger (2002) uma análise quantitativa e qualitativa de vitaminas é de grande importância para a ciência médica e alimentar. Todavia, a análise de vitaminas faz-se necessário ser executada com métodos analíticos de alta precisão, uma vez que, esses nutrientes tem grande potencial de isomerização que rapidamente conduz a perda parcial ou total do valor vitamínico em condições extrema de pH, e elevadas temperaturas e oxi-redução (PAIXÃO & STAMFORD, 2003).

Uma das técnicas primordiais usadas para quantificar vitaminas lipossolúveis e seus isômeros é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), considerando a sua versatilidade, robustez e capacidade para analisar, ao mesmo tempo, várias vitaminas lipossolúveis, em menor tempo de análise, com sensibilidade, especificidade e automação (DIAS, et al, 2017). Diversos trabalhos vêm sendo encontrados na literatura em relação à utilização da CLAE para análises de

vitaminas lipossolúveis, em especial a vitamina A (SIERRA, 2007) (DONATO, 2004) (DIAS et al, 2017). Giacomini (2006) validou um método de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de vitamina A em concentrados multivitamínicos para nutrição animal. Grilo e colaboradores (2015) avaliaram os níveis de vitamina A através de concentrados de retinol no colostro e condições de jejum e pós-prandial utilizando a mesma técnica. Netto e colaboradores (2012) identificaram os fatores associados à concentração de retinol em lactantes atendidos em um serviço público de saúde utilizando a CLAE como método analítico.

Tendo em vista a importância da vitamina A para manutenção e desenvolvimento do organismo e o amplo consumo de leite, principalmente industrializados, inclusive fortificados e enriquecidos, faz-se necessário quantificar esta vitamina nessas matrizes alimentícias, considerando que o leite é uma das suas principais fontes de fornecimento. Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo identificar e quantificar a vitamina A em amostras de leite industrializados.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Metanol (J.T. Baker), acetato de etila (Vetec), hexano (Vetec), éter etílico (Vetec) e clorofórmio (Vetec) foram adquiridos em grau HPLC. Água ultrapura foi obtida pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore). A vitamina A na forma de palmitato de retinila (Sigma) utilizada foi um padrão grau HPLC.

EQUIPAMENTO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada na Central de Caracterização de Alimentos, Medicamentos e Suplementos (CQ-AMOS) do Departamento de Nutrição da UFPE. O sistema cromatográfico utilizado foi um Shimadzu Prominence (Shimadzu), com um detector por arranjo de diodo (DAD) modelo SPD-20AV, bomba quaternária modelo LC-20 AT, forno modelo CTO-20AC, autoinjeter modelo SIL-20AC. O sistema foi controlado por um módulo controlador modelo CBM-20A e operado pelo *software* LC Solution™ (versão 1.25, Shimadzu). A eluição da vitamina A foi realizada em uma coluna C18 150mm × 4.6mm 3.5µm (Phenomenex). O padrão e amostras foram monitorados em comprimentos de onda de $\lambda = 326\text{nm}$.

A fase móvel utilizada para análise da vitamina A foi 100% metanol, em eluição isocrática e tempo total de corrida de 15min. O fluxo foi mantido em 1mL/min e a temperatura da coluna em 35°C. O volume da amostra injetado foi de 20µL.

PREPARAÇÃO DO PADRÃO E DAS AMOSTRAS

Solução estoque da vitamina A (palmitato de retinila) foi preparada dissolvendo 0,005g do padrão em 10mL de metanol. Uma solução padrão de trabalho com concentração (10µg/mL) foi obtida por diluição, a partir da solução estoque, e utilizada para realizar os testes de adequabilidade do método.

Diluições apropriadas da solução estoque foram realizadas também a fim de obter as soluções para a construção da curva de calibração. Após a preparação, cada solução era levada a um banho ultrassom lavadora (modelo Ultrasonic Cleaner – UNIQUE) por um período de 10min.

Leite líquido em pó (dois lotes de cada) foram comprados em um mercado local. O pré-tratamento para a quantificação do palmitato de retinila nas amostras foi conduzido segundo a metodologia descrita por Blanco e colaboradores (1994) com algumas modificações, procedendo-se da seguinte maneira: 3mL da amostra de leite líquido foi colocado num tubo de centrífuga de 15mL; em seguida, foram adicionados 4mL de água e 4mL da solução extratora (testados os solventes: hexano; hexano-acetato de etila; éter etílico; clorofórmio) e agitado num vórtex; o tubo foi levado a uma centrifugada a 3500 rpm por 30min; a camada superior foi transferida para um tubo de ensaio e evaporado em fluxo de ar; após a secagem, o material foi reconstituído com metanol e filtrado em filtro de teflon 0,22µm e levado ao cromatógrafo. Para o leite em pó, pesou-se 4 gramas da amostra e diluiu-se em 4mL de água; em seguida o procedimento descrito para amostras líquidas foi aplicado ao leite em pó dissolvido..

MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para o desenvolvimento da metodologia analítica utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 e foram testadas diferentes composições de fases móveis (acetonitrila, metanol e misturas de acetonitrila-metanol, acetonitrila-água e metanol-água) a fim de obter separação dos interferentes nas amostras e tempo de retenção satisfatório do palmitato de retinila, tanto da solução padrão quanto nas amostras. Como protocolo inicial, propôs-se o método desenvolvido por Heudi e Trisconi (2004) com algumas modificações e fluxo de 1 mL/min.

A curva de calibração foi construída a partir de cinco pontos, em concentrações entre 1 e 30 µg/mL. Os parâmetros de validação foram determinados seguindo as recomendações da ANVISA (2017), que compreende: linearidade, intervalo, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetibilidade e precisão intermediária.

O software utilizado para realizar o tratamento estatístico foi o Origin v.8.5 (Originlab).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições cromatográficas foram selecionadas para assegurar uma separação adequada do palmitato de retinila em condições isocráticas com baixo consumo de solventes. A Figura 1 mostra o cromatograma da vitamina A na melhor condição de análise encontrada. O tempo de retenção médio registrado foi de $t_R = 9,30 \pm 0,01$ min.

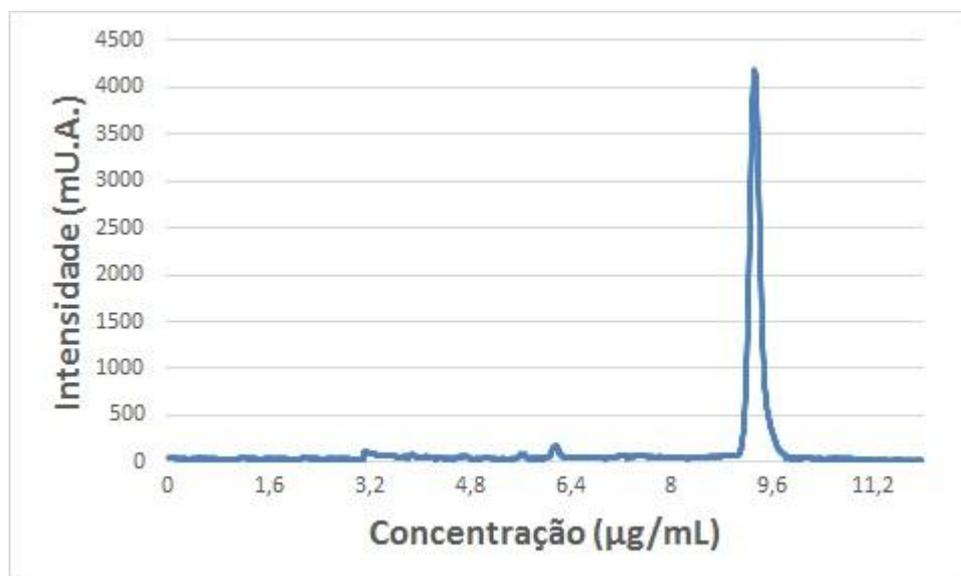


Figura 1. Cromatograma da solução padrão de palmitato de retinila 9µg/mL.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros da curva de calibração como parte da validação intermediária do método. Como pode ser observado, foi obtido linearidade de $R=0.9997$ no intervalo de concentração de trabalho. O LD e LQ obtido foi compatível com os de outras metodologias aplicando detecção por DAD.

Tabela 1. Parâmetros da regressão linear obtidos da curva de calibração da vitamina A.

PARÂMETROS	VALORES
Intervalo	1 - 30µg/mL
Coefficiente angular	86357
Coefficiente linear	80182
Regressão	0.9993
LD	1,56 µg/mL
LQ	4,72 µg/mL

A Figura 2 mostra a curva de calibração obtida para a determinação da concentração do palmitato de retinila nas amostras de leite.

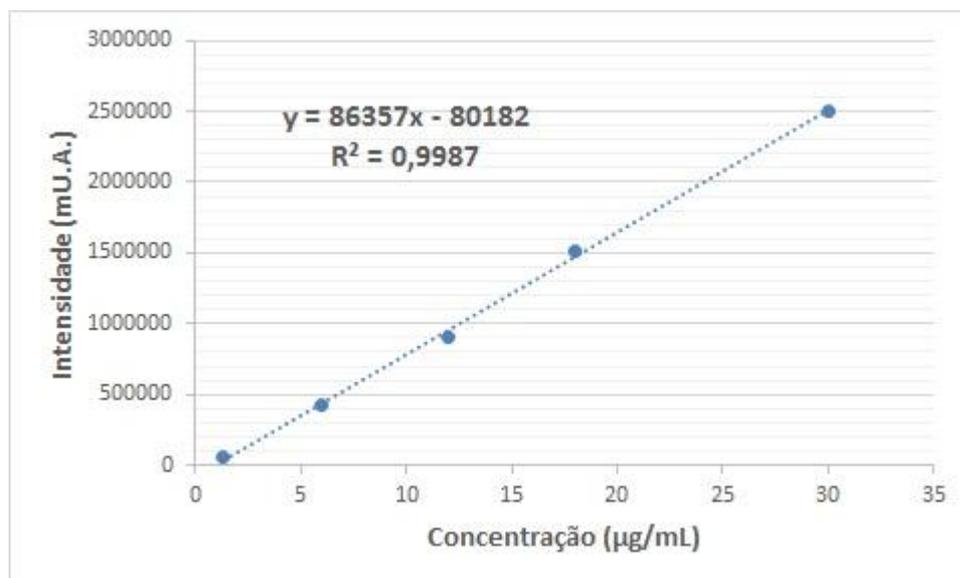


Figura 2. Curva de calibração para a determinação da vitamina A.

Os dados da Tabela 2 mostram os valores da quantificação da vitamina A nas amostras de leite líquido e em pó. Os resultados foram comparados aos valores dos rótulos dos produtos, sendo estes 220µg/100mL para o leite líquido e 372µg/100g para o leite em pó.

Tabela 2. Valores de quantificação das amostras de leite líquido e leite em pó (em µg/mL).

	DIA 1		DIA 2	
	L Liq	L Po	L Liq	L Po
	9.44	9.42	9.5	10
	9.96	9.43	9.49	9.23
	10.24	10	9.34	9.21
Média	9.96	9.43	9.49	9.23
Desvio Padrão	0.41	0.33	0.09	0.45
Coefficiente de Variação (%)	4.08	3.52	0.94	4.88

*L Liq = Leite líquido; L Po = Leite em pó.

Repetibilidade e precisão intermediária foram determinadas pelas medidas em triplicata do palmitato de retinila para cada amostra de leite após o tratamento pré-analítico, para 2 dias no mesmo nível de concentração, conforme pode ser observado na Tabela 2. Os coeficientes de variação obtidos foram entre CV(%) = 4.08 e 0.94% para leite líquido e CV(%) = 3.52 e 4.88% para leite em pó. Esses valores mostram que o método foi preciso e apresentou significativa repetibilidade, uma vez que o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas nas mesmas condições apresentou coeficientes de variações abaixo de 5% em ambos os dias. Além de provar ser um método válido, testes por ANOVA mostraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para leite líquido e leite em pó (p-valor < 0,001).

Quando comparados aos valores dos rótulos e experimentais, as diferenças entre os valores não foram significativas (p-valor <0,001) para ambos os leites. Acredita-se que, devido a adição de vitamina A feita no leite em pó seja controlada, uma vez que o mesmo é enriquecido, este processo gera menor variabilidade, quando comparado o valor de concentração ao rótulo. Já no leite líquido, embora não haja variação estatisticamente significativa, verifica-se maior diferença no coeficiente de variação (Tabela 2) e que podem estar associada ao processamento do leite ou à origem do leite.

CONCLUSÃO

O método de análise da vitamina A desenvolvido neste trabalho foi pré-validado. Este método mostrou-se adequado nos parâmetros de linearidade, intervalo de concentração (entre 1 e 30µg/mL), precisão intermediária, repetibilidade, limites de detecção e quantificação. Portanto, o método é bastante útil para o processo de controle de qualidade do palmitato de retinila em leite, tanto líquido quanto em pó.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Multiusuário CQ-AMOS do Departamento de Nutrição da UFPE, por disponibilizar o laboratório para realização das pesquisas.

REFERÊNCIAS

CASERTA, L; PIOLOTO, J. A. R. Excessive consumption of vitamin products: a review. **Revista Uningá**. V. 47, p. 84-88. Paraná, 2016.

DIAS, S. S. *et al.* Obtenção de padrão analítico de retinol a partir de fígado bovino por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Semioses**, Rio de Janeiro, v. 11, n.03, p. 38-43, 2017.

DONATO, E.M. CLAE-PI aplicada ao doseamento de vitaminas do complexo B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 40. Rio Grande do Sul, 2004.

GIACOMINI, L. Z. **Quantificação de Vitamina A em concentrados polivitamínicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. 64 f. Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2006.

GRILO, C. E. *et al.* Effect of maternal vitamin A supplementation on retinol concentration in colostrum. **J Pediatr**. Rio de Janeiro, p. 91-81. 2015.

KURIHAYASHI, A. Y. *et al* . Estado nutricional de vitaminas A e D em crianças participantes de programa de suplementação alimentar. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 31, n. 3, p. 531-542, Mar. 2015 .

MORENO, P. SALVADÓ, V. Determination of eight water and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography**, v. 870, p. 96-105, 2004.

NETTO, M. P. et al. Estado nutricional de ferro e sua associação com a concentração de retinol sérico em criança. **HU Revista**. V. 38, n. 3 e 4, p. 215-221. Viçosa, 2012.

PAIVA, A.A. de. *et al*. Brazilian Vitamin A Supplementation Program in Paraíba State: an analysis from the narrative of the Family Health Program Team. **Epidemiol. Serv. Saúde** v.20 n.3. Brasília, 2011.

PAIXÃO, J.A; STAMFORD,T.L.M. Vitaminas Lipossolúveis em Alimentos – Uma Abordagem Analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1 p. 96-105, 2004.

SIERRA, N. et al. Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de vitaminas A, D3 y E en inyectables de uso veterinario. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 43, n. 4, p. 623-630. São Paulo. 2007.

SOUSA, S. M. de. **A vitamina D e o seu papel na prevenção de doenças**. 2016. 57 f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

SUCUPIRA, N. R. et al. Perdas Vitamínicas Durante o Tratamento Térmico de Alimentos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**. Ceará, 2012.

World Health Organization. **Global Prevalence of Vitamin A deficiency in Population at risk 1995- 2005**, WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. Geneva: World Health Organization, 2009.