

# **ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DE VITAMINA A EM LEITE E POLIVITAMÍNICO ATRAVÉS DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL**

Mayane Ribeiro dos Santos Menezes Souza<sup>a</sup>; Yêda Sandrine Farias da Silva<sup>a</sup>; Carla Danielle de Carvalho<sup>a</sup>; Clayton Anderson de Azevedo Filho<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade ASCES, 55016-901, Caruaru - PE, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife – PE, Brasil

\* e-mail: claytonazevedo@hotmail.com

## **RESUMO**

A vitamina A desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do corpo, em especial a visão e sistema imunológico. Pode ser de origem natural ou sintética. Diversos trabalhos mostram a viabilidade da quantificação através de diferentes técnicas analíticas, porém algumas dificuldades ainda não foram superadas, por exemplo, as condições de extração. Além do mais, não existe uma metodologia de extração definida que seja adequada para todo tipo de matriz, uma vez que o método se adequa à natureza desta. O objetivo desse trabalho foi avaliar, através de um planejamento fatorial  $2^3$  as condições de extração da vitamina A pelo método de saponificação quando variados o tempo de reação, a concentração de KOH e o volume de uma solução extratora composta por hexano-acetato de etila (80:20 v/v). A concentração da vitamina extraída foi utilizada como resposta para o planejamento após a determinação por HPLC (coluna C18, 150 x 4,6mm). O método isocrático, com fase móvel metanol:acetoneitrila (90:10), após ajustado, teve como tempo de análise 5 min e retenção do retinol de 3,5min. A linearidade da curva de calibração, obtida por padrão externo, foi entre 0,1 a 600 µg/mL. Verificou-se uma resposta máxima de extração do polivitamínico e do leite influenciadas pela concentração de KOH, para ambas as matrizes, e o volume da solução extratora e a interação desta com o tempo para o polivitamínico. A relação entre a amostra e o volume de solução de saponificação não foi significativo (p-valor=0,1). Embora os resultados corroborem com aqueles já relatados na literatura, faz-se necessário novos estudos a fim de verificar a influência da natureza da matriz, da solução extratora e da concentração do KOH a fim de verificar o comportamento da extração.

Palavras-chave: Vitamina A, Cromatografia Líquida, Planejamento Fatorial.

## **ABSTRACT**

Vitamin A plays essential role in the body development, in particular, vision and immune system. This compound can be obtained from synthetic or natural source. Several works show the viability of quantification through different analytical methods, however some difficulties still have not been overcome, for example, extraction conditions. Furthermore, there is no one extraction methodology defined to be suitable for every type of matrix. The aim of this study was to evaluate, through factorial design  $2^3$  the extraction of vitamin A through saponification technique when KOH concentration, reaction time and volume of extractive solution are modified. The concentration of vitamin extracted was used as response. The analysis were performed by HPLC (C18, 150 x 4.6mm). Isocratic condition with mobile phase methanol: acetonitrile (80:20) results in run time of 5 min with retention time of 3,5min to retinol. The linearity of the calibration curve obtained by external standard was 0.1 to 600  $\mu\text{g/mL}$ . The maximum response obtained was found to both matrixes when KOH concentration was 10% (w/v), however to polivitamin matrix the volume of extractive solution and its interaction with the reaction time were statistically significant (p-value = 0,1). The results corroborate with others reported in the literature, but the results achieved in this work suggest model adjustments and investigation of the influence of matrix effect and solvents in the extraction.

Key words: Vitamin A, HPLC, Factorial Design.

## **INTRODUÇÃO**

Vitaminas lipossolúveis são compostos químicos heterogêneos necessários às funções bioquímicas e fisiológicas dos organismos<sup>1</sup>. Dentre essas, a vitamina A se destaca por desempenhar um papel essencial na diferenciação e manutenção das células epiteliais e adequada função imunológica, além de ser biologicamente ativa no desenvolvimento da visão e crescimento e reprodução das espécies<sup>2</sup>. A deficiência desse composto no organismo induz o surgimento das doenças de carência, já o excesso pode causar efeitos tóxicos<sup>1-3</sup>.

Embora imprescindível para algumas funções biológicas, a vitamina A é instável e apresenta significativa sensibilidade quando exposta à luz<sup>4</sup>. A extensão de perdas da vitamina A em alimentos e suplementos alimentares ainda é mensurada de forma incipiente devido às limitações metodológicas<sup>5</sup>.

Diversos autores mostram a viabilidade da quantificação através de diferentes técnicas analíticas, porém algumas dificuldades ainda não foram superadas, por exemplo, as condições de extração e a reprodutibilidade na quantificação<sup>6</sup>. Estudos relatam ainda uma variação quanto ao rendimento em diferentes matrizes através dos diferentes métodos propostos<sup>7</sup>. Além do mais, não existe uma metodologia de extração definida que seja adequada para todo tipo de matriz, uma vez que o método se adequa à natureza da matriz<sup>8</sup>.

Diversos interferentes das matrizes podem influenciar nos resultados das análises, no que diz respeito à extração, por exemplo, o teor de gordura e fibras e a forma física (líquida ou sólida), sendo muitas vezes necessário submeter ao processo de saponificação para desprender a vitamina<sup>9</sup>.

Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas como a extração em fase sólida e a micro extração em fase sólida<sup>10</sup>. Apesar do desenvolvimento dessas técnicas, a extração líquido-líquido continua sendo a mais empregada por ser uma técnica simples, que não exige instrumentação sofisticada, e de fácil execução<sup>7-10</sup>.

Quanto aos métodos de análise, também são relatados na literatura a eletroforese capilar, espectrofotometria UV-visível, fluorimetria e colorimetria, porém, essas técnicas são muitas vezes complexas, consomem tempo e apresentam baixa estabilidade.

A técnica de HPLC vem sendo bastante empregada para a quantificação da vitamina A, pois pode ser executada sem necessidade de reação prévia, utiliza detecção por UV ou fluorescência, apresenta praticidade da técnica além da otimização do tempo<sup>10</sup>. Apesar dessas vantagens, o custo de análise é alto e a operacionalização do equipamento não é simples.

Diversos autores relatam a aplicação desta técnica em alimentos, tais como leite em pó, leite humano e cereais, e medicamentos como polivitamínicos, além de ração animal, suplementos alimentares e fluidos biológicos<sup>11</sup>.

Mesmo com diversas aplicações, alguns questionamentos permanecem sem resposta quanto às condições ideais da etapa de preparação da amostra, em especial aqueles relativos à extração, tais como: o tipo da extração, a relação de quantidade entre a amostra e o solvente e o tempo de extração<sup>9-11</sup>.

Diante do exposto o presente trabalho tem por objetivo avaliar as condições de extração da vitamina A em leite e polivitamínico, ambas matrizes líquidas, através de um planejamento fatorial.

## **METODOLOGIA**

### **MATERIAIS**

Etanol (Vetec), acetonitrila (J.T. Baker), pirogalol (Sigma), hidróxido de potássio (Vetec), hexano (Tedia), éter etílico (Vetec), acetato de etila (Vetec), metanol (J.T. Baker) e retinol (Sigma) foram adquiridos em grau HPLC e água ultrapura foi obtida pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore).

### **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 do retinol foi realizada em uma coluna C18 150mm × 4.6mm 3.5µm (Phenomenex). Os padrões e amostras foram monitorados em comprimentos de onda entre  $\lambda = 326\text{nm}$ .

A fase móvel utilizada foi metanol-acetonitrila 80:20 v/v, em eluição isocrática e tempo total de corrida de 5 min. O fluxo da corrida foi mantido em 1mL/min e a temperatura da coluna em 25°C. O volume da amostra injetado foi de 10µL.

### **PREPARAÇÃO DO PADRÃO E DAS AMOSTRAS**

A solução estoque do Retinol foi preparada dissolvendo 0,01g do padrão em 10 mL de acetonitrila. A solução padrão (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 por um período de 5min.

Leite e polivitamínico foram comprados em estabelecimentos comerciais. O pré-tratamento para extração foi conduzido da seguinte maneira, obedecendo aos parâmetros pré-estabelecidos no planejamento fatorial: em um tubo de ensaio com tampa rosqueada, foram adicionados 0,2mg de pirogalol, 1ml da amostra de leite ou 200µL de polivitamínico e 10ml da solução etanólica de KOH 2, 6 ou 10% (m/v). Após

fechado o tubo, o sistema foi deixado sob agitação (agitador magnético) por tempos de 2, 10 ou 18h. Uma mistura dos solventes acetato de etila:hexano (80:20 v/v) foi utilizada como solução extratora em diferentes volumes (10, 15 ou 20mL).

A quantificação da vitamina A foi realizada através da determinação da área do pico referente ao composto no cromatograma da amostra, utilizando-se a reta da regressão obtida curva de calibração.

O tratamento estatístico do planejamento fatorial e curva de calibração foi realizado no software Statistica v.7.0 (Statsoft).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições cromatográficas foram selecionadas para assegurar uma adequada separação da vitamina A em condições isocráticas com baixo consumo de solventes. A Figura 1 mostra o cromatograma do retinol na melhor condição de análise encontrada. O tempo de retenção médio registrado foi de  $t_r = 3,54 \pm 0,10$  min.

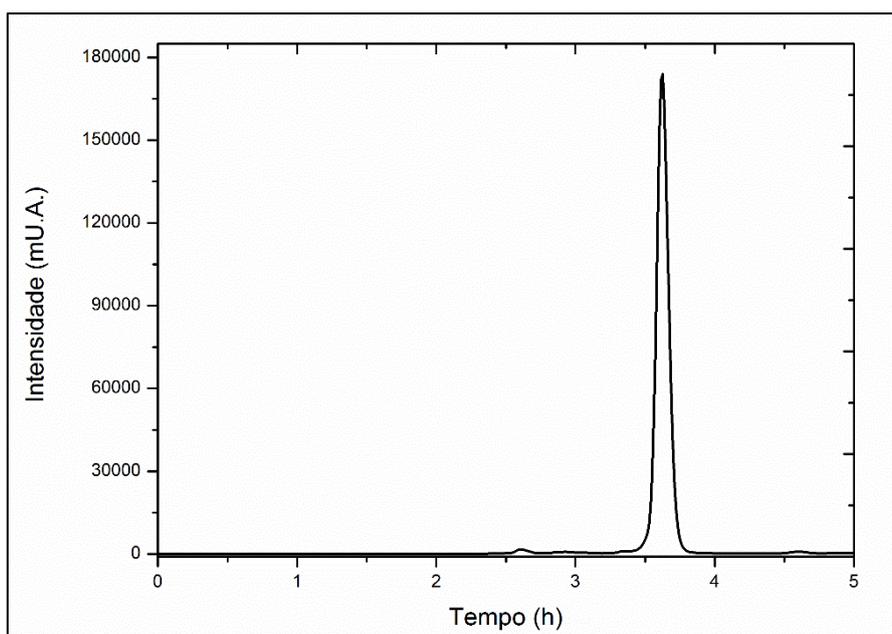


Figura 1. Cromatograma do padrão de retinol 10µg/mL.

A Figura 2 apresenta os parâmetros da curva de calibração para a determinação da concentração de vitamina A nas amostras. Como pode ser observado, foi obtido linearidade de  $R=0.9998$  no intervalo de concentração de trabalho.

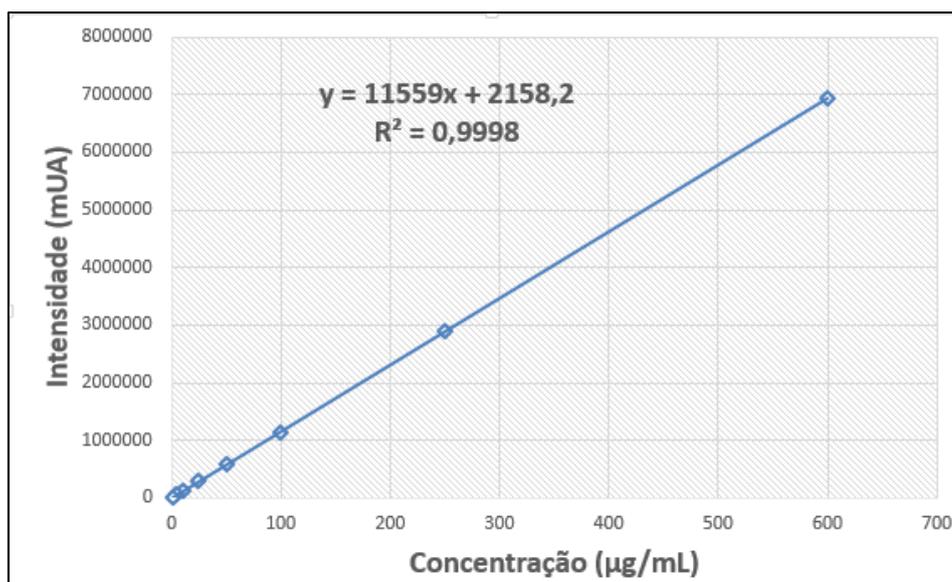


Figura 2. Curva de calibração da vitamina A (retinol).

Um planejamento fatorial  $2^3$  com dois pontos centrais totalizaram em dez experimentos para os processos de saponificação e extração em cada matriz estudada, sendo cada teste analisado separadamente. Os níveis de cada parâmetro foram estabelecidos de acordo com estudos preliminares, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis utilizadas no planejamento factorial.

Variables	-1	0	+1
Concentração de KOH (%)	2	6	10
Tempo de agitação (h)	2	10	18
Volume de solução extratora (mL)	10	15	20

As concentrações de vitamina A obtidas como respostas para cada matriz estudada, são mostrados na Tabela 2. Ainda nesta tabela, pode-se verificar que, de acordo com a combinação dos níveis das variáveis, a concentração de vitamina A extraída variou entre 0,73 a 27,82µg/mL para o Leite e 108,06 a 543,33µg/mL para o polivitamínico.

Tabela 2 – Valores codificados e concentrações de vitamina A obtidas como resposta.

Ensaio	Nível			Resposta	
				*Pvit.	Leite
1	-1	-1	-1	108,06	0,73
2	-1	-1	1	283,08	1,59
3	-1	1	-1	248,92	8,12
4	-1	1	1	128,36	11,48
5	1	-1	-1	283,08	12,1
6	1	-1	1	503,51	14,69
7	1	1	-1	446,28	20,63
8	1	1	1	543,33	27,82
9	0	0	0	347,04	3,28
10	0	0	0	360,60	2,44

\*Pvit. = polivitamínico

Observou-se que a concentração de KOH em ambas as matrizes foi estatisticamente significativo, porém no polivitamínico o volume da solução extratora e sua interação com o tempo de agitação também foram significativos. A estimativa dos coeficientes dos pontos, intervalo e teste de hipótese são mostrados na Tabela 3 para o Leite e Tabela 4 para o Polivitamínico, nas quais são mostrados apenas os efeitos estatisticamente significativos ( $\alpha=0.10$ ).

Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-90,%	+90,%
<b>Mean/Interc.</b>	10,28800	2,151294	4,782237	0,017383	5,2252	15,35078
<b>(1)[KOH]</b>	13,33000	4,810440	2,771056	0,069507	2,0093	24,65071
<b>(2)Tempo</b>	9,73500	4,810440	2,023723	0,136166	-1,5857	21,05571
<b>(3)Vol. Sol Ext</b>	3,50000	4,810440	0,727584	0,519510	-7,8207	14,82071
<b>1 by 2</b>	1,09500	4,810440	0,227630	0,834565	-10,2257	12,41571
<b>1 by 3</b>	1,39000	4,810440	0,288955	0,791433	-9,9307	12,71071
<b>2 by 3</b>	1,77500	4,810440	0,368989	0,736640	-9,5457	13,09571

Tabela 3. Estimativa dos coeficientes dos pontos, intervalo e teste de hipótese dos coeficientes para o Leite.

<b>Factor</b>	<b>Effect</b>	<b>Std.Err.</b>	<b>t(3)</b>	<b>p</b>	<b>-90,%</b>	<b>+90,%</b>
<b>Mean/Interc.</b>	325,226	13,95539	23,30469	0,000173	280,814	369,6383
<b>(1)[KOH]</b>	251,945	31,20519	8,07382	0,003970	152,636	351,2538
<b>(2)Tempo</b>	47,290	31,20519	1,51545	0,226907	-52,019	146,5988
<b>(3)Vol. Sol Ext</b>	92,985	31,20519	2,97979	0,058607	-6,324	192,2938
<b>1 by 2</b>	54,220	31,20519	1,73753	0,180686	-45,089	153,5288
<b>1 by 3</b>	65,755	31,20519	2,10718	0,125703	-33,554	165,0638
<b>2 by 3</b>	-104,740	31,20519	-3,35649	0,043847	-204,049	-5,4312

Tabela 4. Estimativa dos coeficientes dos pontos, intervalo e teste de hipótese dos coeficientes para o Polivitamínico.

Os resultados da análise de variância apresentados na Tabela 5 para o Leite e Tabela 6 para o Polivitamínico mostram que o valor do F calculado para a regressão de cada planejamento foi significativo apenas para a concentração de KOH na primeira matriz e na segunda, além da concentração do KOH, o volume do solvente extrator e a sua interação com o tempo de agitação, e a variância explicada pelos modelos foram aproximadamente 49,3% e 87% para o Leite e o Polivitamínico, respectivamente. Isso significa que ambos os modelos precisam de ajustes, em especial o processo de extração do Leite.

Tabela 5. Análise de variância para o Leite.

<b>Source of Variation</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>[KOH]</b>	355,3778	1	355,3778	7,779597	0,023588
<b>Error</b>	365,4460	8	45,6807		
<b>Total SS</b>	720,8238	9			

Tabela 6. Análise de variância para o Polivitamínico.

<b>Source of Variation</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>(1)[KOH]</b>	126952,6	1	126952,6	30,66200	0,001463
<b>(3)Vol. Sol Ext</b>	17292,4	1	17292,4	4,17652	0,087003
<b>2 by 3</b>	21940,9	1	21940,9	5,29925	0,060932
<b>Error</b>	24842,3	6	4140,4		
<b>Total SS</b>	191028,3	9			

Os fatores que influenciaram na extração da vitamin A resultaram no gráfico de superfície de resposta para cada matriz (Leite e Polivitamínico) apresentados na Figura 3 e 4.

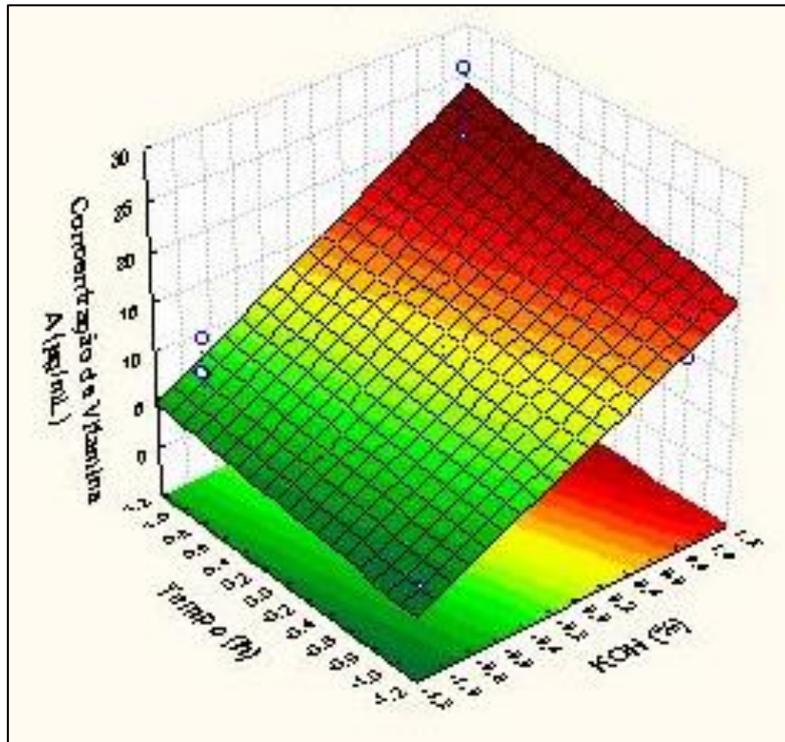


Figura 3. Gráfico de superfície de resposta do Leite.

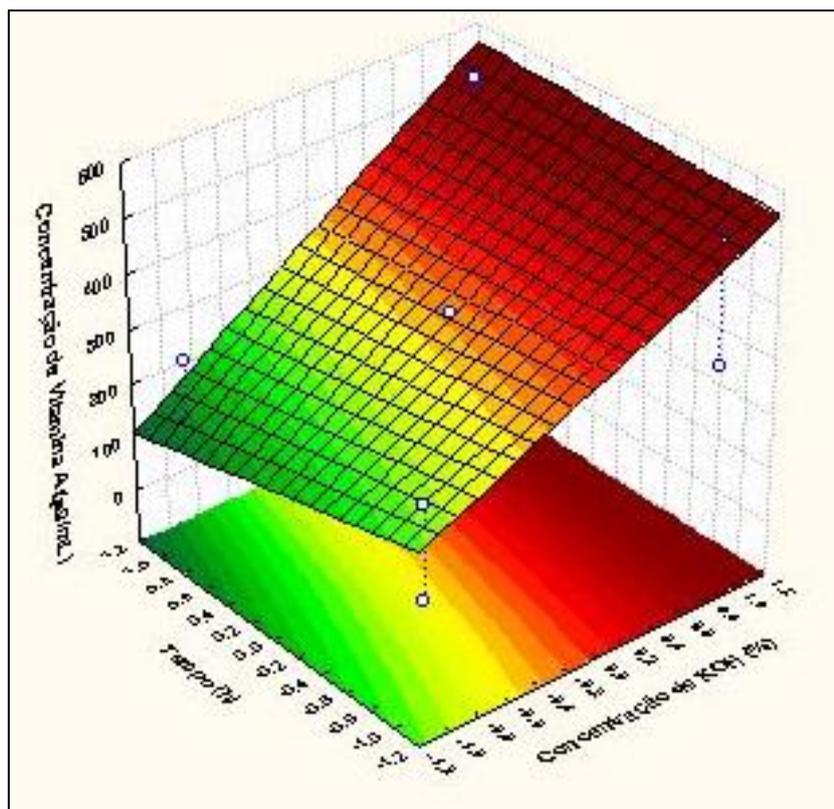


Figura 4. Gráfico de superfície de resposta do Polivitamínico.

É possível verificar através da superfície e contorno das curvas que o máximo de intensidade de resposta pode ser alcançada quando a concentração de KOH é de 10%, de acordo com as condições estabelecidas neste trabalho.

## CONCLUSÃO

Os resultados para ambas as matrizes mostraram que o fator que mais influencia na extração da vitamina A é a concentração percentual de KOH da solução de saponificação. Os modelos matemáticos gerados pelos coeficientes da matriz dos efeitos não podem ser utilizados como modelo, pois em ambas as matrizes, a falta de ajuste foi significativa. Embora os resultados estejam de acordo com aqueles já relatados na literatura, faz-se necessário novos estudos a fim de verificar a influência da natureza da matriz, da solução extratora e da concentração do KOH a fim de verificar o comportamento da extração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mirtallo J.; Canada T.; Johnson D.; Kumpf V.; Petersen C.; Sacks G.; Seres D.; Guenter P.; **J. PARENTER. ENTERAL NUTR.** 2004, 28, S39.
2. Koletzko B.; Goulet O.; Hunt J.; Krohn K.; Shamir R.; **CLINICAL NUTRITION** 2005, 24, S1105.
3. Shulman R.J.; Sarah P.; **JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION** 2003, 36, S587.
4. Vazquez R.; Rotival R.; Calvez S.; Hoang M.; Graffard H.; Guyon F.; **CHROMATOGRAPHIA** 2009, 69, S629.
5. . Allwood M.C; Kearney M.C.; **NUTRITION** 1998, 14, S697.
6. Driscoll D.F.; **CURR OPIN CLIN NUTR METAB CARE** 2005, 8, S297.
7. Klejdus B.; Petrlová J.; Potěšil D.; Adam V.; Mikelová R.; Vacek J.; Kizek R.; Kubáň V.; **ANALYTICA CHIMICA ACTA** 2004, 520, S57.
8. Jin P.; Xia L.; Li Z.; Che N.; Zou D.; Hu, J X.; **PHARM BIOMED ANAL** 2012, 70, S151.
9. Heudi O.; Trisconi M.-J.; Blake C.-J.; **JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A** 2004; 1022, S115.
10. Heudi O.; Kiliç T.; Fontannaz P.; **JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A** 2005, 1070, S49.
11. Moreno P.; Salvado V.; **J CHROMATOGR A** 2000, 870, S207.
12. Blanco D.; Pajares M.; Escotet V.J.; Gutiérrez M.D.; **Journal of Liquid Chromatography** 1994, 17, S4513.
13. Blanco D.; Sánchez L.A.; Gutiérrez M.D.; **JourNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY** 1994, 17, S1525.
14. Blanco D.; Fernández M.P.; Gutiérrez M.D.; **THE ANALYST** 2000, 125, S427.
15. Ribeiro D.O.; Pinto D.C.; Lima L.M.; Volpato N.M.; Cabral L.M.; Sousa V.P.; **Nutr J** 2011, 10, S47.
16. Vazquez R.; Hoang M.L.; Martin J.; Yahia Y.A.; Graffard H.; Guyon F.; Do B.; **EUROPEAN JOURNAL OF HOSPITAL PHAMACY SCIENCE** 2009, 15.
17. Such Diaz, A.; Sanchez Gil, C.; Gomis Munoz, P.; HERREROS DE TEJADA, A.. **ESTABILIDAD DE VITAMINAS EN NUTRICIÓN PARENTERAL. NUTR. HOSP.** [online]. 2009, vol.24, n.1, pp. 1-9. ISSN 0212-1611.