



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA



Determinação simultânea, por cromatografia líquida de alta resolução, das vitaminas A, D e E em amostras compostas por diferentes matrizes alimentares

RUTE ALEXANDRA DIAS PAZ

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica – Ramo Química)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutora Maria Celeste Serra

Doutora Maria da Graça Dias

Júri:

Presidente: Doutora Rita Pacheco

Vogais: Doutora Elsa Vasco

Doutora Celeste Serra

Abril de 2018



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA



Determinação simultânea, por cromatografia líquida de alta resolução, das vitaminas A, D e E em amostras compostas por diferentes matrizes alimentares

RUTE ALEXANDRA DIAS PAZ

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica – Ramo Química)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutora Maria Celeste Serra

Doutora Maria da Graça Dias

Júri:

Presidente: Doutora Rita Pacheco

Vogais: Doutora Elsa Vasco

Doutora Celeste Serra

Abril de 2018

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no âmbito do 2º Ciclo em Engenharia Química e Biológica – Ramo de Processos Químicos do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP, sob orientação da Doutora Maria da Graça Dias e da Professora Doutora Maria Celeste Serra.

AGRADECIMENTOS

No momento de escolha do tema de Trabalho Final de Mestrado tinha como pensamento a seleção de um tema/trabalho que envolvesse trabalho laboratorial em grande parte da sua elaboração e, acima de tudo, que me fizesse sentir desafiada e motivada ao longo da sua realização. Aliada à minha vontade de querer arranjar um primeiro emprego, nada melhor do que um tema inserido numa componente de estágio para enriquecer os meus conhecimentos e, acima de tudo, crescer, enquanto pessoa e profissional.

Esta tese de Mestrado tratou-se de uma longa caminhada repleta não só de alegrias e vitórias como também de deceções, incertezas, surpresas e desafios. Para dar rumo a toda esta caminhada, isto é, para tomar as melhores decisões e para escolher o caminho certo, necessitei de muita energia, vontade e motivação, mas não só, necessitei também de bastante paz, sossego e harmonia nos momentos mais cruciais. E foi nesses mesmos momentos que este meu caminho passou de um trabalho individual para um trabalho coletivo, onde várias pessoas participaram nesta caminhada e deixaram a sua marca, estimulando-me intelectual e emocionalmente. E é por essa razão que este espaço é dedicado a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho final.

Deste modo, desejo expressar o meu sincero agradecimento:

- À minha família, especialmente aos meus pais, pois sem eles toda esta viagem de seis anos não teria sido possível. Um enorme obrigada pelo apoio, compreensão, carinho e motivação incondicionais, por todos os ensinamentos de vida, por estarem sempre presentes em todas as etapas da minha vida e por prescindirem de muito do vosso precioso tempo para o dedicarem a mim.

- Ao meu namorado, que tanto me ouviu e ajudou na realização deste trabalho e que me deu sempre força e motivação nas horas mais difíceis, em que me encontrei mais insegura e com mais incertezas. Obrigada por abdicares de tempo comigo para eu realizar este trabalho. Obrigada por acreditares sempre em mim e naquilo que eu faço diariamente. Obrigada por estares sempre comigo, em todos os momentos, bons ou maus.

- À minha amiga Ana, que ao longo destes últimos cinco anos se tornou numa grande amiga, em quem sinto que posso confiar e contar sempre. Obrigada pela tua amizade e por toda a tua paciência para ouvires os meus desabafos.

- Às minhas orientadoras, Doutora Graça e Professora Celeste. O meu profundo agradecimento pela orientação, disponibilidade e apoio incondicional, em todas as fases do trabalho, e por todas as sugestões e conhecimentos que me transmitiram, que em muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, em muito estimularam o meu desejo de querer sempre saber mais e fazer melhor.

- Às minhas colegas de estágio, Filipa e Cláudia. Obrigada às duas pela partilha de momentos engraçados, pelo companheirismo e espírito de entreajuda, fatores extremamente importantes na realização deste trabalho. Mas, em especial, obrigada Filipa pelo teu trabalho, pois sem ele parte deste meu trabalho não seria possível.

- Aos colegas do Departamento de Alimentação e Nutrição, por toda a simpatia e por me terem sempre ajudado e esclarecido nas dúvidas momentâneas que tive e em que precisei de ajuda. Um especial agradecimento ao Francisco, por ser tão prestável e por se encontrar sempre disponível para me ajudar em alguma dificuldade no laboratório, e à Doutora Maria Antónia por me receber com amabilidade e possibilitar a realização deste trabalho durante os meses de trabalho.

- Ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por me ter proporcionado esta experiência tão enriquecedora, que me permitiu estar em contacto com um ambiente profissional e me fez crescer bastante, tanto a nível pessoal como profissional.

“Só aqueles que se arriscam a ir demasiado longe podem descobrir quão longe podem chegar.”

- Anónimo

A todos, um Muito Obrigado.

RESUMO

As vitaminas são essenciais ao metabolismo humano, sendo a alimentação a sua fonte principal. A ingestão de vitaminas em doses inferiores ou superiores ao recomendado resulta, geralmente, em problemas de saúde, pelo que é de grande importância a determinação analítica das vitaminas nos alimentos utilizando métodos validados que permitam a comparação e rastreabilidade dos resultados.

Neste trabalho otimizaram-se os processos de saponificação e extração das vitaminas A e E de matrizes alimentares para diminuir o tempo de análise e o volume de solventes. Otimizaram-se, também, as condições cromatográficas com o objetivo de implementar um método para a determinação simultânea das vitaminas A, E e D. A otimização incidiu sobre dois métodos de HPLC baseados e acreditados pelas normas EN 12821, 12822 e 12823-1. Avaliaram-se a repetibilidade, precisão intermédia e exatidão, recorrendo a amostras de cremes vegetais para barrar, a amostras compostas do projeto TDS Exposure e a materiais de referência.

Os resultados permitiram baixar o tempo de saponificação em 25% e o consumo de solventes de extração em 63%. As novas condições cromatográficas mostraram ser possível determinar simultaneamente as vitaminas A, E e D. Os coeficientes de variação de repetibilidade e precisão intermédia, para as vitaminas A / E, respetivamente, foram de 7,9% / 8,1% e 21% / 13% (creme vegetal para barrar com sabor a manteiga) e 3,7% / 11% e 14% / 16% (ovos, salgadinhos e doces à base de leite). Nos materiais de referência os valores de z-score foram inferiores a 2. Nas amostras, o teor em vitamina A variou entre 0,071 e 69 µg/100g e em vitamina E entre 0,038 e 18 mg/100g.

A otimização introduzida permitirá ao laboratório determinar as vitaminas A, E e D simultaneamente ou, se for o caso, apenas as vitaminas A e E, com vantagens económicas e ambientais. As melhorias introduzidas permitiram manter a precisão e exatidão dos métodos anteriores.

Palavras-chave: vitamina A, vitamina E, vitamina D, determinação simultânea, HPLC, matrizes alimentares.

ABSTRACT

Vitamins are essential to human metabolism, with food as the main source. Intake of vitamins at or below recommended levels usually results in health problems, so the analytical determination of vitamins in foods by validated methods that allow comparison and traceability of results is of great importance.

In this work the saponification and extraction processes of vitamins A and E from food matrices were optimized to reduce the time of analysis and the volume of solvents. Chromatographic conditions were also optimized to implement a method for the simultaneous determination of vitamins A, E and D. The optimization focused on two accredited HPLC methods based on EN 12821, 12822 and 12823-1 standards. Repeatability, intermediate precision and accuracy were evaluated using samples of vegetable spreads, composite samples from TDS Exposure project and reference materials.

The results obtained allowed to reduce saponification time by 25% and extraction solvents consumption by 63%. The new chromatographic conditions showed that it was possible to simultaneously determine the vitamins A, E and D. The coefficients of variation of repeatability and intermediate precision for vitamins A / E, respectively, were 7.9% / 8.1% and 21% / 13% (butter flavored vegetable spread) and 3.7% / 11% and 14% / 16% (eggs, finger foods and milk-based desserts). In reference materials the *z-score* values were lower than 2. In samples, vitamin A content ranged from 0.071 to 69 µg/100g and vitamin E from 0.038 to 18 mg/100g.

The introduced optimization will allow the laboratory to determine vitamins A, E and D simultaneously or, if appropriate, only vitamins A and E, with economic and environmental advantages. The introduced improvements allowed to maintain the precision and accuracy of the previous methods.

Key words: vitamin A, vitamin E, vitamin D, simultaneous determination, HPLC, food matrices.

ÍNDICE

1	Objetivo do trabalho.....	1
2	Enquadramento do tema	5
3	Introdução.....	9
3.1	Aspetos nutricionais das vitaminas	12
3.2	Vitamina A	17
3.3	Vitamina D	23
3.4	Vitamina E	29
3.5	Métodos analíticos para a determinação das vitaminas lipossolúveis (A, D e E).....	34
3.5.1	Métodos de extração.....	38
3.5.2	Métodos cromatográficos.....	41
3.6	Validação de um método analítico	48
3.6.1	Avaliação indireta.....	49
3.6.1.1	Especificidade/Seletividade.....	49
3.6.1.2	Quantificação.....	49
3.6.1.2.1	Curvas de calibração.....	49
3.6.1.2.2	Límites analíticos do método de ensaio	51
3.6.1.2.3	Sensibilidade	51
3.6.1.3	Precisão.....	52
3.6.1.4	Robustez.....	54
3.6.2	Avaliação direta.....	54
3.6.2.1	Materiais de Referência Certificados (MRC).....	55

4	Materiais e Métodos	57
4.1	Procedimento experimental.....	59
4.1.1	Material.....	60
4.1.2	Equipamento	61
4.1.3	Reagentes e padrões	62
4.1.4	Preparação de soluções	63
4.1.4.1	Soluções de trabalho.....	63
4.1.4.2	Soluções padrão.....	64
4.1.4.3	Soluções de fase móvel	69
4.1.5	Preparação de amostras.....	69
4.1.6	Saponificação.....	73
4.1.7	Extração	73
4.1.8	Evaporação	74
4.1.9	Reconstituição.....	74
4.1.10	Cromatografia.....	74
4.1.10.1	Condições cromatográficas	74
4.1.10.2	Identificação.....	75
4.1.10.3	Quantificação.....	75
4.2	Estudos de otimização	77
4.2.1	Otimização do tratamento das amostras	77
4.2.2	Otimização das condições cromatográficas	79
4.3	Validação do método.....	80
5	Apresentação e discussão dos resultados	83
5.1	Estudos de otimização no tratamento das amostras	85
5.2	Otimização das condições cromatográficas.....	90
5.3	Validação do método analítico	96
5.4	Análise das amostras do projeto <i>TDS Exposure</i>	98
5.4.1	Amostras determinadas segundo o Método AED para a determinação das vitaminas A e E.....	99

5.4.2 Extratos das amostras obtidos de acordo com o método D para a determinação das vitaminas A e E	104
6 Conclusões	115
7 Propostas de trabalho futuro	121
8 Referências bibliográficas	125
9 Anexos	135
Anexo 1	137
Anexo 2	139
Anexo 3	141
Anexo 4	143
Anexo 5	145
Anexo 6	149
Anexo 7	151
Anexo 8	153
Anexo 9	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Disponibilidades alimentares para consumo recomendadas pela Roda dos Alimentos e apuradas pela BAP em 2016.....	14
Figura 3.2 Estrutura comum do retinol (R = CH ₂ OH), retinal (R = CHO), retinil (R = CH ₂ -) e ácido retinoico (R = CO ₂ H).....	18
Figura 3.3 Estruturas moleculares dos carotenoides precursores de vitamina A, α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina	18
Figura 3.4 Contribuição dos principais grupos alimentares para as disponibilidades diárias <i>per capita</i> de vitamina A – 2016	20
Figura 3.5 Metabolismo da vitamina D	24
Figura 3.6 Estrutura molecular do ciclopentanoperidrofenantreno	24
Figura 3.7 Estrutura do colecalciferol (vitamina D ₃) e do ergocalciferol (vitamina D ₂).....	25
Figura 3.8 Contribuição dos principais grupos alimentares para as disponibilidades diárias <i>per capita</i> de vitamina D – 2016.....	27
Figura 3.9 Estruturas moleculares da vitamina E.....	30
Figura 3.10 Contribuição dos principais grupos alimentares para as disponibilidades diárias <i>per capita</i> de vitamina E – 2016	32
Figura 3.11 Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução	43
Figura 4.1 Em cima, à esquerda, banho de água fervente equipado com sistema de condensação e à direita evaporador rotativo; em baixo, sistema de HPLC	62
Figura 5.1 Exemplo de aplicação das tolerâncias, máxima e mínima, aceitáveis para a rotulagem de vitaminas (vitamina A em creme vegetal com sabor a manteiga).....	87
Figura 5.2 Cromatograma do padrão de vitaminas A e E (tempos de retenção: α -tocoferol 2,4 min, cis-retinol 5,2 min e trans-retinol 6,5 min; caudal: 2 mL/min).....	90
Figura 5.3 Cromatograma do padrão de vitamina D para um fluxo de 1 mL/min e fase móvel (n-heptano:propanol) 97:3 (método D)	91
Figura 5.4 Cromatograma do padrão de vitamina D para um fluxo de 2 mL/min (método AE) e fase móvel (n-heptano:propanol) 97:3 (método D)	91

Figura 5.5 Cromatograma do padrão de vitamina D para um fluxo de 1 mL/min (método D) e fase móvel (n-heptano:propanol) 98:2 (método AE).....	92
Figura 5.6 Cromatograma do padrão de vitamina D para um fluxo de 2 mL/min e fase móvel (n-heptano:propanol) 98:2 (método AE).....	92
Figura 5.7 Cromatograma do padrão AED.....	93
Figura 5.8 Cromatograma do padrão de vitamina D e da fração que contém cis-retinol e vitamina D (D ₂ +D ₃).....	94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 Vitâmeros correspondentes às vitaminas lipossolúveis A, D e E.....	12
Tabela 3.2 Fontes alimentares para as diferentes vitaminas lipossolúveis	13
Tabela 3.3 Valores de Ingestão Diária Recomendada (DRI) e respectivos Limites Superiores (ULs), para a vitamina A, para cada faixa etária	21
Tabela 3.4 Valores de Ingestão Diária Recomendada (DRI), para a vitamina E, para cada faixa etária	32
Tabela 3.5 Métodos oficiais frequentemente utilizados na análise de vitaminas.....	37
Tabela 4.1 Volumes a adicionar a cada solução padrão de trabalho	67
Tabela 4.2 Condições de saponificação e extração utilizadas nos métodos de determinação das vitaminas A, E e D.....	77
Tabela 4.3 Parâmetros de validação do método acreditado e em utilização no DAN.....	81
Tabela 5.1 Teores de vitaminas A e E em diferentes amostras para diferentes condições de tratamento das amostras	86
Tabela 5.2 Teores de vitamina A e E, para os diferentes volumes de extração, da amostra de creme vegetal com sabor a manteiga saponificada durante 45 minutos	88
Tabela 5.3 Teores de vitamina A e E do material de referência FAPAS 21104, saponificado durante 45 minutos, para os diferentes volumes de extração, e respectivos valores de referência.....	89
Tabela 5.4 Valores de z-score das vitaminas A e E, para o material de referência FAPAS 21104, nos diferentes volumes de extração.....	89
Tabela 5.5 Valores de área de pico e fator de resposta do padrão D ₂ +D ₃ e da fração recolhida na parte preparativa	95
Tabela 5.6 Coeficientes de variação da repetibilidade e da precisão intermédia nas amostras compostas por ovos, salgadinhos e doces à base de leite.....	96
Tabela 5.7 Coeficientes de variação da repetibilidade e da precisão intermédia na amostra de creme vegetal para barrar com sabor a manteiga.....	96
Tabela 5.8 Dados de precisão fornecidos pelas normas EN 12822 e 12823-1 para diferentes amostras	97
Tabela 5.9 Teores de vitamina A e de vitamina E e respectivos z-score para o MRC NIST 2383	97

Tabela 5.10 Teores de vitamina A e vitamina E das amostras do Grupo 5 – pratos compostos, à base de carne	99
Tabela 5.11 Teores de vitamina A e vitamina E das amostras do Grupo 5 – pratos compostos por sopa	100
Tabela 5.12 Teores de vitamina A e vitamina E das amostras do Grupo 5 – pratos compostos, à base de peixe	101
Tabela 5.13 Teores de vitamina A e vitamina E das amostras do Grupo 5 – pratos compostos, à base de arroz.....	101
Tabela 5.14 Teores de vitamina A e vitamina E das amostras do Grupo 5 – pratos compostos, à base de produtos hortícolas e cereais.....	102
Tabela 5.15 Teores de vitamina A e E das amostras do Grupo 6 – Ovos e produtos à base de ovos	102
Tabela 5.16 Teores de vitamina A e E das amostras do Grupo 13 – Carne e produtos à base de carne	103
Tabela 5.17 Teores de Vitamina A e E das amostras do Grupo 14 – Leite e produtos lácteos	103
Tabela 5.18 Teores de Vitamina A e E para a amostra de puré de batata do Grupo 5 – pratos compostos.....	104
Tabela 5.19 Teores de Vitamina A e E das amostras do Grupo 7 – peixe, produtos de pesca, anfíbios, répteis e invertebrados.....	105
Tabela 5.20 Teores de vitamina A e E das amostras do Grupo 11 – Cereais e produtos à base de cereais	106
Tabela 5.21 Teores de vitamina A e E das amostras do Grupo 13 – Carne e produtos à base de carne	106
Tabela 5.22 Teores de vitamina A e vitamina E de alguns dos extratos de amostras determinados pelo método AED obtidos neste trabalho e pelo DAN	107
Tabela 5.23 Teores de vitamina A e vitamina E em pratos compostos à base de carne obtidos neste trabalho e tabelados na TCA	108
Tabela 5.24 Teores de vitamina A e vitamina E em pratos compostos por sopa e salada, à base de cereais e no puré de batata obtidos neste trabalho e tabelados na TCA.....	109
Tabela 5.25 Teores de vitamina A e vitamina E em pratos compostos à base de peixe obtidos neste trabalho e tabelados na TCA.....	110
Tabela 5.26 Teores de vitamina A e vitamina E em pratos compostos à base de arroz obtidos neste trabalho e tabelados na TCA	110
Tabela 5.27 Teores de vitamina A e vitamina E nos ovos obtidos neste trabalho e tabelados na TCA.....	111
Tabela 5.28 Teores de vitamina A e vitamina E em peixes e produtos de pesca, anfíbios, répteis e invertebrados obtidos neste trabalho e tabelados na TCA	111

Tabela 5.29 Teores de vitamina A e vitamina E em produtos à base de cereais obtidos neste trabalho e tabelados na TCA	112
Tabela 5.30 Teores de vitamina A e vitamina E em produtos à base de carne obtidos neste trabalho e tabelados na TCA	112
Tabela 5.31 Teores de vitamina A e vitamina E em produtos lácteos obtidos neste trabalho e tabelados na TCA.....	113

LISTA DE ACRÓNIMOS

1,25(OH)₂D	1,25-di-hidroxivitamina D
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
α-TTP	Proteína de transferência de α-tocoferol (<i>α-tocopherol transfer protein</i>)
AA	Ácido Ascórbico
AACC	<i>American Association of Cereal Chemists</i>
AI	Ingestão Adequada (<i>Adequate Intake</i>)
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AVED	Ataxia com deficiência de vitamina E (<i>Ataxia with Vitamin E Deficiency</i>)
BAP	Balança Alimentar Portuguesa
CEN	Comité Europeu de Normalização
CO₂-SC	Dióxido de Carbono Supercrítico
CV	Coeficiente de Variação
CV_r	Coeficiente de Variação da repetibilidade
CV_{pi}	Coeficiente de Variação da precisão intermédia
DAN	Departamento de Alimentação e Nutrição
DRI	Ingestão Diária Recomendada (<i>Dietary Reference Intake</i>)
EC	Comissão Europeia (<i>European Commission</i>)
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (<i>European Food Safety Authority</i>)
EN	Norma Europeia (European Norm)
EtOH	Etanol
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FAPAS	<i>Food Analysis Performance Assessment Scheme</i>
FNB	<i>Food and Nutrition Board</i>
FR	Fator de Resposta
FSE	<i>Food Supplements Europe</i>
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

HPLC-NP	Cromatografia Líquida de Alta Resolução de Fase Normal (<i>High Performance Liquid Chromatography – Normal Phase</i>)
HPLC-RP	Cromatografia Líquida de Alta Resolução de Fase Inversa (<i>High Performance Liquid Chromatography – Reversed Phase</i>)
IDEF	Inquérito às Despesas das Famílias
INE	Instituto Nacional de Estatística
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, IP
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ISEL	Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
IU	Unidade Internacional (<i>International Unit</i>)
IUB	União Internacional de Bioquímica (<i>International Unit of Biochemistry</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Unit of Pure and Applied Chemistry</i>)
KOH	Hidróxido de Potássio
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC-IR	Cromatografia Líquida com espectroscopia infravermelha (<i>Liquid Chromatography – Infrared</i>)
LC-MS	Cromatografia Líquida com espetrometria de massa (<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida com espetrometria de massa sequencial (<i>Liquid Chromatography tandem mass spectrometry</i>)
LC-NMR	Cromatografia Líquida com espetrometria de ressonância magnética nuclear (<i>Liquid Chromatography – Nuclear Magnetic Resonance</i>)
LD	Limite de Detecção
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
LQ	Limite de Quantificação
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
ND	Não Detetado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NRV	Valor de Referência do Nutriente (<i>Nutritional Reference Value</i>)
ODS-sílica	Octaecililano-sílica
PAD	Detetor de rede de fotodíodos (<i>Photodiode Array Detector</i>)
P_c	Pressão crítica
PortFIR	Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar (<i>Portuguese Food Information Resource</i>)
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno (<i>Polyvinylidene Fluoride</i>)
RAE	Equivalente de Atividade de Retinol (<i>Retinol Activity Equivalent</i>)
RE	Equivalente de Retinol (<i>Retinol Equivalent</i>)
RI	Dose de Referência (<i>Reference Intake</i>)

SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Sodecyl Sulfate</i>)
SLE	Extração Líquida de suporte Sólido (<i>Solid-Liquid Extraction</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SFC	Cromatografia com Fluido Supercrítico (<i>Supercritical Fluid Chromatography</i>)
SFE	Extração com Fluido Supercrítico (<i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
T_c	Temperatura Crítica
TCA	Tabela da Composição de Alimentos
TDS	Estudo de Dieta Total (<i>Total Diet Study</i>)
TDS EXPOSURE	Estudo de Dieta Total para avaliação da Exposição
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra-Resolução (<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>)
UL	Nível Superior (<i>Upper Level</i>)
UPCC	Cromatografia de Convergência de Ultra-Resolução (<i>Ultra-Performance Convergence Chromatography</i>)
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>)
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

O presente trabalho foi desenvolvido durante um período de estágio nas instalações do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP (INSA) e envolveu a otimização analítica e a análise de diversos alimentos com vista à determinação dos teores de vitamina A, vitamina E e de vitamina D. As principais matrizes estudadas foram pratos compostos representativos do consumo da população portuguesa.

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- ▶ A otimização do método analítico previamente acreditado e utilizado no laboratório do DAN para a determinação de vitamina A (*all-trans*-retinol e *13-cis*-retinol) e de vitamina E (*dl- α* -tocoferol), presentes em matrizes alimentares, por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), em fase normal, com um detetor de fluorescência e um detetor de rede de fotodíodos (PAD), baseado nas normas EN 12822 e 12823-1, de forma a reduzir custos, tempo de análise e impacto ambiental;
- ▶ A extensão das condições cromatográficas utilizadas no método mencionado no ponto anterior para a determinação de vitamina A e vitamina E à determinação de vitamina D;
- ▶ A determinação do teor de vitamina A e vitamina E, utilizando o método otimizado, em diversas matrizes alimentares, na sua maioria provenientes do projeto *TDS Exposure*.

A avaliação nutricional, em qualquer aplicação, tem como finalidades gerais detetar estados de deficiência, avaliar as qualidades nutricionais dos hábitos alimentares e/ou alimentos e prever possíveis efeitos na saúde (Combs, 2008).

A nutrição é o processo de consumo, absorção e utilização dos nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento corporal, para o fornecimento de energia e para a manutenção da vida. Os nutrientes são imprescindíveis, sendo obtidos a partir dos alimentos que são consumidos diariamente ao longo da vida, designando-se por nutrientes essenciais os que não podem ser sintetizados no organismo. Estes incluem alguns aminoácidos (nas proteínas), determinados ácidos gordos (em gorduras e óleos), minerais e vitaminas. Caso os nutrientes essenciais não sejam ingeridos nas quantidades requeridas, podem aparecer perturbações relacionadas com deficiência ou excesso nutricional, dando origem a diversos problemas de saúde. Por este motivo, informações precisas sobre a composição dos alimentos tornam-se cada vez mais necessárias, pelo que o conhecimento da distribuição e abundância das vitaminas em todas as suas fontes tem sido um dos principais objetivos desde que se iniciou a investigação sobre estes compostos, passando a prestar-se uma maior atenção aos métodos para a sua deteção e determinação (Moy, 2013; Youdim, 2017).

A determinação quantitativa de vitaminas é particularmente útil em nutrição, tornando possível adequar os diferentes hábitos alimentares às necessidades de cada indivíduo. Para além disso, é necessário garantir também a exatidão da rotulagem alimentar e nutricional para que os consumidores possam fazer escolhas alimentares mais adequadas às suas necessidades e preferências.

A determinação de vitaminas nos alimentos representa um problema analítico complexo, uma vez que as matrizes alimentares são muito complexas e as vitaminas estão naturalmente presentes nos alimentos em níveis muito baixos. Para além disso, as vitaminas destroem-se muito facilmente, seja por ação da temperatura, da presença de oxigénio, das condições de luminosidade, ou até pelos restantes compostos alimentares constituintes da matriz alimentar (Strohecker et al., 1967; Pegg et al., 2010; Moy, 2013; Aqel et al., 2014; Youdim, 2017).

São essenciais o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos robustos e sensíveis capazes de determinar a presença e a quantidade de vitaminas no maior número possível de matrizes alimentares. Devido ao grande número de formas vitamínicas que ocorrem naturalmente nos alimentos, a cromatografia líquida (LC) em todas as suas variantes tem sido a técnica mais adequada para a análise de vitaminas, tendo já sido relatadas várias metodologias para a sua determinação.

Na grande maioria destas metodologias, as técnicas convencionais de extração com solventes empregam grandes volumes de solventes orgânicos, muitos deles tóxicos, causando impacto ambiental e envolvendo custos elevados. Tratam-se de técnicas pouco seletivas que podem ser exigentes tanto no tempo como laboralmente, apresentar recuperações baixas e ainda prolongar a exposição do extrato ao calor, à luz e ao ar, resultando em perdas significativas de vitaminas. Por estes motivos, nas últimas décadas, a preparação de amostras tem sido o foco de uma pesquisa constante e interminável que vem acompanhando seis grandes tendências: simplificação, rapidez, miniaturização/redução de desperdício, automação, custos e segurança (Momenbeik & Bagheri, 2015; Fanali et al., 2017).

Os problemas de saúde que podem surgir por uma ingestão inadequada de nutrientes incluem vários tipos de cancros, doenças congénitas, partos prematuros, perturbações reprodutivas, entre outros, e são prevalentes em todos os países. Consequentemente, a proteção das dietas contra estes perigos deve ser considerada uma das mais importantes funções de saúde pública para qualquer país e, neste sentido, os estudos de dieta total são as ferramentas mais económicas, uma vez que complementam a tradicional monitorização e vigilância, fornecendo uma base científica para a exposição alimentar da população a nutrientes e não-nutrientes, incluindo contaminantes, e impacto potencial na saúde pública (Moy, 2013).

Um Estudo de Dieta Total (TDS) consiste na recolha de alimentos, selecionados com base em dados de consumo nacionais, que representam a consumo alimentar habitual das populações-alvo, na sua preparação tal como são consumidos, no seu agrupamento em amostras (compostas por alimentos relacionados entre si) e, posteriormente, na sua análise laboratorial (WHO, 2005).

Neste sentido, o projeto *TDS Exposure (Total Diet Study Exposure – Estudo de Dieta Total para Avaliação da Exposição)*, no qual este trabalho se insere, visou harmonizar na Europa uma metodologia para conduzir um Estudo de Dieta Total e criar uma rede de TDS à escala europeia.

Tendo em vista responder a este objetivo, este trabalho pretende contribuir para avaliar a ingestão de vitaminas A e E pela população portuguesa, analisando diferentes amostras representativas dos hábitos de consumo alimentar em Portugal.

O facto de certos alimentos serem necessários para manter a saúde ou para evitar algumas doenças é conhecido há muito tempo. Antes do século XX, as causas dessas doenças, como o escorbuto, o beribéri, a cegueira noturna, o raquitismo e a pelagra, não eram conhecidas e os médicos acreditavam que eram de natureza infecciosa, pois afetavam muitas pessoas de uma mesma comunidade como, por exemplo, os marinheiros de navios por longo tempo no mar. Por esse motivo, os tratamentos eram totalmente inadequados e não curavam.

A partir do século XVIII, foi demonstrado que a suplementação alimentar com frutas cítricas (laranjas e limões, por exemplo) evitava o escorbuto e, no século XIX, que a ingestão de arroz integral (em substituição do arroz polido), prevenia a ocorrência de beribéri, tendo-se descoberto também que o óleo de fígado de bacalhau era excelente para o raquitismo. Deste modo, os cientistas do século XX, utilizando a metodologia recém-desenvolvida da bioquímica e da nutrição experimental, determinaram que esse poder curativo dos alimentos poderia ser devido a substâncias químicas presentes nesses mesmos alimentos, mas também em falta em alguns deles (Sabbatini, 2000).

Em 1906, o bioquímico inglês Frederick Hopkins demonstrou a existência desses fatores acessórios nos alimentos e, em 1911, o químico polaco Casimir Funk descobriu na casca do arroz um "fator anti-beribéri" (que hoje se sabe que se trata da vitamina B₆), capaz de corrigir a doença, experimentalmente, em animais e seres humanos. Funk denominou esta substância por "*vitamin*", baseando-se na palavra latina *vita* (vida), em virtude de ser considerada uma substância vital para o ser humano, e no sufixo *-amin* (amina), por possuir a característica química do grupo amina. Embora atualmente a maioria das vitaminas não contenha o grupo amina (como as vitaminas solúveis em gordura), este nome foi aceite em todo o mundo, especialmente nas ciências da nutrição e da alimentação (Sabbatini, 2000; Berger, 2013).

Em 1912, depois de várias pesquisas semelhantes, foi proposta a "hipótese da deficiência de vitaminas", ou seja, que várias doenças poderiam ser causadas pela falta de uma quantidade mínima dessas substâncias e, por meio de experiências, nas quais os animais eram privados de certos tipos de alimentos, os cientistas conseguiram reproduzir, em laboratório, o raquitismo, o escorbuto e a pelagra, sendo assim capazes de isolar e identificar as vitaminas que conhecemos nos dias de hoje, nomeadamente, vitamina A, complexo vitamínico B, vitamina C, vitamina D, vitamina E e vitamina K, sendo este um dos mais importantes progressos da medicina de todos os tempos, levando à erradicação de todas estas doenças, a partir de recomendações dos médicos para que fossem adotados regimes alimentares mais equilibrados (Sabbatini, 2000).

3.1 ASPETOS NUTRICIONAIS DAS VITAMINAS

As vitaminas são um grupo de compostos orgânicos que são essenciais para o funcionamento normal do corpo humano. Na nutrição humana estão identificadas 13 vitaminas que se classificam, de acordo com a sua solubilidade, em dois grupos: vitaminas lipossolúveis (solúveis em gordura), representadas pelas vitaminas A, D, E e K e vitaminas hidrossolúveis (solúveis em água), compreendidas pelo grupo vitamínico B e pela vitamina C (Ball, 2004; Combs, 2008).

As vitaminas solúveis em água tendem a ter um ou mais grupos polares ou ionizáveis, sendo apreciavelmente solúveis em solventes polares, enquanto que as vitaminas solúveis em gordura têm predominantemente grupos aromáticos e alifáticos, sendo apreciavelmente solúveis em solventes apolares. Em termos estruturais, as vitaminas solúveis em água têm, geralmente, poucas semelhanças estruturais, ao contrário das vitaminas lipossolúveis que têm algumas características em comum, na medida em que cada uma é composta inteiramente ou primariamente por unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Combs, 2008).

Em termos funcionais, as vitaminas têm funções bioquímicas e fisiológicas muito diferentes, estando distribuídas em diversas fontes naturais de alimentos. Para várias das vitaminas, a atividade biológica é atribuída a uma série de compostos relacionados estruturalmente, conhecidos como vitâmeros (ver Tabela 3.1). Os vitâmeros pertencentes a uma determinada vitamina exibem, na maioria dos casos, propriedades biológicas qualitativas semelhantes entre si, mas, devido a diferenças nas suas estruturas químicas, apresentam diferentes graus de potência (Ball, 2004; Combs, 2008).

Tabela 3.1 Vitâmeros correspondentes às vitaminas lipossolúveis A, D e E

VITAMINA	VITÂMERO
A	Retinol
	Retinal
	Ácido Retinóico
D	Colecalciferol (D ₃)
	Ergocalciferol (D ₂)
E	α -Tocoferol
	β -Tocoferol
	γ -Tocoferol

Apesar de na definição clássica de vitamina se referir que são substâncias que não podem ser sintetizadas pelo organismo humano, a vitamina D pode ser formada na pele após exposição adequada ao sol e a vitamina K é normalmente produzida em quantidades suficientes por bactérias intestinais. Deste modo, à exceção das vitaminas D e K, as restantes vitaminas são exclusivamente fornecidas por fontes alimentares, uma vez que não podem ser produzidas pelo corpo humano. No caso das vitaminas lipossolúveis, estas podem ser armazenadas durante algum tempo no corpo humano, não sendo tão importante haver um fornecimento diário destas vitaminas (Swanson & Evenson, 2002; Ball, 2004).

Na Tabela 3.2 apresentam-se algumas das fontes alimentares que contêm as vitaminas lipossolúveis.

Tabela 3.2 Fontes alimentares para as diferentes vitaminas lipossolúveis

VITAMINA	FONTE ALIMENTAR	
A	<p><i>Vitamina A pré-formada</i>: Carnes, gema de ovo, grãos integrais, manteiga, leite, manga, banana.</p> <p><i>Pró-vitamina A</i>: vegetais vermelhos, amarelo-alaranjados e verde-escuro: cenoura, brócolos, pimentão, alface, agrião, abóbora, beterraba, tomate, espinafre, couve.</p>	
D	Manteiga, gema de ovo, leite, cereais enriquecidos, fígado, óleo de fígado de bacalhau, peixes gordos.	
E	Gérmen de trigo, cereais integrais, gema de ovo, creme de leite, manteiga, vegetais verdes, fígado, frutas oleaginosas, óleos vegetais, banana, repolho, folhas verde-escuras.	
K	Fígado, repolho, espinafre, folhas em geral, vagem, ervilha, cenoura, óleos vegetais, alfafa.	

Os alimentos são as fontes vitamínicas mais importantes. No entanto, as vitaminas são distribuídas de forma desigual entre os vários alimentos que compreendem o consumo alimentar diário dos seres humanos (Ball, 2004; Combs, 2008).

Em Portugal, a Balança Alimentar Portuguesa (BAP), enquanto instrumento analítico de natureza estatística, permite retratar as disponibilidades alimentares e a sua

evolução em termos de produtos, nutrientes e calorias, e não a caracterização dos consumos alimentares dos residentes no país. No entanto, dado que os coeficientes de correlação entre a BAP (disponibilidades alimentares) e o Inquérito às Despesas das Famílias - IDEF (quantidades adquiridas pelas famílias residentes) apresentaram correlações positivas, elevadas e estatisticamente significativas, as disponibilidades alimentares constituem uma forma indireta de caracterização do consumo alimentar.

A comparação da distribuição das quantidades de produtos alimentares disponíveis diariamente para consumo *per capita* apuradas pela BAP com o padrão alimentar recomendado pela Roda dos Alimentos revelou uma distorção do padrão das disponibilidades face ao recomendado. Os alimentos que se encontram disponíveis para consumo continuam a evidenciar uma oferta alimentar excessiva e desequilibrada, conforme ilustrado na Figura 3.1 (INE, 2017).

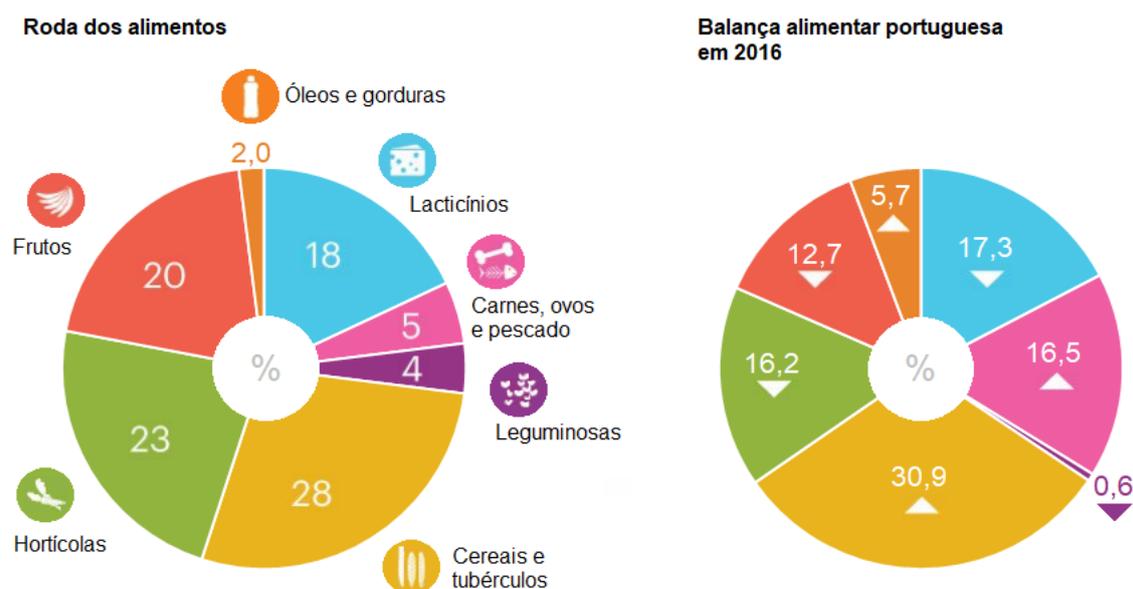


Figura 3.1 Disponibilidades alimentares para consumo recomendadas pela Roda dos Alimentos e apuradas pela BAP em 2016 [Adaptado de: INE, 2017]

Nos países onde os regimes alimentares são desequilibrados e inadaptados, ou onde há hábitos alimentares específicos, surgem algumas doenças típicas de deficiência de vitaminas. As principais causas da deficiência nutricional de vitaminas são: ingestão inadequada, má absorção, aumento da excreção e destruição pelo organismo (Ball, 2004; Combs, 2008).

Por outro lado, o consumo excessivo de vitaminas lipossolúveis, seja por alimentos ou suplementos alimentares, pode, em alguns casos, dar origem a efeitos tóxicos (Swanson & Evenson, 2002; Combs, 2008).

Uma vez que as principais fontes vitamínicas são os alimentos, a estabilidade da vitamina é uma questão importante quando se considera o valor nutricional de um alimento. De uma forma geral, as vitaminas lipossolúveis são pouco estáveis, devendo ser protegidas do calor, oxigénio e luz ultravioleta (Combs, 2008).

O valor nutricional de um alimento em relação a uma determinada vitamina pode ser expresso em termos da biodisponibilidade da vitamina, que se refere à proporção da quantidade de vitamina ingerida que sofre absorção intestinal e utilização pelo organismo. A utilização abrange o transporte da vitamina absorvida para os tecidos, a absorção celular e a conversão para uma forma que possa desempenhar alguma função bioquímica ou fisiológica, imediatamente ou após o armazenamento. A biodisponibilidade é influenciada principalmente pelo tipo de processamento e cozimento dos alimentos, uma vez que levam a perdas significativas das vitaminas nos alimentos. Por esse motivo, a quantidade de vitamina biodisponível pode variar consideravelmente de regime alimentar para regime alimentar ou de alimento para alimento (Ball, 2004).

Certos componentes do consumo alimentar diário de um ser humano podem retardar ou aumentar a absorção de vitamina, logo, a composição de um determinado regime alimentar é uma consideração importante. Por exemplo, a presença de quantidades adequadas de gordura proveniente das fontes alimentares é essencial para a absorção das vitaminas lipossolúveis. Fatores biológicos, ingestão de álcool e drogas, outros fatores gerais como o plano de nutrição, requisitos metabólicos, idade e estado de saúde e a presença de distúrbios gastrointestinais ou doenças podem também interferir nos mecanismos fisiológicos de absorção, podendo ocorrer uma má absorção (Ball, 2004).

Os processos metabólicos devem responder às necessidades imediatas do corpo e, portanto, os requisitos vitamínicos estão sujeitos à variação contínua entre certos limites/níveis. De acordo com a Organização Mundial de Saúde e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (WHO/FAO) um requisito é um nível de ingestão que, atendendo a critérios específicos de adequação, evita o risco de défice ou excesso. A Ingestão Diária Recomendada (DRI) é o nível médio de ingestão diária que atende aos requisitos de nutrientes de quase todos os indivíduos (97,5%) aparentemente saudáveis em uma idade e grupo de população específicos. Para determinados nutrientes foi definido um Nível Superior (UL) de ingestão de nutrientes tolerável, isto é, um nível máximo de ingestão diária total de um nutriente (proveniente de qualquer fonte) que não represente riscos de efeitos secundários para a saúde dos seres humanos. Este UL não é um nível recomendado de ingestão, mas sim uma

estimativa do nível mais alto de ingestão que não apresenta riscos apreciáveis de efeitos adversos para a saúde. A gama de valores entre a DRI e o UL é considerada suficiente para prevenir a deficiência e, ao mesmo tempo, evitar a toxicidade. No caso de alguns nutrientes não estão disponíveis evidências científicas suficientes para estabelecer uma DRI, pelo que para estas situações se estabeleceram Ingestões Adequadas (AIs). O termo AI é definido como o valor de consumo diário médio recomendado, com base em aproximações observadas ou avaliadas experimentalmente ou estimativas de ingestão de nutrientes por um grupo (ou grupos) de pessoas aparentemente saudáveis, que se supõe ser adequado quando uma DRI não pode ser determinada (WHO/FAO, 2002; EFSA, 2006; Murphy & Barr, 2007).

Outro termo utilizado na rotulagem de alimentos é a Dose de Referência (RI), que fornece uma indicação da percentagem da RI que está presente numa porção de um determinado alimento, com base nos Valores de Referência do Nutriente (NRV), para um adulto médio que consome uma dieta de 8400 kJ/2000 kcal (valores correspondentes à dose recomendada de energia para uma mulher moderadamente ativa) (Ross & Harrison, 2007).

De acordo com o regulamento da UE nº 1169/2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, a declaração de vitaminas pode ser expressa por porção e/ou por unidade de consumo, facilmente reconhecíveis pelo consumidor, desde que a porção ou a unidade utilizada seja quantificada no rótulo e que o número de porções ou unidades contidas na embalagem seja expresso em percentagem das doses de referência definidas para cada uma das vitaminas, por 100 g ou por 100 mL. De um modo geral, a quantidade a tomar em consideração para decidir o que constitui uma quantidade significativa, no caso de produtos que não sejam bebidas e quando a embalagem contém apenas uma porção, corresponde a 15% dos NRV especificados para cada vitamina. Os valores das doses de referência (para adultos) para as vitaminas A, E e D serão mencionados em cada um dos subcapítulos referentes às diferentes vitaminas.

3.2 VITAMINA A

O termo vitamina A descreve um grupo de compostos que possui qualitativamente a atividade biológica do retinol. No consumo alimentar diário, a vitamina A é ingerida sob duas formas principais: provitamina A e retinoides. Os retinoides compreendem o retinol, o retinaldeído e o ácido retinoico, juntamente com os seus análogos naturais e sintéticos, sendo muitas vezes referidos como vitamina A pré-formada, uma vez que não requerem conversão metabólica para se tornarem biologicamente ativos. A provitamina A é proveniente de alguns carotenoides (α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina, principalmente) encontrados em alimentos de origem vegetal que podem ser convertidos em vitamina A por um processo enzimático regulado pelo nível de vitamina A do corpo. Embora os animais não consigam sintetizar carotenoides, estes podem assimilá-los através do seu regime alimentar. No entanto, a proporção de vitamina A obtida de cada uma das formas varia consideravelmente entre as espécies animais e entre os regimes alimentares de cada indivíduo. A proporção pode ainda variar com a forma como os alimentos são armazenados e/ou cozinhados, podendo levar a uma destruição de vitamina A e carotenoides entre 5 e 40%, dependendo em grande parte da presença ou não de oxigénio (Ball, 2000; Ball, 2004; Ross & Harrison, 2007; Belitz et al., 2009; FSE, 2013).

A vitamina A obtida a partir do consumo alimentar diário é armazenada no fígado, podendo ser excretada na corrente sanguínea quando necessário. O retinol circulante é absorvido por células alvo e oxidado, em parte, em ácido retinoico, o que induz a síntese de proteínas através do controlo direto da expressão genética. Este tipo de ação, a ativação de genes, estabelece a vitamina A (na forma de seu metabolito, ácido retinoico) como uma hormona, semelhante às hormonas esteroides e tiroide (Ball, 2000).

ESTRUTURA QUÍMICA

De acordo com a Comissão Conjunta de Nomenclatura Bioquímica da União Internacional de Química Pura e Aplicada e da União Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB), os retinoides são "uma classe de compostos que consistem em quatro unidades isoprenoides juntas sob a forma *head-to-tail* (cabeça para a cauda)" e os carotenoides são "uma classe de hidrocarbonetos (carotenos) e respetivos derivados oxigenados (xantofilas) constituídos por oito unidades isoprenoides unidas de tal

maneira que a disposição das unidades isoprenoídes é invertida no centro da molécula” (IUPAC-IUB, 1975; IUPAC-IUB, 1983).

Na Figura 3.2 apresenta-se a estrutura comum para os diferentes retinoides.

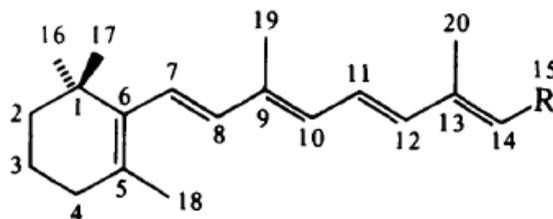


Figura 3.2 Estrutura comum do retinol (R = CH₂OH), retinal (R = CHO), retinil (R = CH₂-) e ácido retinoico (R = CO₂H) [Fonte: IUPAC-IUB, 1983]

Os retinoides tendem a ser mais estáveis na configuração *all-trans*. O isómero predominante nos alimentos é o isómero *all-trans*-retinol. Este possui a atividade máxima (100%) de vitamina A e é normalmente acompanhado por quantidades menores do isómero 13-*cis*-retinol, o qual, de acordo com estudos realizados em ratos, exibe 75% de atividade relativa (Ball, 2000; Ross & Harrison, 2007).

Para que um carotenoide possua atividade de vitamina A, a sua estrutura deve incorporar uma molécula de retinol, isto é, um anel β -ionona não substituído e uma cadeia hidrocarbonatada insaturada. O carotenoide precursor de vitamina A mais onipresente é o β -caroteno. Este composto é formado por duas moléculas de retinol juntas de forma *tail-to-tail* (cauda à cauda) e possui a atividade de vitamina A máxima (100%). As estruturas dos restantes carotenoides precursores de vitamina A incorporam apenas uma molécula de retinol e, portanto, teoricamente, contribuem com 50% da atividade biológica do β -caroteno. Para além do β -caroteno, o α -caroteno e a β -criptoxantina são os que possuem maior atividade de vitamina A (Ball, 2000; Ross & Harrison, 2007). Na Figura 3.3 apresentam-se as estruturas moleculares destes três compostos.

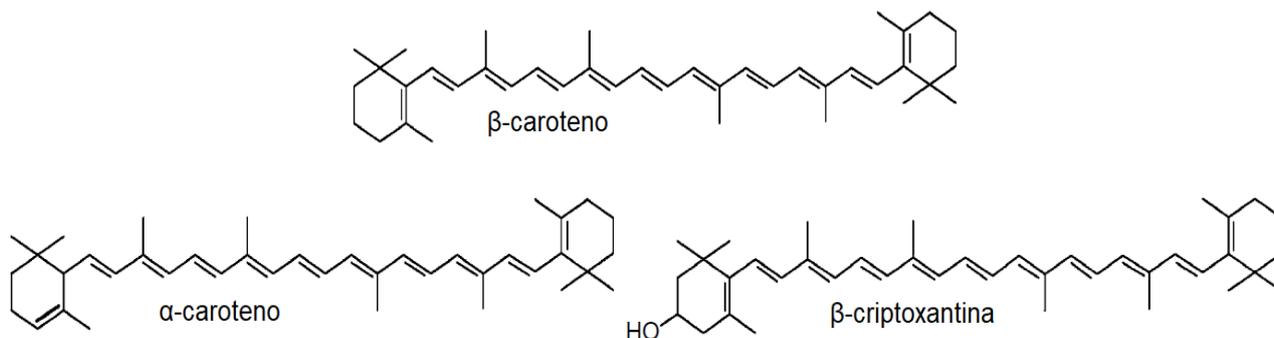


Figura 3.3 Estruturas moleculares dos carotenoides precursores de vitamina A, α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina [Adaptado de: Ross & Harrison, 2007]

FUNÇÃO BIOLÓGICA

A vitamina A é um micronutriente essencial para a visão, para o crescimento e desenvolvimento do corpo e para o sistema imunitário.

► **Visão**

As células recetoras na retina do olho contêm um pigmento sensível à luz chamado púrpura visual (ou rodopsina). Quando exposto à luz, o pigmento desintegra-se nos seus componentes (uma proteína chamada *opsin* e um metabolito de vitamina A chamado retinal) e liberta estímulos elétricos para o cérebro para formar a imagem que se visualiza. Para manter a visão, a rodopsina deve ser novamente formada continuamente com a vitamina A. Um dos primeiros sinais de um baixo estado de vitamina A é a "cegueira noturna" (dificuldade em ver sob luz fraca).

Outra forma de vitamina A é o ácido retinoico, necessário para manter o bom funcionamento da córnea (a camada transparente na frente da íris e da pupila) e da conjuntiva (membrana que reveste as pálpebras e cobre o branco do olho) (FSE, 2013).

► **Crescimento e desenvolvimento**

A vitamina A é importante para o bom funcionamento da maioria dos órgãos no corpo, pois está envolvida na regulação genética da formação e diferenciação celular e na comunicação intercelular, sendo necessária para a reprodução e para o desenvolvimento adequado do feto no útero. Quantidades de vitamina A elevadas ou deficientes podem resultar em malformações do esqueleto, sistema nervoso, coração, olhos e ouvidos. A integridade das células epiteliais em todo o corpo (pele, intestino, coração, pulmões, bexiga, olhos, etc.) depende de um fornecimento adequado de vitamina A. Quando estão em falta, as células epiteliais param de produzir mucosas e "secam" (FSE, 2013).

► **Sistema imunitário**

A vitamina A ajuda a proteger contra infeções de várias formas, garantindo a eficácia das barreiras mecânicas (pele e membranas mucosas) e aumentando a produção e a eficácia das células protetoras, como os fagócitos (que envolvem partículas "estranhas"), células "assassinas" e linfócitos (que produzem anticorpos e outras moléculas para combater contra "intrusos") (FSE, 2013).

Alguns retinoides são muito utilizados como agentes terapêuticos, particularmente no tratamento de doenças dermatológicas, como acne e psoríase. Os efeitos dos retinoides

na diferenciação celular irão, futuramente, levar a muitos outros tratamentos, incluindo ações potenciais contra várias leucemias, malignidades, anormalidades imunológicas e condições inflamatórias (Eitenmiller et al., 2008).

FONTES ALIMENTARES

Para uma grande parte da população humana mundial e, em particular, em partes do mundo em desenvolvimento, os vegetais e as frutas são as principais fontes alimentares de vitamina A. Em outras partes do mundo, o leite, a manteiga, o queijo e os ovos são importantes fontes alimentares de vitamina A. O fígado de animais é também uma fonte particularmente rica, uma vez que este órgão armazena a vitamina para o uso próprio do corpo do animal (Ball, 2004).

De acordo com dados da BAP, a disponibilidade alimentar diária *per capita* de vitamina A, em 2016, foi de 1131,4 µg/hab/dia. Sendo que, os produtos que mais contribuíram para a disponibilidade diária desta vitamina, conforme ilustrado na Figura 3.4, foram a “Carne e miudezas” com 39,5%, seguidos dos “Hortícolas” com 23,6%, do “Leite e produtos lácteos” com 15,2% e dos “Óleos e gorduras” com 9,7% (INE, 2017).



Figura 3.4 Contribuição dos principais grupos alimentares para as disponibilidades diárias *per capita* de vitamina A – 2016 [Adaptado de: INE, 2017]

REQUISITOS NUTRICIONAIS

Ao longo do tempo, têm sido adotadas diferentes unidades para expressar o teor de vitamina A. Tradicionalmente, o teor da vitamina A dos alimentos era expresso em Unidades Internacionais (IUs), uma unidade de bioatividade definida como a quantidade de atividade de vitamina A contida em 0,334 µg de acetato de retinilo, equivalente a 0,3 µg de *all-trans*-retinol. Em 1967, a WHO/FAO recomendou a substituição das IUs por Equivalentes de Retinol (RE). Os RE são definidos como a soma da quantidade de retinol com a quantidade equivalente de retinol que pode ser obtida a partir das fontes de provitamina A, conforme se pode verificar pela equação 3.1.

$$RE = \mu\text{g retinol} + \frac{\mu\text{g } \beta\text{-caroteno}}{6} + \frac{\mu\text{g outra provitamina}}{12} \quad (3.1)$$

Uma vez que a IU se baseou em estudos que não levaram em conta a fraca absorção e biodisponibilidade de carotenoides em alimentos, a equivalência de retinol e β -caroteno no sistema IU difere daquela no sistema RE. No sistema RE, 1 μg de retinol \cong 6 μg β -caroteno, enquanto no sistema IU, 1 μg de retinol \cong 2 μg de β -caroteno.

No entanto, em 2001, o Instituto de Medicina dos Estados Unidos recomendou a substituição dos RE pelo Equivalente de Atividade de Retinol (RAE), redefinindo os valores médios de equivalência de carotenoides em alimentos em comparação com o retinol. Estas mudanças sequenciais nas unidades foram, em grande parte, uma resposta para um melhor conhecimento da eficiência da utilização de carotenoides. Neste novo sistema, 1 μg RAE é definido como 1 μg de *all-trans*-retinol e, portanto, é o mesmo que 1 μg RE. Ambos são iguais a 3,3 IU de retinol. Em matrizes alimentares, de acordo com este sistema, 12 μg de β -caroteno \cong 1 μg de retinol e 24 μg de α -caroteno ou β -criptoxantina \cong 1 μg de retinol (Ball, 2000; Ross & Harrison, 2007).

Os valores de ingestão recomendada para a vitamina A encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Valores de Ingestão Diária Recomendada (DRI) e respectivos Limites Superiores (ULs), para a vitamina A, para cada faixa etária [Fonte: Ross & Harrison, 2007]

Faixa etária	DRI ($\mu\text{g}/\text{dia}$) ^a	UL ($\mu\text{g}/\text{dia}$) ^b
Bebés		
0 - 12 meses	400 ^c	600
Crianças		
1 - 3 anos	300	600
4 - 8 anos	400	900
Adolescentes e adultos masculinos		
9 - 13 anos	600	1700
14 - 18 anos	900	2800
19 a \geq 70 anos	900	3000
Adolescentes e adultas femininas		
9 - 13 anos	600	1700
14 - 18 anos	700	2800
19 a \geq 70 anos	700	3000
Grávidas		
\leq 18 anos	750	2800
19 - 50 anos	770	3000
Amamentação		
\leq 18 anos	1200	2800
19 - 50 anos	1300	3000

^a Como Equivalentes de Atividade de Retinol (RAEs)

^b Como μg de vitamina A pré-formada (retinol)

^c Como Ingestão Adequada (AI)

De acordo com o regulamento da UE nº 1169/2011, o NRV para a vitamina A é de 800 µg.

DEFICIÊNCIA

A deficiência de vitamina A pode ser detetada por diagnóstico clínico ou por avaliação de indicadores bioquímicos ou histológicos. Os sinais clínicos incluem adaptação ao escuro debilitada (cegueira noturna) e lesões oculares (Combs, 2008).

Em geral, os sinais de deficiência que ocorrem são: perda de apetite, crescimento retardado, infecções, pele áspera, cabelo áspero, fraqueza muscular, entre outros. Porém, os sintomas mencionados podem ser sintomas de outro tipo de doenças e por isso os únicos sinais de deficiência de vitamina A que são inequívocos são as lesões oculares: cegueira noturna e xeroftalmia. A xeroftalmia trata-se da dessecação e turvação da córnea e a cegueira noturna manifesta-se como uma perda da capacidade na readaptação rápida ao escuro, depois da retina ser exposta à luz brilhante (Combs, 2008; Roat, 2017).

Como a vitamina A é armazenada em quantidades apreciáveis no fígado, pode ser administrada em doses relativamente grandes e infrequentes com eficácia (Combs, 2008).

TOXICIDADE

A hipervitaminose A refere-se à ingestão de grandes quantidades de alimentos com elevado teor em vitamina A, como o fígado de animais, ou ao uso inapropriado ou acidental de suplementos. O armazenamento hepático de vitamina A tende a mitigar o desenvolvimento de intoxicação devido a ingestões em excesso. No entanto, a ingestão de doses elevadas por períodos longos pode exceder a capacidade do fígado para armazenar e catabolizar a vitamina A e, assim, produzir intoxicação. Alguns estudos sugerem ainda que a ingestão excessiva de retinol pode aumentar a reabsorção óssea e diminuir a formação óssea, bem como aumentar as concentrações de gordura e colesterol no sangue. No entanto, o problema mais grave associado à hipervitaminose A é a teratogenicidade (malformações no recém-nascido) (Ross & Harrison, 2007; Combs, 2008; FSE, 2013).

Os sintomas normalmente são: vômitos, dores de cabeça, tonturas, visão turva, falta de coordenação muscular, funções anormais do fígado e dor em ossos e articulações. Estes sintomas geralmente são reversíveis após a interrupção da ingestão (FSE, 2013).

3.3 VITAMINA D

Existem duas formas químicas de vitamina D, a vitamina D₂ (ergocalciferol) e a vitamina D₃ (colecalfiferol).

A vitamina D, pode ser obtida a partir de fontes alimentares, sendo absorvida no intestino delgado com a ajuda de sais biliares, ou pode ser sintetizada na pele por exposição à luz solar (radiação ultravioleta (UV) na faixa de 290-315 nm). A vitamina D₂ é produzida em fitoplâncton, invertebrados, fermento e fungos, que contêm ergosterol (esterol precursor da vitamina D₂) que pode ser convertido em vitamina D₂ pela irradiação UV. A vitamina D₃, embora também possa ser encontrada em alguns alimentos, é obtida principalmente a partir da irradiação UV do precursor do colesterol, 7-desidrocolesterol, naturalmente presente na pele (Ball, 2000; Norman & Henry, 2007; Alves et al., 2013; FSE, 2013; Chen et al., 2015).

A biossíntese da vitamina D através da pele depende de alguns fatores como o grau de pigmentação da pele, latitude do local de habitação, estação do ano, tipo de vestuário, idade, uso de protetor solar e condições meteorológicas locais. Na raça negra, os níveis de vitamina D, em comparação com a raça branca, são consideravelmente mais baixos, devido à maior pigmentação da pele. Nas latitudes nórdicas, os níveis de vitamina D na população reduzem cerca de 20% a partir do final do verão e até meados do inverno. O uso de protetores solares (fator de proteção solar > 8) reduz a produção desta vitamina em 95%. No entanto, durante os meses de verão, na Europa, cerca de 15 a 30 minutos de exposição corporal ao sol rapidamente originam vitamina D suficiente (Alves et al., 2013, FSE, 2013).

Conforme ilustrado na Figura 3.5, a vitamina D proveniente da biossíntese através da pele ou de fontes alimentares requer uma primeira hidroxilação no fígado pela 25-hidroxilase para formar a 25-hidroxivitamina D (25(OH)D), forma parcialmente hidrossolúvel que circula ligada às proteínas de ligação. Esta requer outra hidroxilação pela 1 α -hidroxilase, no rim, para formar a 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D), a forma biologicamente ativa da vitamina D. Esta forma circula em concentrações mais baixas do que a 25(OH)D, mas tem uma afinidade superior para o recetor, sendo biologicamente mais potente (Alves, et al., 2013).

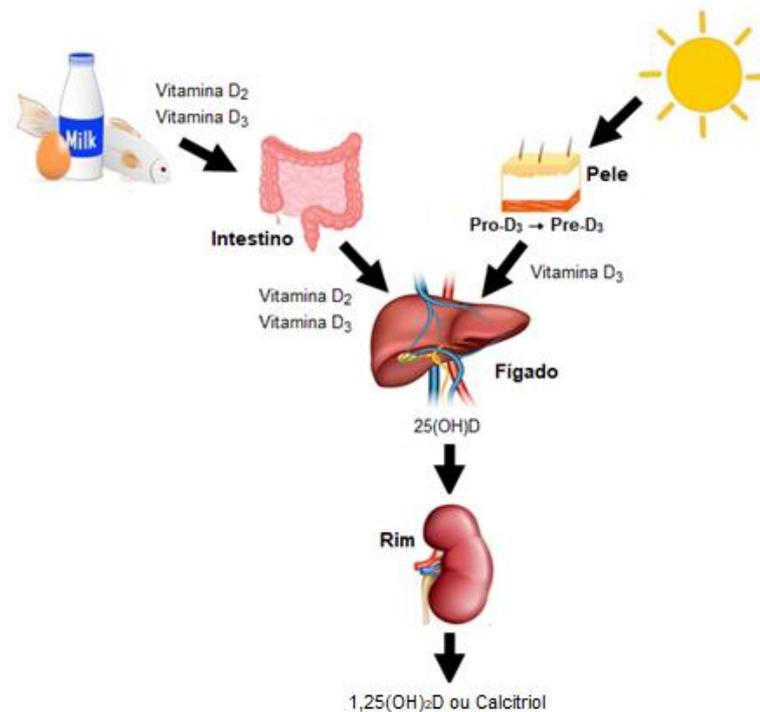


Figura 3.5 Metabolismo da vitamina D [Adaptado de: FSE, 2013]

A via catabólica para a vitamina D é obscura, mas sabe-se que a excreção de vitamina D e dos seus metabolitos ocorre principalmente nas fezes com a ajuda de sais biliares, aparecendo muito pouco na urina (Norman & Henry, 2007).

ESTRUTURA QUÍMICA

Os membros da família D derivam do sistema de anéis de ciclopentanoperidrofenantreno (Figura 3.6), estrutura que é comum a outros esteroides como o colesterol. No entanto, em comparação com o colesterol, a vitamina D possui apenas três anéis intactos, pois o anel B foi submetido à fissão da ligação C₉-C₁₀, resultando no sistema trieno conjugado que está presente em todas as vitaminas D.

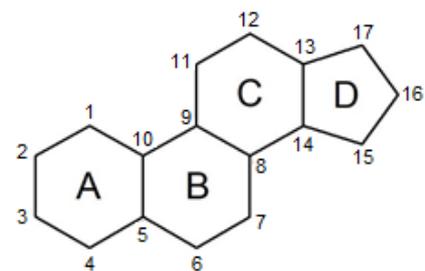


Figura 3.6 Estrutura molecular do ciclopentanoperidrofenantreno [Adaptado de: Ball, 2000]

Os membros da família da vitamina D que ocorrem naturalmente diferem uns dos outros apenas na estrutura das suas cadeias laterais, como se pode ver, por exemplo, para as vitaminas D₂ e D₃, na Figura 3.7 (Norman & Henry, 2007).

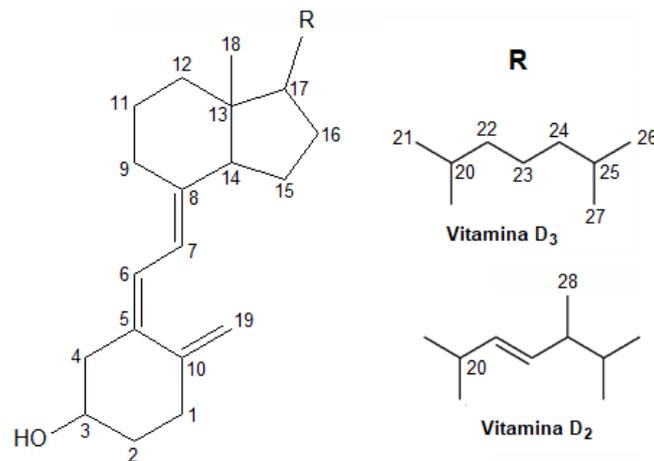


Figura 3.7 Estrutura do colecalciferol (vitamina D₃) e do ergocalciferol (vitamina D₂) [Adaptado de: Ball, 2000]

FUNÇÃO BIOLÓGICA

A vitamina D desempenha um papel importante, juntamente com os minerais essenciais cálcio, fósforo e magnésio, na manutenção dos ossos e dentes saudáveis, uma vez que promove a absorção de cálcio no intestino e adequa as concentrações de cálcio e fosfato para permitir a mineralização óssea adequada, desempenhando também um papel importante na prevenção da osteoporose. Além disso, a vitamina D demonstra efeitos benéficos na função muscular e na força muscular exercida, reduzindo o risco de quedas e fraturas. Os recetores de vitamina D existem em muitos tecidos, indicando que também tem um papel importante no controlo do crescimento e diferenciação celular, ajudando também a aumentar a imunidade (Combs, 2008; FSE, 2013).

Inicialmente, acreditava-se que as atividades biológicas de vitamina D₂ e vitamina D₃ eram essencialmente as mesmas, mas estudos posteriores indicaram que, no Homem, a vitamina D₂ tem apenas 25% a 30% da atividade biológica da vitamina D₃ e, por esse motivo, para alguns investigadores, a vitamina D₂ não é considerada como um nutriente adequado para suplementação (Ball, 2000; Norman & Henry, 2007; Chen et al., 2015). No entanto, estudos mais recentes indicam novamente que, nos adultos, a vitamina D₂ tem sido tão eficaz quanto a vitamina D₃ pois, de acordo com estes estudos mais recentes, os estudos anteriores eram feitos com recurso a comprimidos constituídos por vitamina D₂ ou vitamina D₃ e não a produtos alimentares (Chen et al., 2015).

De acordo com Alves et al. (2013), sem vitamina D, apenas 10-15% do cálcio proveniente de fontes alimentares e cerca de 60% do fósforo são absorvidos e, por outro lado, a suficiência de vitamina D aumenta a absorção de cálcio em 30-40% e o fósforo em 80%.

FONTES ALIMENTARES

As fontes de vitamina D são limitadas, estando presente na maior parte dos alimentos não fortificados em quantidades muito pequenas e variáveis. As maiores fontes são os peixes de água salgada gordos como o arenque, o salmão e as sardinhas, que contêm quantidades substanciais de vitamina D, e óleos de peixe gordo e de fígado de peixe. Os cogumelos, embora haja uma grande controvérsia em relação à vitamina D₂ ser ou não considerada como um nutriente de suplementação adequado, contêm níveis elevados desta vitamina e a exposição dos cogumelos ao sol ou à luz UV artificial pode criar níveis elevados de vitamina D₂ e, por isso, os cogumelos podem ser considerados como a melhor fonte de alimento não-animal de vitamina D. Produtos como os ovos, a carne e o leite contêm apenas baixas quantidades desta vitamina, mas são consumidos em quantidades mais elevadas por determinadas populações (Norman & Henry, 2007; Alves et al., 2013; FSE, 2013; Chen et al., 2015).

No Reino Unido, por exemplo, os peixes e produtos de peixe fornecem geralmente entre 15 e 25% da ingestão de vitamina D₃ e a carne fornece entre 22 e 35% da ingestão geral. Os ovos fornecem entre 11 e 13% da ingestão total de vitamina D (FSE, 2013).

Como a maioria dos alimentos contém apenas quantidades muito baixas de vitamina D, muitos países fortalecem certos alimentos comuns e frequentemente consumidos, como por exemplo, leite, margarina, cereais e misturas de chocolate. Ambas as vitaminas, D₂ e D₃, são utilizadas na fortificação de alimentos. Alguns outros alimentos podem ser enriquecidos indiretamente como resultado da suplementação de alimentos para animais com a vitamina, como é o caso dos ovos em que as galinhas são suplementadas com vitamina D₃ (Norman & Henry, 2007; Combs, 2008; FSE, 2013).

De acordo com dados da BAP, a disponibilidade alimentar diária *per capita* de vitamina D, em 2016, foi de 4,8 µg/hab/dia. Tendo em conta os valores de referência diários desta vitamina (5 µg/hab/dia), a quantidade de vitamina D apurada é inferior, o que indica um défice desta vitamina, uma vez que o valor se refere a disponibilidades alimentares (INE, 2017).

De acordo com a Figura 3.8, o produto que mais contribuiu para a ingestão de vitamina D pela população portuguesa foi o “Pescado” com 62,5%, seguido pela “Carne e miudezas” com um contributo de 27,1%, pelos “Ovos” com 8,3% e pelo “Leite e produtos lácteos” com 2,1% (INE, 2017).

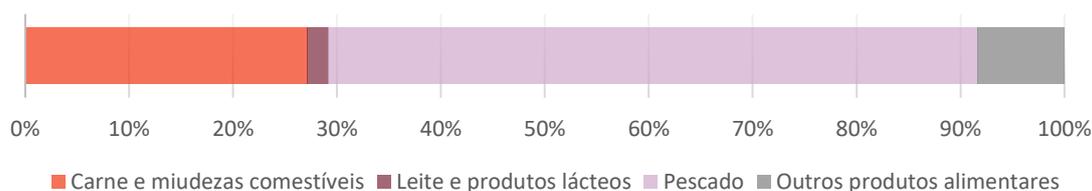


Figura 3.8 Contribuição dos principais grupos alimentares para as disponibilidades diárias *per capita* de vitamina D – 2016 [Adaptado de INE, 2017]

REQUISITOS NUTRICIONAIS

A necessidade de vitamina D em adultos saudáveis nunca foi definida com grande precisão. No entanto, na ausência de luz solar, as fontes nutricionais de vitamina D tornam-se importantes, devendo ser fornecida regularmente (Norman & Henry, 2007).

De acordo com as últimas orientações da Sociedade de Endocrinologia Americana (Holick et al., 2011), estas sugerem o rastreio de vitamina D apenas em indivíduos que estejam em risco de deficiência (por exemplo, indivíduos de raça negra ou nórdicos, como mencionado anteriormente) e não para a população em geral. Assim, recomendam a medição da 25(OH)D sérica circulante para avaliar o estado da vitamina D nos indivíduos em risco de deficiência por um método analítico fiável e consideram uma deficiência de vitamina D como 25(OH)D < 20 ng/mL (50 nmol/L) e uma insuficiência de vitamina D como 25(OH)D entre 21 e 29 ng/mL (525 e 725 nmol/L) (Holick et al., 2011; Rebelo-Marques et al., 2017).

Os bebés entre 0 e 1 anos necessitam, no mínimo, de 400 IU/dia (1 IU = 25 ng) de vitamina D. Após o primeiro ano de vida e até aos 70 anos, os indivíduos necessitam de, no mínimo, 600 IU/dia. Para os adultos com mais de 70 anos as necessidades de vitamina D sobem para 800 IU/dia. No entanto, para manter os níveis séricos de 25(OH)D no sangue persistentemente acima de 30 ng/mL (75 nmol/L), para as idades entre 1 e 18 anos, pode ser necessária uma quantidade mínima de 1000 IU/dia de vitamina D e, para as idades entre 19 e 70 anos e acima dos 70 anos, 1500-2000 IU/dia. As mulheres que estejam grávidas e a amamentar necessitam, pelo menos, de 600 IU/dia de vitamina D, com necessidades entre 1500-2000 IU/dia para manter os níveis séricos de 25(OH)D no sangue acima de 30 ng/mL. (Holick et al., 2011; Rebelo-Marques et al., 2017)

De acordo com o regulamento da UE nº 1169/2011, o NRV para a vitamina D é de 5 µg.

DEFICIÊNCIA

A deficiência de vitamina D pode advir de exposição inadequada à luz solar, má absorção de vitamina D ou consumo insuficiente de alimentos, exposição a certas drogas ou presença de determinadas doenças como doenças de trato gastrointestinal, fígado ou rins, não permitindo converter a vitamina D numa forma ativa (Combs, 2008; Johnson, 2017).

Quando há deficiência de vitamina D, há uma menor absorção de cálcio e fosfato. No caso de não haver cálcio e fosfato suficientes para manter os ossos saudáveis, a falta de vitamina D pode criar um distúrbio ósseo que, nas crianças, se denomina raquitismo e, nos adultos, osteomalacia. Numa mulher grávida, a deficiência de vitamina D provoca deficiência no feto e o recém-nascido pode apresentar um elevado risco de desenvolver raquitismo. A deficiência de vitamina D pode causar ainda o agravamento da osteoporose. Por outro lado, para aumentar o baixo nível de cálcio no sangue causado pela deficiência de vitamina D, o corpo pode produzir uma maior quantidade da hormona paratiroide que, à medida que se torna mais elevada, drena cálcio dos ossos para aumentar o nível de cálcio no sangue e, desta forma, os ossos ficam enfraquecidos (Norman & Henry, 2007; Combs, 2008; Johnson, 2017).

Os sintomas esqueléticos clássicos associados ao raquitismo são pernas arqueadas, joelhos torcidos, coluna vertebral curvada e deformidades pélvicas e torácicas. No caso da osteomalacia, particularmente na coluna vertebral, pélvis e pernas, as zonas afetadas são mais sensíveis e dolorosas ao tato, podendo ocorrer fraturas (Combs, 2008; Johnson, 2017).

O tratamento envolve a ingestão de doses elevadas de vitamina D diariamente, durante 1 a 2 meses ou mais, podendo também ser administrados suplementos de cálcio e de fosfato (Johnson, 2017).

TOXICIDADE

A exposição solar prolongada não provoca toxicidade de vitamina D, pois o excesso de vitamina D₃ é convertido em isómeros biologicamente inertes (Rebelo-Marques et al., 2017). No entanto, a ingestão excessiva de vitamina D proveniente de fontes alimentares pode levar à hipercalcemia (concentração de cálcio no sangue muito elevada) e possivelmente à hipercalciúria (aumento da excreção de cálcio na urina). A hipercalcemia prolongada pode causar pedras nos rins e a calcificação de tecidos moles, incluindo rins, vasos sanguíneos, coração e pulmões. Outros sintomas de

hipervitaminose D incluem perda de apetite, perda de peso, fraqueza, fadiga, sede, desorientação e vômitos (FSE, 2013).

3.4 VITAMINA E

Vitamina E é o termo coletivo para os compostos que exibem atividade biológica de α -tocoferol. Geralmente, estão incluídos na família da vitamina E oito homólogos de ocorrência natural, sendo eles o α -, β -, γ -, e δ -tocoferol, e os tocotrienóis insaturados correspondentes (α -, β -, γ -, e δ -tocotrienol) (Eitenmiller *et al.*, 2008). No entanto, em 2000, a *Food and Nutrition Board* (FNB) do Instituto de Medicina dos Estados Unidos definiu o α -tocoferol como a única forma que atende os requisitos de vitamina E para os humanos, pois apenas o α -tocoferol mostrou reverter os sintomas de deficiência de vitamina E nos humanos, possuindo a atividade relativa de vitamina E máxima (100%) (Ball, 2000; Traber, 2007). Por este facto nos estudos efetuados com vitaminas, dos oito homólogos, passou a quantificar-se apenas o α -tocoferol. Porém, nem todos os autores concordam com a quantificação de apenas este homólogo, havendo estudos da determinação simultânea dos diversos homólogos.

Os ésteres de vitamina E são facilmente hidrolisados no intestino e são absorvidos como α -tocoferol, não ficando acumulados no fígado. Isto sugere que a excreção e o metabolismo são importantes, no entanto, o seu mecanismo de ação ainda não se encontra bem esclarecido. Porém, sabe-se que a eliminação fecal é a principal via de excreção desta vitamina (Traber, 2007; Belitz *et al.*, 2009).

ESTRUTURA QUÍMICA

Os tocotrienóis diferem estruturalmente dos tocoferóis. Os grupos metilo (CH_3) na “cabeça” (anel aromático) determinam se a molécula é α -, β - ou γ -, ou δ -, enquanto a “cauda” (cadeia lateral isoprenoide) determina se a molécula é um tocoferol ou um tocotrienol.

Se a cadeia lateral estiver saturada, trata-se de um tocoferol, enquanto que se tiver ligações duplas, é um tocotrienol. Os prefixos α -, β -, γ -, e δ - são atribuídos de acordo com o número e a localização dos grupos metilo no anel de cromanol (“cabeça”). Os homólogos α contêm três grupos metilo, os homólogos δ contêm apenas um grupo metilo e os homólogos β e γ tratam-se de isómeros posicionais dimetilados (Traber, 2007; Eitenmiller *et al.*, 2008). Estas inter-relações estruturais encontram-se ilustradas na Figura 3.9.

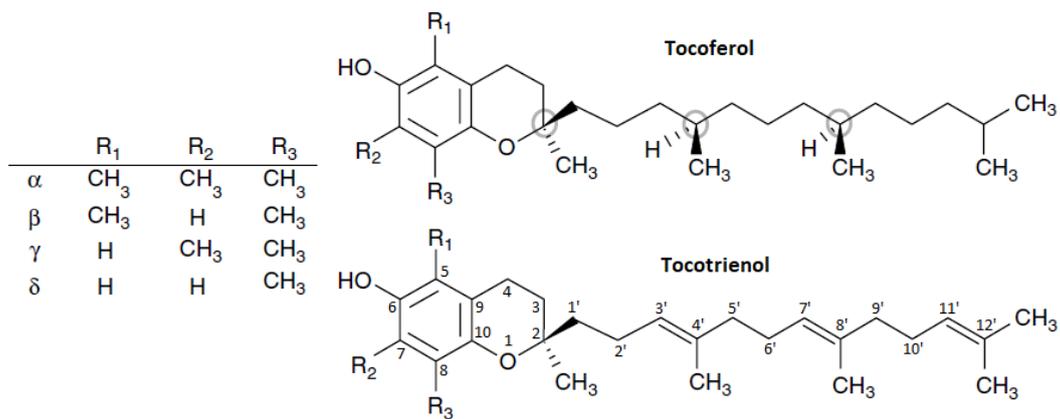


Figura 3.9 Estruturas moleculares da vitamina E [Adaptado de Traber, 2007]

FUNÇÃO BIOLÓGICA

A atividade da vitamina E baseia-se principalmente nas suas propriedades antioxidantes, sendo reconhecida há muito tempo como o principal antioxidante lipídico solúvel do corpo e, portanto, é fundamental na manutenção da integridade e funcionalidade das membranas celulares de todas as células do corpo humano. Como antioxidante, a vitamina E atua dentro das membranas celulares, protegendo os ácidos gordos insaturados de oxidação. Ao fazê-lo, a vitamina é oxidada e deve ser "reciclada" de volta à sua forma ativa, atividade normalmente efetuada pela vitamina C (FSE, 2013).

Devido ao seu papel como antioxidante, a vitamina E foi sugerida como papel crucial em todas as condições associadas ao aumento do stress oxidativo, do qual podem resultar doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios envolvendo inflamação crónica, cancro e distúrbios neurológicos. Além de sua função antioxidante, a vitamina E demonstrou ter papéis específicos na transdução de sinal, expressão genética e regulação de outras funções celulares (FSE, 2013).

No entanto, a vitamina E não só contribui para a estabilização das estruturas de membrana, como também estabiliza outros agentes ativos (por exemplo, vitamina A, ubiquinona, hormonas e enzimas) contra a oxidação (Belitz, et al., 2009).

À vitamina E tem também sido atribuído um papel na prevenção da aterosclerose e doenças cardíacas devido aos seus efeitos benéficos em vários mecanismos envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose (tais como inibição da oxidação de Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL), efeitos anti-inflamatórios e inibição da proliferação de células do músculo liso). Na prevenção das doenças cardíacas, no entanto, o papel da vitamina E é atualmente uma questão de debate. Sabe-se também que a vitamina E retarda a agregação de plaquetas no sangue (Belitz et al., 2009; FSE, 2013).

FONTES ALIMENTARES

A vitamina E encontra-se amplamente distribuída em nozes, sementes, frutos, vegetais e gramíneas. As fontes alimentares mais ricas em vitamina E são os óleos vegetais comestíveis, uma vez que só as plantas é que conseguem sintetizar esta vitamina. O RRR- α -tocoferol é especialmente elevado em óleos de gérmen de trigo, cártamo, açafraão e girassol. Os óleos de soja e milho contêm predominantemente a forma γ -RRR-tocoferol, bem como alguns tocotrienóis. O óleo de algodão, bem como o óleo de palma, contêm α -tocoferol e γ -tocoferol em igual proporção. Nas frutas e nos vegetais, assim como nos alimentos provenientes dos animais (como carne, peixe e produtos lácteos), a vitamina E encontra-se em concentrações relativamente baixas (Traber, 2007; Combs, 2008; FSE, 2013).

Os alimentos que são processados com óleos vegetais tendem a variar muito no conteúdo de vitamina E devido aos diferentes tipos de óleos que podem ser utilizados e às estabilidades térmicas dos vitâmeros E presentes (Combs, 2008).

Devido à interação dos tocoferóis e tocotrienóis com eventos oxidativos em alimentos, pela sua função como antioxidantes, o manuseio físico associado à colheita e armazenamento de matérias-primas e, em seguida, processamento e comercialização adicionais, podem produzir alterações significativas nos níveis de vitamina E. Dependendo dos fatores ambientais e do stress oxidativo colocado na mercadoria pela cadeia de eventos necessária para entregar o alimento fresco ou processado ao consumidor, essas mudanças podem ser bastante severas, com potencial para perda completa, podendo esta perda ser iniciada em qualquer um dos eventos mencionados. Do mesmo modo, o armazenamento e a preparação dos alimentos pelo consumidor podem ter efeitos dramáticos sobre a retenção de vitamina E no momento em que os alimentos vão ser consumidos. Devido a esta instabilidade da vitamina E, o teor da mesma, em alimentos e em produtos alimentares, varia consideravelmente (Combs, 2008; Eitenmiller et al., 2008).

Devido à sua instabilidade, a principal forma de vitamina E na maioria dos alimentos é o γ -tocoferol, que não é tão biopotente como o α -tocoferol (Combs, 2008).

Nos alimentos com maior teor de gordura, a concentração de vitamina E é muito superior às concentrações das vitaminas A e D (Ball, 2000).

De acordo com os dados da BAP, a disponibilidade alimentar diária *per capita* de vitamina E, em 2016, foi de 33 $\mu\text{g}/\text{hab}/\text{dia}$. Sendo que, conforme ilustrado na Figura 3.10, cerca de 81% da vitamina E disponível por dia e por habitante resultou do

contributo dos “Óleos e gorduras”, cerca de 5,5% dos “Frutos (incluindo a azeitona)” e cerca de 3,9% dos “Hortícolas” (INE, 2017).

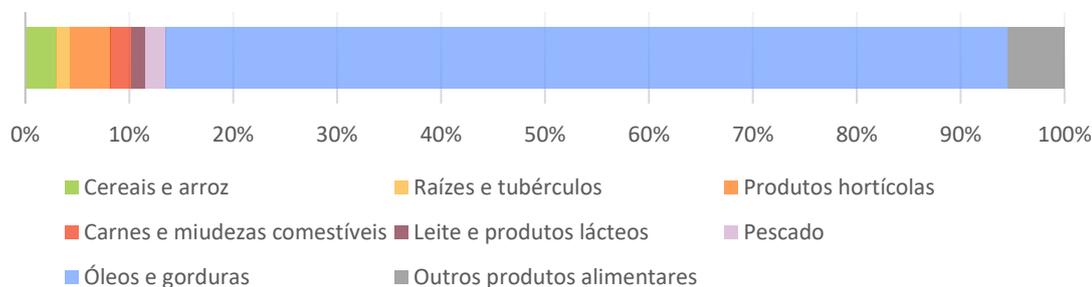


Figura 3.10 Contribuição dos principais grupos alimentares para as disponibilidades diárias *per capita* de vitamina E – 2016 [Adaptado de INE, 2017]

REQUISITOS NUTRICIONAIS

As DRIs para a vitamina E foram publicadas em 2000 pelo FNB do Instituto de Medicina dos Estados Unidos e encontram-se na Tabela 3.4, para bebés, crianças e adolescentes.

Para os adultos (homens e mulheres com idade superior ou igual a 19 anos), incluindo mulheres grávidas, o valor de DRI é de 15 mg/dia. No caso de a mulher ser lactante, o DRI aumenta para 19 mg/dia. O UL para a vitamina E foi fixado em 1000 mg/dia (FNB, 2000; Traber, 2007).

De acordo com o regulamento da UE nº 1169/2011, o NRV para a vitamina E é de 12 mg.

Tabela 3.4 Valores de Ingestão Diária Recomendada (DRI), para a vitamina E, para cada faixa etária [Fonte: Combs, 2000]

Faixa etária	DRI (mg/dia)
Bebés	
0 - 6 meses	4
7 - 12 meses	5
Crianças	
1 – 3 anos	6
4 – 8 anos	7
Adolescentes masculinos	
9 – 13 anos	11
14 – 18 anos	15
Adolescentes femininas	
9 – 13 anos	11
14 – 18 anos	15

DEFICIÊNCIA

A deficiência de vitamina E ocorre muito raramente em seres humanos e, na maioria das vezes, nunca ocorre como resultado de deficiências alimentares, mas sim como resultado de problemas genéticos na produção de α -TTP (*α -tocopherol transfer protein*), síndromes de má absorção de gordura e desnutrição proteico-energética (Traber, 2007; Eitenmiller *et al.*, 2008).

Uma má absorção de gordura pode resultar de distúrbios pancreáticos e hepáticos que reduzem a absorção da mesma, problemas nas células intestinais, comprimento do intestino e defeitos na síntese ou composição de quilomícrons (lipoproteínas que transportam os triglicéridos a partir do intestino para o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo). As anormalidades genéticas no metabolismo das lipoproteínas podem produzir níveis baixos a não detetáveis de quilomícrons circulantes, Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade (VLDL) e Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL), afetando a absorção e o transporte plasmático da vitamina E. O α -tocoferol plasmático é controlado pela α -TTP hepática. Esta proteína é necessária para facilitar a transferência de α -tocoferol do fígado para o plasma. Em humanos, um defeito genético nesta proteína resulta numa grave deficiência de vitamina E, pelo que os defeitos genéticos na sua produção estão associados a uma síndrome característica, a Ataxia com Deficiência de Vitamina E (AVED), caracterizada por alterações neurológicas, que leva à diminuição da capacidade de incorporar RRR- α -tocoferol nas VLDL (Traber, 2007; Eitenmiller *et al.*, 2008).

Os distúrbios associados à deficiência de vitamina E são distúrbios na reprodução, músculos, fígado, medula óssea e função cerebral e diátese de embriogénese defeituosa (transtorno de permeabilidade capilar). Nos seres humanos, as primeiras manifestações da deficiência de vitamina E incluem ataxia espinocerebelar, miopatia esquelética e retinopatia pigmentosa. No entanto, o estado clínico da vitamina E no ser humano é difícil de avaliar devido ao facto de a vitamina E armazenada no corpo diminuir muito lentamente e os índices bioquímicos utilizados (níveis de soro, eritrócitos, plaquetas e tecido de tocoferol) não serem índices efetivos. Níveis de α -tocoferol no soro inferiores a 11,6 $\mu\text{mol/L}$, em adultos, são uma indicação de uma deficiência bioquímica de vitamina E, contudo, nem sempre indicam uma deficiência clínica. Neste sentido, o Instituto de Medicina Americano considerou a hemólise induzida por peróxido de hidrogénio, usado em conjunto com as concentrações plasmáticas de α -tocoferol, como o melhor biomarcador para estimar os requisitos de α -tocoferol em adultos humanos. (FNB, 2000; Trabber, 2007; Eitenmiller *et al.*, 2008).

TOXICIDADE

A vitamina E é uma das vitaminas menos tóxicas. Estudos em animais demonstraram que o α -tocoferol não é mutagénico, carcinogénico ou teratogénico e em estudos com humanos, a suplementação oral desta vitamina mostrou ser inofensiva mesmo em doses superiores ao UL. No entanto, em doses demasiado elevadas, esta vitamina pode antagonizar as funções de outras vitaminas lipossolúveis. Animais com sobredosagem de vitamina E mostraram mineralização óssea prejudicada e redução do armazenamento hepático de vitamina A, mas ambos conseguiram ser corrigidos com suplementos alimentares da vitamina apropriada. Relatórios isolados de efeitos negativos em humanos que consomem mais de 1000 mg/dia de α -tocoferol incluem dor de cabeça, fadiga, náuseas, visão dupla, fraqueza muscular e distúrbios gastrointestinais (Traber, 2007; Combs, 2008).

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS (A, D E E)

De uma forma geral, os ensaios para determinação de vitaminas podem ser classificados em:

1. **Bioensaios** envolvendo seres humanos e animais;
2. **Ensaio microbiológico** utilizando organismos protozoários, bactérias e leveduras;
3. **Ensaio físico-químico** que incluem métodos espectrofotométricos, fluorométricos, cromatográficos, enzimáticos, imunológicos e radiométricos.

Cada tipo de método tem as suas vantagens e desvantagens e por isso a eleição de um determinado método de análise para uma determinada vitamina ou vitaminas deve ter em conta alguns fatores como a exatidão e a precisão do método, requisitos de tempo e instrumentação, o tipo de matriz a ser analisada, bem como o número de amostras a analisar, e requisitos regulamentares. Por outro lado, o analista deve também escolher a combinação adequada de técnicas para a extração, isolamento, purificação e medição (Strohecker et al., 1967; Pegg et al., 2010).

A utilização de ensaios biológicos tem sido sucessivamente limitada aos casos em que não está disponível qualquer método alternativo adequado, ou em casos em que se necessita de informação sobre a biodisponibilidade do analito, pois estes são extremamente demorados, requerendo muito tempo na implementação. Não bastando,

são geralmente caros e os seus intervalos de erro são, frequentemente, muito amplos. No entanto, os bioensaios têm a vantagem de que, por vezes, não requerem a preparação de um extrato, eliminando assim a probabilidade de alterações indesejáveis do analito durante a preparação do extrato. Por outro lado, os bioensaios estão limitados a testes em animais, os quais têm sido cada vez mais restringidos. Por estes motivos, nos últimos anos, os métodos microbiológicos e físico-químicas têm vindo sucessivamente a substituir os ensaios biológicos, pois tratam-se de métodos mais rápidos e mais baratos e, no geral, os seus intervalos de erro são inferiores (Strohecker et al., 1967; Pegg et al., 2010).

Tanto os métodos microbiológicos como os físico-químicos requerem a extração de vitaminas e, de uma forma geral, os resultados obtidos através destes métodos representam o teor total de uma determinada vitamina numa determinada matriz (alimentos, por exemplo), e não necessariamente a sua biodisponibilidade para os seres humanos (Pegg et al., 2010).

Os ensaios microbiológicos, embora sejam mais sensíveis e específicos para cada vitamina, já praticamente não são utilizados nos dias de hoje. Nestes métodos, em comparação com os ensaios físico-químicos, normalmente é necessária menos preparação de amostra, mas, no entanto, são também demorados (Pegg et al., 2010).

Atualmente, os métodos físico-químicos, em particular os métodos de HPLC com diferentes técnicas de deteção, são os principais métodos analíticos para a quantificação de vitaminas, devido ao seu alto poder de resolução, especificidade e sensibilidade. Esses métodos requerem uma preparação prévia das amostras para análise, de forma a separar-se as vitaminas de matrizes complexas, porém, a duração deste procedimento é muito importante, uma vez que a maioria das vitaminas não são estáveis em soluções e decompõem-se quando expostas à luz, oxigénio, pH e calor, devendo ser tomadas precauções (Karaźniewicz-Łada & Główka, 2016).

As vitaminas lipossolúveis são fotossensíveis e, portanto, em todas as operações com soluções vitamínicas e materiais contendo vitaminas devem ser tomadas precauções adequadas para evitar qualquer deterioração ao longo do processo analítico. Deste modo, as operações devem ser realizadas sob luz moderada ou em vidro âmbar baixo em actínico e, idealmente, a iluminação deve ser fornecida artificialmente por lâmpadas fluorescentes amarelas/douradas. Estas vitaminas também são sensíveis ao ar, temperaturas elevadas e humidade, pelo que também se deve evitar temperaturas muito altas e utilizar azoto e/ou vácuo (Ball, 2000; Pegg et al., 2010).

Embora o investimento em HPLC seja elevado, têm sido relatados cada vez mais métodos diferentes para a análise de vitaminas lipossolúveis em diversos tipos de matrizes, incluindo alimentos e produtos para alimentação animal, amostras biológicas e produtos farmacêuticos, sendo cada vez mais recorrente o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de identificar e quantificar várias vitaminas e compostos relacionados numa só corrida cromatográfica. No entanto, existem dificuldades na determinação simultânea de vitaminas lipossolúveis, uma vez que as vitaminas estão presentes como vitâmeros estruturalmente relacionados e sob formas sintéticas, exigindo métodos de separação altamente eficientes, e também porque as concentrações das diferentes vitaminas presentes numa mesma amostra variam muito, requerendo métodos analíticos com alta sensibilidade e seletividade e aplicáveis numa elevada gama. Além disso, quanto mais componentes estiverem presentes nos alimentos ou nos suplementos alimentares multivitamínicos, maior o risco de serem observadas interferências (Nimalaratne et al., 2014).

A fração lipídica de alimentos que contém vitaminas lipossolúveis é composta principalmente por triglicéridos, com quantidades muito menores de esteróis, carotenoides, fosfolípidos e constituintes lipídicos menores. Todas estas substâncias exibem propriedades de solubilidade semelhantes às das vitaminas lipossolúveis e, por isso, constituem uma potencial fonte de interferência durante a análise cromatográfica. Uma proporção do conteúdo de vitamina lipossolúvel original de um alimento está ligada a um complexo de lipoproteínas e, portanto, para a vitamina ser libertada, as ligações gordura-proteína devem ser quebradas. Neste sentido, a saponificação é o meio mais efetivo para a remoção de lípidos não desejados (Ball, 2000; Fanali et al., 2017).

Para um ensaio ser bem sucedido é essencial que as vitaminas sejam extraídas quantitativamente da matriz alimentar de forma a poderem ser quantificadas com exatidão. Um procedimento de extração eficaz serve para homogeneizar e concentrar a amostra, isolar o analito, ou seja, a vitamina, da sua associação com proteína, eliminar, na medida do possível, substâncias interferentes conhecidas e destruir qualquer atividade enzimática (Ball, 2000).

Deste modo, quando se seleciona um método de análise, pelo menos inicialmente, é aconselhável considerar a utilização de métodos oficiais ou normalizados, já testados através de estudos interlaboratoriais, publicados por organizações como a AOAC *International* (*Association of Official Analytical Chemists*), o Comité Europeu de Normalização (CEN), a Convenção Farmacêutica dos Estados Unidos, ou a AACC *International* (*American Association of Cereal Chemists*) (Pegg et al., 2010).

Na Tabela 3.5 apresentam-se alguns dos métodos oficiais utilizados na determinação das vitaminas A, E e D.

Tabela 3.5 Métodos oficiais frequentemente utilizados na análise de vitaminas [Fonte: Pegg et al., 2010]

VITAMINA	MÉTODO	APLICAÇÃO	ABORDAGEM
Vitamina A			
Retinol	AOAC 992.04	Vitamina A em fórmulas infantis à base de leite	HPLC UV 340 nm
	AOAC 2001.13	Vitamina A em alimentos	HPLC UV 328 nm ou 313 nm
All- <i>trans</i> -retinol 13- <i>cis</i> -retinol	EN 12823-1	Vitamina A em alimentos	HPLC UV 325 nm ou Fluorescência $\lambda_{\text{excitação}} = 325 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emissão}} = 475 \text{ nm}$
Vitamina D			
Colecalciferol Ergocalciferol	AOAC 936.14	Vitamina D em alimentos	Bioensaio
	AOAC 995.05	Vitamina D em fórmulas infantis e produtos intestinais	HPLC UV 265 nm
	EN 12821	Vitamina D em alimentos	HPLC UV 265 nm
Vitamina E			
R, R, R - tocoferóis	EN 12822	Vitamina E em alimentos	HPLC UV 292 nm ou Fluorescência $\lambda_{\text{excitação}} = 295 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emissão}} = 330 \text{ nm}$

3.5.1 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração é o passo-chave na análise de vitaminas. No entanto, apresenta uma série de dificuldades, tais como:

1. Instabilidade química em relação à luz, oxigênio, calor, bases e ácidos;
2. Heterogeneidade química entre os diferentes vitâmeros;
3. Diferentes e/ou baixos níveis de concentração em amostras de alimentos;
4. Complexidade da matriz.

Os métodos de extração de vitaminas lipossolúveis incluem hidrólise alcalina (saponificação), extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração com fluído supercrítico. A extração líquido-líquido é o tipo de extração mais utilizado. Em geral utilizam-se solventes orgânicos, por questões de solubilidade (Ball, 2000; Luque-García & Luque de Castro, 2001).

A hidrólise alcalina, ou saponificação, tem sido a ferramenta mais efetiva para a extração dos micronutrientes lipossolúveis a partir de alimentos. A reação de hidrólise “ataca” as ligações éster, libertando os ácidos gordos e as vitaminas. Desta forma, as condições alcalinas removem efetivamente a preponderância de triglicéridos de amostras alimentares com gordura e liberta as vitaminas A, D e E das respectivas matrizes, utilizando-se esta operação para simplificar a posterior extração destas vitaminas. No entanto, esta saponificação tem desvantagens inerentes que incluem a formação de emulsões e a degradação de analitos (especialmente vitamina E e retinoides). A saponificação pode também ser aplicada a frio (temperatura ambiente), mas, em comparação com a anterior, a quente, esta saponificação é ainda mais desvantajosa, uma vez que demora cerca de 15 h, em vez de cerca de 30 minutos, tendo de ser realizada durante a noite (Ball, 2000; Jedlička & Klimeš, 2004; Fanali et al., 2017).

De acordo com Ball, a saponificação é convencionalmente realizada por refluxo da amostra preparada com uma mistura de etanol com uma solução de hidróxido de potássio (KOH), na presença de um antioxidante. E, posteriormente, os esteróis, as vitaminas lipossolúveis que constituem a fração não saponificável, são extraíveis do resíduo de saponificação por extração líquido-líquido utilizando um solvente orgânico não miscível com água. Como os ácidos gordos, que precipitam sob a forma dos seus sais de potássio (sabões), e o glicerol, não são extratáveis sob condições alcalinas, as vitaminas conseguem extrair-se com facilidade (Ball, 2000).

No entanto, embora a extração líquido-líquido seja a técnica de eleição, a mesma tem bastantes desvantagens associadas como o uso de solventes tóxicos, a dificuldade de automatização e o facto de envolver procedimentos demorados (Jedlička & Klimeš, 2004).

Nos métodos convencionais que exploram a técnica de HPLC com coluna C18 de fase inversa, as vitaminas A, E e D, por serem altamente hidrofóbicas, apresentam alta afinidade por esta fase estacionária e, por isso, para promover a sua eluição é necessário utilizar altas concentrações de metanol e acetonitrilo para aumentar a afinidade destas vitaminas pela fase móvel, o que torna a eliminação do solvente orgânico neste tipo de coluna uma tarefa muito difícil. Assim, para contornar esse problema, Kienen et al. (2007), propuseram um método analítico cromatográfico verde para determinar as vitaminas lipossolúveis em alimentos e suplementos farmacêuticos, no qual exploraram a utilização de um meio micelar através da modificação de uma coluna C18 com uma solução aquosa de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 3% (m/v) e na utilização da mesma solução surfactante como fase móvel, na presença de álcool butílico a 15% (v/v) como solvente orgânico modificador. Neste método, ao utilizar um meio micelar, o mecanismo da separação é alterado, pois à medida que o surfactante é absorvido pela fase estacionária, a sua polaridade aumenta e, ao mesmo tempo, as características da fase móvel também são alteradas, conseguindo apresentar afinidade pelas vitaminas de baixa polaridade, pois a presença do surfactante induz a formação de micelas.

Ainda no contexto do desenvolvimento e da utilização de métodos verdes, têm sido desenvolvidas técnicas à base de fluídos comprimidos e técnicas de extração miniaturizadas (microextrações) (Fanali et al., 2017).

Em alternativa à extração líquido-líquido existem os outros dois tipos de extração: Extração com Fluido Supercrítico (SFE) e Extração em Fase Sólida (SPE). Nos anos mais recentes, devido às desvantagens inerentes à extração líquido-líquido, estas duas técnicas têm sido mais estudadas, de forma a desenvolverem-se métodos que sejam capazes de extrair as vitaminas A, E e D. Neste sentido, por HPLC de fase inversa (HPLC-RP) com detetor de rede de fotodíodos (PAD) e recorrendo à SPE, Chirkin et al. (2013) propuseram um método capaz de determinar as vitaminas A, D e E em amostras de manteiga, ovo e fígado de galinha e Plonka et al. (2012) conseguiram desenvolver um método que permite a determinação simultânea não só das vitaminas A, D e E como também de algumas vitaminas hidrossolúveis (B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂ e C) em amostras de fruta (damasco e abacate) e sumos de fruta/vegetais. Após SFE e por HPLC-RP,

Berg et al. (2000) conseguiram separar as vitaminas A e E de uma amostra de pasta de fígado recorrendo a um detetor de fluorescência e de uma amostra de leite recorrendo a um detetor UV.

A SPE trata-se de uma tecnologia em que a amostra passa por uma coluna (fase estacionária) que contém partículas apropriadas, designadas por material de empacotamento cromatográfico, e a corrente de solvente (fase móvel) que flui através da coluna e arrasta a amostra através da mesma, de forma a separar quimicamente os seus diferentes componentes e, assim, tornar os testes analíticos subsequentes mais bem sucedidos (Arsenault et al., 2014).

Nesta tecnologia, os principais objetivos são a remoção de interferentes da matriz, o isolamento e a extração e/ou concentração dos analitos. E, tal como acontece em HPLC, os compostos podem ser retidos pelo sorvente por SPE de fase inversa, SPE de fase normal, SPE de troca iónica e também por adsorção (Sigma-Aldrich, 1998; Jardim, 2010; Arsenault & McDonald, 2014).

O procedimento da SPE, após o condicionamento (primeiro passo) do sorvente com um solvente apropriado para solvatar os grupos funcionais da fase estacionária, pode ser feito em modo de “limpeza (*cleanup*) da amostra”, que inclui as etapas de introdução da amostra, lavagem da coluna e eluição do analito ou em modo de “remoção da matriz”, em que o extrato de amostra é colocado na coluna, passando o analito e ficando retido o material não desejado. A estratégia de *cleanup* é utilizada quando se quer concentrar e/ou isolar os compostos de interesse e a estratégia de “remoção da matriz” é geralmente escolhida quando o analito está presente em elevada concentração (Ball, 2000).

Para alguns autores, o modo de limpeza da amostra é a chamada SPE e o modo de remoção da matriz é designada por Extração Líquida de suporte Sólido (SLE). Independente do modo empregue, o material que se utiliza com mais frequência é uma coluna pequena de plástico com a forma de seringas de barril e fluxo forçado por vácuo. O sorvente mais utilizado é o C18 (Luque-García & Luque de Castro, 2001; Arsenault & McDonald, 2014). No entanto, de acordo com os estudos realizados por Chirkin et al. (2013), o uso de um sorvente polar como o aminopropil ligado a sílica provou ser uma alternativa vantajosa aos sorventes não polares.

Comparando com a extração líquido-líquido, a SPE é mais eficiente, mais rápida, as extrações quantitativas são mais fáceis de executar, utiliza menos solventes e pode ser automatizada, tendo ainda a capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito por um fator de 100 a 5000, tornando possível a análise quantitativa e qualitativa de analitos que se encontrem em quantidades vestigiais, isto é, na escala dos microgramas aos nanogramas. Porém, na SPE, os custos dos cartuchos/colunas são elevados e, por vezes, é difícil selecionar o sorvente adequado à matriz desejada. Não bastando ser caros, os cartuchos só podem ser utilizados uma vez e, geralmente, a reprodutibilidade de lote para lote é baixa (Sigma-Aldrich, 1998; Jardim, 2010).

A SFE, na última década, tem provado ser uma das descobertas mais significantes no pré-tratamento de amostras sólidas (Luque-García & Luque de Castro, 2001). Em aplicações com vitaminas lipossolúveis, o dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) é o fluído utilizado com mais frequência devido à sua baixa temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c), a ser quimicamente inerte, de baixo custo e por ser de baixa viscosidade e não inflamável. No entanto, a maior desvantagem ao utilizar-se o CO₂-SC é a sua característica não polar, sendo por vezes necessário adicionar-lhe pequenas quantidades de um modificador orgânico polar, como o metanol (Turner et al., 2001).

Este método moderno, por poder ser realizado a temperaturas mais baixas do que a extração líquido-líquido e por, durante a extração, a amostra estar sob uma atmosfera inerte e protegida da luz, consegue reduzir os problemas associados à degradação do analito, oferecendo condições de extração menos agressivas. Para além disso, comparativamente aos métodos de extração convencionais, este método oferece ainda uma seletividade potencialmente elevada e tempos de extração menores (Ball, 2000; Turner et al., 2001).

3.5.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Atualmente, de acordo com a definição da IUPAC, a cromatografia é um método físico de separação em que os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, sendo que uma delas está estática (fase estacionária) e a outra (a fase móvel) move-se numa direção definida (Ettre, 1993; Skoog et al., 2006).

Ao longo dos anos, a cromatografia tem vindo a ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis, e para a separação dos componentes de uma mistura (Degani et al., 1998; Skoog et al., 2006).

As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas de acordo com diversos critérios, estando os mais comuns relacionados com a forma física do sistema cromatográfico, com a fase móvel ou a fase estacionária utilizada e com o modo de separação. Tendo em conta a forma física do sistema cromatográfico, a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar. A cromatografia planar resume-se à cromatografia em papel e à cromatografia em camada fina, enquanto a cromatografia em coluna engloba diversos tipos de cromatografia, os quais são mais bem compreendidos se classificados pelo critério relacionado com a fase móvel utilizada. Segundo este critério, são três os tipos de cromatografia: a cromatografia líquida, a cromatografia com fluido supercrítico e a cromatografia gasosa (Degani et al., 1998).

O método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) é o tipo de cromatografia mais utilizado nos ensaios realizados com vitaminas. Originalmente, o acrónimo HPLC, criado pelo falecido Prof. Csaba Horváth, era utilizado para a cromatografia líquida de alta pressão (*High Pressure Liquid Chromatography*), onde eram utilizadas bombas com uma capacidade de pressão de apenas 500 psi (35 bar). Mas, no início da década de 1970, houve um tremendo salto na tecnologia, no qual os novos instrumentos HPLC já conseguiam chegar a pressões até 6000 psi (400 bar) e incorporar injetores, detetores e colunas mais desenvolvidas. A partir desta década, este tipo de cromatografia começou a ser cada vez mais aperfeiçoada, pelo que, com os avanços continuados na performance (ou seja, partículas cada vez mais pequenas e pressões cada vez mais elevadas), levaram à alteração do nome para cromatografia líquida de alta resolução (*High-Performance Liquid Chromatography*), tal como é conhecida nos dias de hoje (Collins et al., 1997; Arsenault & McDonald, 2014).

Os componentes de um sistema básico de HPLC apresentam-se no diagrama simples da Figura 3.11.

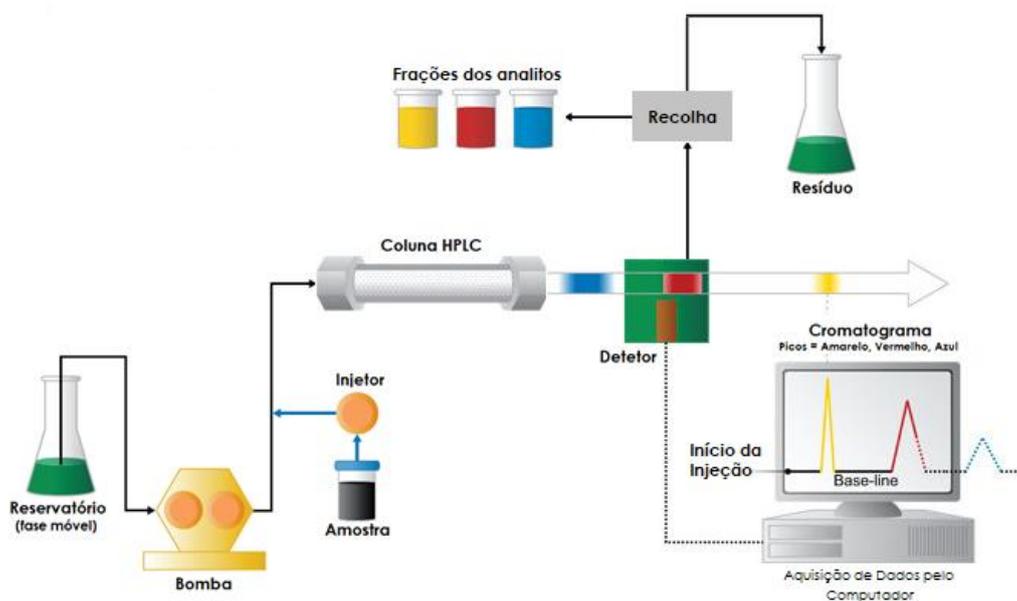


Figura 3.11 Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução [Adaptado de: (Arsenault & McDonald, 2014)]

Os componentes de um sistema de HPLC incluem uma bomba, um injetor, uma coluna, um detetor e um sistema de aquisição/apresentação de dados e/ou um integrador. A bomba de alta pressão (sistema de distribuição de solvente ou gerador de solvente) é utilizada para gerar e medir um caudal especificado de fase móvel, normalmente em mililitros por minuto. O tipo e a composição da fase móvel afetam a separação dos analitos, pelo que diferentes solventes são usados para diferentes tipos de HPLC, dependendo do modo cromatográfico (fase normal ou invertida) desejado. Os reservatórios de solvente (fase móvel) mais comuns são tão simples como frascos de vidro com tubos a conectá-los à entrada da bomba. O injetor (gerador de amostras ou *autosampler*) serve para introduzir (injetar) a amostra no caudal contínuo de fase móvel que irá transportar a amostra pela coluna. A coluna contém o material de empacotamento cromatográfico (fase estacionária) necessário para efetuar a separação, sendo necessário um detetor para se conseguir ver as bandas dos compostos separados à medida que eluem na coluna e, para isso, o detetor está ligado a um computador que regista o sinal elétrico necessário para gerar o cromatograma no seu ecrã (como se pode ver na Figura 3.11), sendo posteriormente necessário um integrador (um software, normalmente) para identificar e quantificar a concentração dos constituintes da amostra. A fase móvel sai do detetor e pode ser enviada para um recipiente de recolha de resíduos ou recolhida para posterior recuperação e análise de analitos (cromatografia preparativa) (Kupiec, 2004; Arsenault & McDonald, 2014).

A coluna, ou fase estacionária, é considerada o coração de qualquer sistema cromatográfico, pois é nela que se dá a separação dos diferentes constituintes (analitos) de uma amostra. Esta está comercialmente disponível com diferentes comprimentos, diâmetros e materiais de empacotamento. As diferentes dimensões de coluna incluem colunas preparativas, de diâmetro normal, micro e mini e colunas capilares. Os materiais de empacotamento mais utilizados são à base de sílica, sendo o mais popular o octadecilsilano-sílica (ODS-sílica), que contém revestimento C18. A maior parte das técnicas de HPLC publicadas, utilizadas em ensaios com vitaminas lipossolúveis, utilizam partículas de sílica porosa ou derivados de sílica de 5 ou 10 μm em tubos (colunas) de aço inoxidável de comprimento típico de 250 mm e diâmetro interno padrão de 4,6 mm. Em geral, as colunas de cromatografia líquida são de bastante duração, com uma vida útil bastante longa, a não ser que sejam utilizadas de alguma forma intrinsecamente destrutiva como, por exemplo, com eluentes altamente ácidos ou básicos ou ainda injeções contínuas de amostras “sujas” (com triglicéridos, por exemplo). Em todo o caso, a degradação da coluna é inevitável, mas com a manutenção adequada a sua vida útil pode ser prolongada (Ball, 2000; Kupiec, 2004).

Tal como foi dito anteriormente, o tipo e a composição da fase móvel dependem do modo cromatográfico utilizado. Assim, se for utilizado um sistema de HPLC de fase normal (HPLC-NP), é utilizada uma fase estacionária polar (hidrofílica) em conjunto com uma fase móvel não polar, para que a separação seja feita com base na polaridade relativa dos solutos e na sua afinidade pela fase estacionária, ou seja, os solutos não-polares preferem a fase móvel e eluem primeiro e os solutos polares preferem a fase estacionária e eluem mais tarde. No modo de fase inversa (HPLC-RP), como o nome indica, utiliza-se o inverso da fase normal, ou seja, fase estacionária apolar e fase móvel polar, sendo que neste caso os solutos polares são eluídos antes dos solutos apolares. As fases móveis normalmente utilizadas em fase inversa são compostas por uma mistura de metanol ou acetonitrilo e água. O uso deste modo cromatográfico em ensaios com vitaminas lipossolúveis torna-se muito útil para remover triglicéridos da amostra, uma vez que os triglicéridos são insolúveis em água e moderadamente solúveis em metanol ou acetonitrilo (Ball, 2000).

Na determinação das quantidades vestigiais de vitamina D de ocorrência natural em alimentos, muitas vezes é impossível conseguir uma separação adequada para quantificação usando uma única coluna, devido aos triglicéridos que não conseguiram ser removidos na saponificação interferirem na HPLC analítica, sendo por isso considerado necessário, nesses casos, realizar a HPLC em dois sistemas, um primeiro

semi-preparativo e um segundo analítico. O primeiro sistema (HPLC semi-preparativo) foi projetado para isolar e recolher a fração do extrato de amostra que contém o analito e o padrão interno. Esta fração pode ser recolhida manualmente para subsequente reinjeção no segundo sistema (HPLC analítico), sendo designada por operação *offline*, ou desviada diretamente para a segunda coluna através de uma válvula (operação *online*), passando o sistema cromatográfico a ser designado por cromatografia bidimensional. Na operação *offline* a fração é recolhida num recipiente apropriado, o solvente é evaporado sob uma corrente de azoto, e o resíduo é posteriormente dissolvido em um pequeno volume de um solvente adequado para a separação analítica. Contrariamente, a operação *online* tem o potencial de ser completamente automatizada, tendo por isso um custo muito elevado. No entanto, este tipo de cromatografia encontra-se ainda em desenvolvimento (Ball, 2000).

O sistema de deteção é também de extrema importância. Têm sido utilizados três tipos de detetores de HPLC para medir as concentrações de vitaminas lipossolúveis em extratos de amostras de alimentos: absorvância, fluorescência e eletroquímicos.

Todas as vitaminas lipossolúveis exibem alguma forma de atividade eletroquímica, no entanto, a monitorização da absorção da radiação do efluente da coluna a um comprimento de onda apropriado fornece os meios de deteção mais versáteis para as vitaminas lipossolúveis, uma vez que as vitaminas A, D e E apresentam espectros de absorção característicos na região UV. A medição da absorvância em HPLC é feita geralmente por um PAD que monitoriza a absorvância em vários comprimentos de onda simultaneamente. A deteção por fluorescência é mais seletiva do que a deteção por absorvância pelo facto de na medição serem necessários dois comprimentos de onda (excitação e emissão) e pelas características estruturais das moléculas necessárias para uma molécula ser fluorescente serem mais limitadas. No entanto, este tipo de detetor apenas consegue detetar as vitaminas A e E, pois somente o retinol e os seus ésteres, os tocoferóis não esterificados e os tocotrienóis possuem fluorescência natural (Ball, 2000).

Ainda neste âmbito, as chamadas técnicas de hifenização desenvolvidas recentemente têm melhorado a capacidade de separar e identificar entidades múltiplas dentro de uma mistura. Estas técnicas incluem cromatografia líquida–espectrometria de massa (LC–MS), cromatografia líquida–espectroscopia infravermelha (LC–IR) e cromatografia líquida–ressonância magnética nuclear (LC–NMR). Estas técnicas geralmente envolvem a separação cromatográfica seguida de identificação de pico com um detetor tradicional como o UV, combinado com a identificação adicional do composto

com MS, IR ou NMR. Pelo facto de a MS ter elevada seletividade e sensibilidade, as técnicas LC-MS ou LC-MS/MS são as mais utilizadas (Kupiec, 2004; Aqel et al., 2014).

Nos últimos anos, para além das melhorias efetuadas a nível dos sistemas de deteção, para melhor detetar e identificar analitos, têm sido também efetuadas melhorias nas colunas e nos restantes instrumentos que constituem os sistemas de cromatografia líquida, para melhor separar os diferentes analitos. Em 2004, começaram a ser desenvolvidas colunas com partículas menores (1,7 μm) e a instrumentação passou a ter capacidades especializadas projetadas para fornecer uma fase móvel até 15 000 psi (1000 bar). Estes avanços na tecnologia de instrumentação e coluna alcançaram aumentos significativos na resolução, velocidade e sensibilidade da cromatografia líquida e a tecnologia passou a ser conhecida como UHPLC, Cromatografia Líquida de Ultra Resolução (Balogh, 2009).

A chegada da UHPLC aos laboratórios permitiu a melhoria da qualidade e da produtividade das análises, com maior sensibilidade, melhor seletividade, alto rendimento e simplificação da preparação das amostras. Aliado à espectrometria de massa, a UHPLC pode também ser uma solução, com uma redução do tempo de execução e uma melhor resolução, em comparação com os sistemas clássicos de HPLC. Pela sua elevada resolução e sensibilidade, a UHPLC é particularmente atraente na área de análise de alimentos onde as matrizes das amostras são muito complexas. No entanto, a pesquisa neste campo ainda é limitada, sendo necessários ainda muitos esforços e tempo para fornecer mais informações e melhorar os métodos existentes (McCabe, 2014; Aqel et al., 2014). Porém, a nível das vitaminas lipossolúveis, Stevens e Dowell (2012) reportaram um método para a determinação da vitamina D (D_2 e D_3), por UHPLC-MS/MS, em diferentes amostras de alimentos, incluindo, entre outros, pão, cogumelos, ovos, iogurte, queijo, peixe e manteiga, leite (fórmula infantil *Ready-To-Feed*) e mistura de vitaminas. Outro estudo por UHPLC foi desenvolvido por Chauveau-Duriot et al. (2010) em que determinaram as vitaminas A e E em leite.

Um vislumbre do que podemos esperar no futuro e que já está em estudo nos dias de hoje será o desenvolvimento de colunas com partículas de tamanho inferior a 1 μm e sistemas capazes de trabalhar a 100 000 psi (6800 bar) (Arsenault & McDonald, 2014).

Outro tipo de cromatografia que pode ser utilizado na determinação de vitaminas lipossolúveis é a Cromatografia Supercrítica (SFC), desenvolvida para expandir a capacidade da Cromatografia Gasosa (GC), que utiliza solventes em condições supercríticas. Inicialmente, nos instrumentos mais antigos não era possível manipular um solvente compressível como o CO_2 de forma confiável e repetida, pelo menos a par

com os instrumentos modernos de HPLC ou UHPLC e por isso este instrumento de análise não teve grande aplicação. No entanto, em 2012, a SFC conseguiu tornar-se numa opção para estudos analíticos, passando a ser designada por Cromatografia de Convergência de Ultra Resolução (UPCC), que se trata de uma tecnologia que converge as tecnologias cromatográficas GC e LC num único sistema (Waters Corporation, 2014).

A UPCC, utiliza colunas iguais às da UHPLC, mais pequenas e com partículas de tamanho inferior a 2 μm , pressões entre 100 a 400 vezes superiores à pressão atmosférica e CO_2 comprimido como o principal solvente da fase móvel, juntamente com co-solventes orgânicos (metanol, por exemplo) e aditivos para alcançar um incomparável poder de resolução e seletividade na separação por cromatografia. Ao utilizar o CO_2 como fase móvel primária, a UPCC reduz significativamente a quantidade de resíduos de solventes orgânicos utilizados em laboratórios, bem como o descarte de solventes residuais, apoiando as iniciativas verdes. A miscibilidade do CO_2 com uma variedade de solventes orgânicos polares e apolares torna a UPCC suficientemente versátil para separar uma gama muito mais ampla de compostos, podendo ser também aplicada às vitaminas lipossolúveis (Waters Corporation, 2014).

Com a UPCC, devido à compatibilidade da técnica com os solventes orgânicos apolares utilizados no início do processo de extração, o procedimento de preparação da amostra para analisar as vitaminas lipossolúveis fica muito mais simples, pois deixa de ser necessário evaporar e reconstituir a amostra, injetando-se as amostras diretamente da extração, tornando o tempo de execução vinte vezes inferior aos métodos de análise tradicionais. Além disso, com a UPCC, as vitaminas A (*cis* e *trans*), D (D_2 e D_3) e E conseguem ser separadas numa única injeção em menos de 10 minutos, ao contrário dos métodos tradicionais em que a vitamina D tem de ser analisada em dois passos cromatográficos, usando para isso colunas e fases móveis diferentes (Waters Corporation, 2014). Um estudo que comprova estes factos foi o realizado por Gu et al. (2014) onde, embora utilizem uma matriz mais simples, mistura de vitaminas, conseguem, numa só injeção, analisar em simultâneo as vitaminas A (*cis* e *trans*) e D (D_2 e D_3), com um detetor PDA.

3.6 VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO

A validação de métodos analíticos é uma ferramenta fundamental para a garantia da qualidade dos resultados obtidos, pois permite demonstrar que o método de ensaio atende ao propósito descrito e que a sua aplicação produz resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2011; Costa-Félix, et al., 2017).

De acordo com a norma ISO/IEC 17025 – Requerimentos gerais de competência para Laboratórios de Ensaio e Calibração, a validação de um método analítico consiste na “comprovação, através de evidências objetivas, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido”. Esta definição contempla todos os aspectos que devem orientar o processo de validação de um método analítico.

O processo de validação de um método deve estar descrito num procedimento e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos que se encontrem dentro das especificações, a funcionar corretamente e adequadamente calibrados ou ensaiados. Da mesma forma, é de extrema importância que o responsável pela realização dos estudos seja competente no método a ser validado, esteja treinado no referido método e seja capaz de tomar decisões apropriadas durante a realização do mesmo (INMETRO, 2011; Costa-Félix et al., 2017).

Sempre que um laboratório pratica métodos internos de ensaio, o mesmo terá de instruir um processo de validação desses métodos que inclua todos os registos obtidos, devendo ser revalidados somente no caso em que parte deles tenha sido alterada (RELACRE, 2000; Costa-Félix et al., 2017).

A validação dos métodos internos (que não segue uma norma de ensaio, nacional ou internacional) deve ser adaptada a cada caso, sendo necessário realizar alguns estudos de validação antes de colocar o método em rotina, durante a sua implementação ou sempre que ocorra uma alteração relevante do mesmo. Os requisitos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa (qualitativo ou quantitativo) e compreendem o estudo e conhecimento de diversos parâmetros, avaliados direta ou indiretamente. A avaliação indireta estuda parâmetros como especificidade/seletividade, quantificação, precisão e robustez e a avaliação direta visa essencialmente conhecer a exatidão dos métodos de ensaio (RELACRE, 2000).

3.6.1 AVALIAÇÃO INDIRETA

3.6.1.1 ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE

Um método é considerado específico quando produz uma resposta para um único analito, o analito de interesse, e é considerado seletivo quando gera resposta para mais do que um analito num determinado grupo de substâncias químicas (matriz complexa), podendo ou não ser distinguíveis, mas é possível separar e identificar o analito de interesse. Na prática, poucos métodos respondem a apenas um analito, fazendo com que o termo seletividade seja o mais apropriado (Lanças, 2004; Costa-Félix et al., 2017).

Para averiguar o efeito de possíveis interferentes poder-se-á realizar um teste de recuperação usando uma série de amostras com a mesma matriz, variando-se apenas a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho, sendo conveniente que as amostras sejam analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade (RELACRE, 2000).

Um método analítico é considerado específico e seletivo quando se confirmam percentagens de recuperação próximas de 100% (RELACRE, 2000).

3.6.1.2 QUANTIFICAÇÃO

3.6.1.2.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

A quantificação, num método analítico, requer o conhecimento sobre a dependência entre a resposta do sistema de medição e a concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Para tal, é necessário estudar a gama de trabalho e a linearidade do método analítico (RELACRE, 2000).

► Linearidade

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico, conforme a norma recomendada (ISO 8466-1) ou recorrendo a gráficos de calibração, denominados por “curvas de calibração”, apesar de a grande maioria não ter a forma de curva (RELACRE, 2000; Lanças, 2004).

De um modo geral, para construir a curva analítica são necessários vários níveis de concentração (5, no mínimo). O número de duplicados em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível do que é empregue na rotina do laboratório. Os gráficos de calibração devem ser apresentados juntamente com um tratamento estatístico adequado, o qual deve envolver, no mínimo, a equação da função (uma reta,

normalmente), a análise da regressão e os dados de correlação e/ou determinação (Lanças, 2004; INMETRO, 2011).

A equação da reta, neste caso, terá a forma:

$$y = a + bx \quad (3.2)$$

em que,

y – sinal instrumental (absorvância, área ou altura do pico);

a – ordenada na origem (interseção com o eixo vertical y);

b – declive da reta;

x – concentração dos padrões utilizados.

A regressão que normalmente se utiliza para análise é a dos mínimos quadrados. Neste caso, o eixo vertical, y , representa sempre a resposta instrumental do equipamento e, o eixo horizontal, x , representa sempre as concentrações dos padrões, isto porque se assume que os erros associados aos valores de x são desprezáveis face aos valores de y . Estas curvas devem, desejavelmente, ser efetuadas em cada dia de análise, cumprindo critérios de aceitação definidos internamente (RELACRE, 2000; Lanças, 2004).

A correlação é, normalmente, calculada por meio do coeficiente r de Pearson. Em análise química, dependendo dos critérios internos do laboratório e do próprio método analítico, as curvas de calibração para serem aceites devem ter valores de coeficientes de correlação superiores ou iguais a 0,995 (RELACRE, 2000).

► Gama de trabalho

Em qualquer método quantitativo existe um intervalo de concentrações no qual o analito em estudo pode ser determinado com boa linearidade, precisão e exatidão. A este intervalo dá-se o nome de gama de trabalho (INMETRO, 2011).

Quando é utilizado um método que envolve a representação gráfica de uma curva de calibração, o teste de homogeneidade de variâncias permite avaliar a gama de trabalho. Nos métodos em que tal não acontece, a gama de trabalho deve ser definida previamente e pode ser função de alguns fatores como, por exemplo, a quantidade de amostra disponível ou a boa visualização dos pontos de viragem e volumes gastos em volumetrias (RELACRE, 2000).

Para modelos lineares é recomendada a utilização da norma ISO 8466-1 e para modelos polinomiais de 2º grau a norma ISO 8466-2. A avaliação da gama de trabalho

para métodos que utilizem modelos de calibração lineares é a mais frequente. Segundo a norma referida para estes últimos modelos são analisados dez pontos de calibração, distribuídos de forma equitativa ao longo de toda a gama de trabalho, sendo o primeiro e o último padrão analisados em 10 réplicas independentes (RELACRE, 2000).

3.6.1.2.2 LIMIARES ANALÍTICOS DO MÉTODO DE ENSAIO

Os limiares analíticos são de dois tipos:

► **Limite de deteção (LD)**

O LD corresponde à menor quantidade (teor) de um analito que pode ser detetada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato (Lanças, 2004).

Quando são realizadas medições em amostras com baixos teores de analito é importante estabelecer a capacidade do método em diferenciar a deteção de analito do sinal do branco/ruído, isto é, a capacidade do método de identificar, de forma confiável, a presença do analito em uma determinada amostra (INMETRO, 2011; Costa-Félix et al., 2017).

Quando se obtém uma leitura inferior ao limite de deteção apenas se pode afirmar que a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor, não significando a ausência do analito a medir (RELACRE, 2000).

► **Limite de quantificação (LQ)**

Ao contrário do limite de deteção, no LQ não existe a dúvida sobre a presença do analito (Costa-Félix et al., 2017), pois o LQ corresponde ao teor mínimo de um analito que pode ser quantificado com uma determinada exatidão e precisão. Geralmente, na prática, corresponde ao padrão de calibração de menor concentração e, por isso, o LQ não deve apresentar uma concentração superior à do primeiro ponto da curva analítica de um método, uma vez que só é possível quantificar de forma confiável a partir dessa concentração (RELACRE, 2000; Lanças, 2004; Costa-Félix et al., 2017).

3.6.1.2.3 SENSIBILIDADE

A sensibilidade de um método indica a capacidade que o método tem para discriminar, com uma precisão estabelecida, pequenas diferenças de concentração de um analito (RELACRE, 2000; Lanças, 2004).

Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa reta de calibração. Neste caso, quanto maior for o ângulo de inclinação da reta (declive), mais sensível será o método (RELACRE, 2000; Lanças, 2004).

3.6.1.3 PRECISÃO

A precisão avalia a dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas (RELACRE, 2000).

Os materiais analisados devem ser semelhantes às amostras normalmente analisadas pelo método, em rotina. Deste modo, é recomendado que a precisão seja avaliada através da análise de materiais de referência (MR), materiais de referência certificados (MRC) ou, caso existam, amostras reais que possuam a matriz da amostra normalmente analisada pelo método. Porém, as amostras devem ser homogêneas, garantindo que todas as porções da mesma amostra se comportem de forma semelhante (Lanças, 2004).

A dispersão é avaliada através de duas medidas extremas designadas por repetibilidade e reprodutibilidade e, através de uma situação intermédia, designada por precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial. A repetibilidade expressa a precisão obtida sob condições operacionais idênticas (mesmo método, mesma amostra, mesmo laboratório, mesmo operador, mesmo equipamento) aplicadas num curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade expressa a precisão obtida segundo condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, variando as condições de medição (em diferentes laboratórios, por diferentes operadores, utilizando diferentes equipamentos e/ou em épocas diferentes). A precisão intermédia refere-se às variações que ocorreram dentro de um mesmo laboratório quando um ou mais fatores importantes são alterados. Os fatores típicos neste caso são a mudança de dia e/ou analista, e/ou equipamento, entre outras (RELACRE, 2000; Lanças, 2004).

Geralmente, a precisão é expressa sob a forma de desvio padrão, s , ou pelo coeficiente de variação, CV (RELACRE, 2000; Lanças, 2004).

Para o caso da repetibilidade, o coeficiente de variação, CV_r , expresso em percentagem, é calculado através da equação 3.3 (Relacre, 2000).

$$CVr = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.3)$$

Sendo,

S_{ri} – desvio padrão dos valores de concentração das tomas analisadas em condições de repetibilidade;

\bar{x} – média dos valores de concentração obtidos.

A estimativa da variação (S_r^2) de um método de análise é determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w séries de análises estudadas nas mesmas condições. Uma vez que a repetibilidade pode variar com o teor do analito a analisar, em princípio esta última condição assegura a igualdade estatística das variações de w séries de análises. Portanto, a variância associada à repetibilidade do método de ensaio, para cada nível i de concentração é calculada através da equação 3.4 (Relacre, 2000).

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1)S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)} \quad (3.4)$$

Sendo,

S_{ri}^2 – variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

S_{wi}^2 – variância associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

$(n_{wi} - 1)$ – grau de liberdade da série de análises;

p – número de laboratórios participantes.

No caso da precisão intermédia, o coeficiente de variação, CV_{Pi} , expresso em percentagem, é dado pela equação 3.5 (Relacre, 2000).

$$CV_{Pi} = \frac{S_{Pi}}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.5)$$

Sendo,

S_{Pi} – desvio padrão da precisão intermédia;

\bar{x} – média das concentrações do número de ensaios realizados.

A estimativa da precisão intermédia é determinada através da equação 3.6 (Relacre, 2000).

$$S_{pi} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (3.6)$$

Onde,

n – número de amostras;

y_k – valor individual obtido;

\bar{y} – média dos valores obtidos.

3.6.1.4 ROBUSTEZ

A robustez de um método corresponde à capacidade que o método tem para não sofrer alterações, ou seja, para manter o desempenho analítico inalterável, ou praticamente insensível, perante pequenas variações que possam ocorrer durante a execução do método, produzindo os mesmos resultados (RELACRE, 2000; Lanças, 2004).

Este parâmetro pode ser determinado segundo o teste de YOUNDEN, que avalia não só a robustez do método como também permite seriar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência (por excesso ou por defeito) de cada uma dessas variações (RELACRE, 2000).

3.6.2 AVALIAÇÃO DIRETA

A avaliação direta pretende conhecer a exatidão dos métodos de ensaio, ou seja, analisar a concordância entre o resultado obtido pelo método de análise e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro (RELACRE, 2000).

A precisão e a exatidão são conceitos muitas vezes confundidos. A precisão mede a capacidade do método de repetir (em condições experimentais muito próximas) ou reproduzir (em condições experimentais menos próximas) um resultado analítico, enquanto a exatidão mede o desvio do valor obtido em relação ao valor assumido como real. É impossível obter uma boa exatidão se a precisão não for boa, assim como uma boa precisão não garante uma boa exatidão (Lanças, 2004).

A exatidão de uma metodologia é normalmente avaliada recorrendo a MRCs, ensaios interlaboratoriais, testes comparativos, entre outros.

3.6.2.1 MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS (MRC)

Sempre que possível, os MRC devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio, não só por constituírem uma excelente ferramenta no controlo externo da qualidade de uma análise química, mas também pelo facto de o valor esperado para a concentração já estar definido (ou ser conhecido) (RELACRE, 2000; Lanças, 2004).

De acordo com o Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025 (OGC001:IPAC:2010), os MRC são “preparados por entidades reconhecidas, sendo atribuídos valores certificados e respetivas incertezas aos parâmetros”, possuindo um valor de concentração (ou outra grandeza) para cada parâmetro e uma incerteza associada. Desta forma, a aquisição de um MRC deve ser feita a um organismo fornecedor reconhecido e credível como, por exemplo, o NIST – *National Institute of Standards and Technology*, dos Estados Unidos da América, e o FAPAS - *Food Analysis Performance Assessment Scheme*, do Reino Unido (RELACRE, 2000).

A correta utilização dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. Na avaliação da exatidão, utilizando um MRC, os valores obtidos pelo laboratório devem ser comparados com os valores certificados do material de referência. Para esta comparação pode recorrer-se a diversos critérios de decisão, entre os quais:

- ▶ Erro relativo;
- ▶ Fator de desempenho Z (“Z-score”);
- ▶ Erro normalizado.

Quando o valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las (RELACRE, 2000; INMETRO; 2011).

O cálculo do fator de desempenho Z é feito de acordo com a seguinte expressão:

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (3.7)$$

Sendo:

X_{lab} – valor obtido pelo Laboratório

X_v – valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor certificado do MRC

S – unidade de desvio, que pode ser a incerteza do MRC ou ainda outra unidade de desvio interna

De acordo com o Anexo B da norma ISO/IEC 17043 a avaliação deste fator pode ser feita de acordo com os seguintes critérios:

- ▶ $|Z| \leq 2,0$ – indica um desempenho “satisfatório” e não gera nenhum sinal;
- ▶ $2,0 < |Z| \leq 3,0$ – indica um desempenho “questionável” e gera um sinal de atenção;
- ▶ $|Z| > 3,0$ – indica um desempenho “incorreto” e gera um sinal de ação.

4

MATERIAIS E MÉTODOS

Atualmente, no Laboratório de Química do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA, é utilizado um método de HPLC em fase normal, com detetor de fluorescência, para a determinação simultânea de vitamina A (*all-trans*-retinol e 13-*cis*-retinol) e de vitamina E (dl- α -tocoferol), presentes em géneros alimentícios. Este método baseia-se nas normas EN 12822 e 12823-1 e está acreditado pelo IPAC (Instituto Português de Acreditação) pela norma 17025. Para além deste método, o laboratório utiliza um método para a determinação de vitamina D em produtos alimentares por HPLC, de acordo com a norma EN 12821, também acreditado pelo mesmo Instituto e norma.

Com este trabalho, contribuiu-se para a otimização dos passos de saponificação e extração e das condições cromatográficas utilizadas no método de HPLC para a determinação simultânea das vitaminas A e E, de forma a conseguir determinar-se não só as vitaminas A e E mas também a vitamina D. O método otimizado foi aplicado a algumas amostras recolhidas no âmbito do projeto *TDS Exposure*.

Nos subcapítulos seguintes descreve-se o procedimento utilizado na análise das amostras do projeto *TDS Exposure*, bem como os estudos prévios que deram origem ao procedimento otimizado.

4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A forma de proceder na determinação tanto das vitaminas A e E como da vitamina D envolve várias etapas fundamentais: saponificação das amostras, extração líquido-líquido para extrair os analitos das amostras, evaporação dos extratos, diluição (reconstituição) dos resíduos de insaponificável e separação através de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC). A identificação e quantificação das vitaminas é efetuada através do software “Empower” do equipamento de cromatografia “Waters” utilizado na análise, recorrendo-se a calibração externa no caso das vitaminas A e E e a calibração interna no caso da vitamina D. Para realizar este processo é necessário preparar previamente as amostras a analisar, algumas soluções padrão, reagentes, materiais e equipamentos a serem utilizadas durante a execução da determinação analítica.

Nos subcapítulos seguintes descreve-se o procedimento experimental final (após os estudos de otimização) para o método da determinação simultânea das vitaminas A, E e D (determinação das vitaminas A e E e parte semi-preparativa da determinação da vitamina D).

O modo de proceder da determinação da vitamina D atualmente acreditado no laboratório do DAN não foi o seguido neste trabalho, mas como para chegar ao procedimento experimental final deste trabalho se recorreu ao procedimento experimental de determinação da vitamina D em determinadas etapas, este método encontra-se descrito no Anexo 1. O modo de proceder do método de determinação da vitamina D tem algumas diferenças em comparação com o método de determinação das vitaminas A e E, nomeadamente o tipo de solvente, o tempo de saponificação e o método de calibração utilizado.

4.1.1 MATERIAL

O material necessário para a realização deste trabalho foi o seguinte:

- ▶ Ampolas de decantação (500 e 1000 mL);
- ▶ Balões volumétricos, com certificado de lote (5, 10, 20, 50, 100 e 1000 mL);
- ▶ Balões de evaporador rotativo, em forma de pera (50 e 250 mL);
- ▶ Células de quartzo de 1 cm;
- ▶ Criotubos (2 e 5 mL);
- ▶ Erlenmeyers, de boca esmerilada (250 mL);
- ▶ Espátulas para pesagem;
- ▶ Filtros de papel (185 mm de diâmetro);
- ▶ Filtros de PVDF (0,45 μm);
- ▶ Frasquinhos de vidro para injetor automático (*vials*);
- ▶ Frascos de vidro, pequenos;
- ▶ Frascos de vidro, para as fases móveis e para a solução de solventes de extração (1 e 2,5 L);
- ▶ Funis;
- ▶ Pipetas graduadas, com certificado de lote (1, 2, 5, 10, 20, 25 e 50 mL);
- ▶ Pipetas de Pasteur;
- ▶ Pompe;e;
- ▶ Provetas (100 e 2000 mL);
- ▶ Seringas com capacidade de 10 mL.

4.1.2 EQUIPAMENTO

O equipamento necessário para a realização deste trabalho foi o seguinte:

- ▶ Balança analítica com precisão de 0,0001 g, marca Mettler Toledo, modelo XP 205;
- ▶ Banho de água, com regulador de temperatura e equipado com sistema de condensação, marca Trade Raypa;
- ▶ Câmara fria a uma temperatura de 5 ± 3 °C;
- ▶ Coluna de HPLC de fase inversa Kromasil 100 C18, de 25 cm de comprimento por 4 mm de diâmetro e com partículas de 5 μ m, marca Teknokroma;
- ▶ Coluna de HPLC de fase normal LiChrosorb Si60, de 25 cm de comprimento por 4 mm de diâmetro e com partículas de 5 μ m, marca Merck;
- ▶ Congelador a uma temperatura $\leq - 20$ °C, marca Sanyo;
- ▶ Espectrofotômetro UV-Vis de comprimento de onda variável, marca Thermo Scientific, modelo Evolution 300 LC;
- ▶ Evaporador rotativo de rotação variável (entre 0 e 10 rotações por minuto), marca Büchi, modelo R-210, com controlador de vácuo (V-850) de pressão regulável, banho de água aquecido (B-491) de temperatura regulável, bomba de vácuo (V-700), com ligação a azoto e equipado com um circulador de refrigeração compacto, marca Huber, modelo minichiller;
- ▶ Frigorífico a uma temperatura de 5 ± 3 °C, marca Miele;
- ▶ Sistema de HPLC, marca Waters, modelo 2695, equipado com um detetor de fluorescência, marca Waters, modelo 2475, e um detetor de rede de fotodíodos (PAD), marca Waters, modelo 2996;
- ▶ Sistema de HPLC, marca Waters, modelo 2695, equipado com um detetor de rede de fotodíodos (PAD), marca Waters, modelo 2996;
- ▶ Sistema de ultrapurificação de água, marca Millipore, modelo Milli-Q;
- ▶ Ultracongelador a temperatura $\leq - 70$ °C, marca Thermo Scientific, modelo Revco.



Figura 4.1 Em cima, à esquerda, banho de água fervente equipado com sistema de condensação e à direita evaporador rotativo; em baixo, sistema de HPLC

1 – detetor de fluorescência; 2 – detetor UV/Vis de rede de fotodiodos (PAD); 3 – reservatório de fase móvel (à esq., em cima); 4 – forno da coluna e respetiva coluna (à dir.), 5 – sistema de arrefecimento de amostras, injetor automático e respetivo “carrossel” (à esq., em baixo); 6 – bomba; 7 – sistema de aquisição de dados

4.1.3 REAGENTES E PADRÕES

Os reagentes utilizados foram os seguintes:

- ▶ Ácido ascórbico, $C_6H_8O_6$, p.a., pureza $\geq 99,0\%$, CAS 50-81-7, VWR Prolabo;
- ▶ Água desionizada, pelo menos de grau 2 (de acordo com a norma EN ISO 3696), obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore);
- ▶ BHT (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol), $C_{15}H_{24}O$, puro, pureza $\geq 99,0\%$, CAS 128-37-0, Panreac;
- ▶ Etanol, C_2H_5OH , p.a., pureza $\geq 99,9\%$, CAS 64-17-5, Sigma-Aldrich;
- ▶ Éter etílico, $C_4H_{10}O$, p.a., pureza $\geq 99,7\%$, CAS 60-29-7, Sigma-Aldrich;
- ▶ Éter de petróleo, p.a., ponto de ebulição 40-60°, CAS 64742-49-0, VWR Prolabo;
- ▶ Fenolftaleína, $C_{20}H_{14}O_4$, indicador ACS, pureza 98% - 102%, CAS 77-09-8, Merck;

- ▶ Hidróxido de potássio, KOH, lentilhas p.a., pureza $\geq 85,0\%$, CAS 1310-58-3, Merck;
- ▶ n-Heptano, C_7H_{16} , para HPLC, pureza $> 99,0\%$, CAS 142-82-5, VWR Prolabo;
- ▶ Metanol, CH_3OH , p.a., pureza $\geq 99,8\%$, CAS 67-56-1, J. T. Baker;
- ▶ Metanol, CH_3OH , para HPLC, pureza $\geq 99,9\%$, CAS 67-56-1, Prolabo VWR;
- ▶ 2-Propanol, C_3H_8O , para HPLC, pureza $\geq 99,8\%$, CAS 67-60-0, Sigma-Aldrich;
- ▶ Sulfato de sódio anidro, Na_2SO_4 , p.a., pureza $\geq 99,0\%$, CAS 7757-82-6, Merck.

As substâncias puras utilizadas na preparação das soluções dos padrões foram as seguintes:

- ▶ Vitamina A (all-*trans*-retinol), $C_{20}H_{30}O$, sintético (HPLC), pureza $\geq 95\%$, CAS 9568-26-8, Sigma;
- ▶ Vitamina A (13-*cis*-retinol), $C_{20}H_{30}O$, sintético (HPLC), pureza $\geq 90\%$, CAS 2052-63-3, Sigma;
- ▶ Vitamina D₂ (ergocalciferol), $C_{28}H_{44}O$, pureza $> 98\%$, CAS 50-14-06, Sigma;
- ▶ Vitamina D₃ (colecalciferol), $C_{27}H_{44}O$, pureza $> 98\%$, CAS 67-97-0, Sigma;
- ▶ Vitamina E (dl- α -tocoferol), $C_{29}H_{50}O_2$, sintético (HPLC), pureza $\sim 95,0\%$, CAS 10191-41-0, Sigma.

4.1.4 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

4.1.4.1 SOLUÇÕES DE TRABALHO

▶ Solução de hidróxido de potássio, a 60%

Pesaram-se 600 g de hidróxido de potássio e, pelo facto de a reação ser exotérmica, colocou-se inicialmente um pouco de água desionizada num balão volumétrico de 1000 mL e de seguida, aos poucos, adicionou-se o soluto, colocando-se o balão volumétrico num recipiente com gelo. Após todo o hidróxido de potássio estar dissolvido, perpez-se o balão com água e colocou-se a solução num recipiente apropriado e devidamente identificado.

► **Solução alcoólica de fenolftaleína**

Num balão de 100 mL, dissolveu-se 1 g de fenolftaleína em etanol e completou-se o restante volume com o mesmo solvente. Uma vez realizada a dissolução, colocou-se num recipiente apropriado e devidamente identificado.

► **Solução de extração**

De forma a obter-se a proporção final de 2 para 8 (v:v), adicionaram-se, numa proveta de 2000 mL, 400 mL de éter etílico e 1600 mL de éter de petróleo. Depois de adicionados os dois solventes, colocou-se a mistura num frasco de vidro de 2,5 L devidamente identificado. Esta mistura foi preparada na câmara de segurança química (hotte) devido à elevada volatilidade de ambos os solventes.

4.1.4.2 SOLUÇÕES PADRÃO

As soluções padrão que se seguem são estáveis quando guardadas no ultracongelador durante 30 dias, tendo sido preparadas no dia anterior ao da realização do procedimento de doseamento das vitaminas e utilizadas na preparação da reta de calibração. As soluções mãe já tinham sido previamente preparadas e as soluções intermédias e de leitura foram feitas no dia da preparação da reta de calibração.

► **Soluções mãe**

Vitamina A (all-*trans*-retinol)

A solução mãe de all-*trans*-retinol encontra-se distribuída em criotubos de 5 mL, com $\pm 2,5$ mL cada, devidamente etiquetados e armazenados no ultracongelador. A sua preparação consiste na dissolução de uma ampola de all-*trans*-retinol (25 mg) em etanol, num balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se 0,1% de BHT e completando-se o volume com etanol.

Vitamina A (13-*cis*-retinol)

A solução mãe de 13-*cis*-retinol, está distribuída em criotubos de 2 mL, com $\pm 1,5$ mL cada, devidamente etiquetados e armazenados no congelador. A sua preparação consiste na dissolução de uma ampola de 13-*cis*-retinol (100 mg) em etanol, com 0,1% de BHT, num balão volumétrico de 100 mL.

Vitamina D₂ (ergocalciferol)

Numa balança analítica, pesou-se aproximadamente 100 mg de padrão de vitamina D₂ até ao miligrama e, num balão volumétrico de vidro de 100 mL, dissolveu-se em etanol absoluto, completando-se o volume até à marca com etanol. A solução mãe, contendo aproximadamente 1 mg/mL de vitamina D₂, foi armazenada na câmara fria devidamente etiquetada e protegida da luz.

Vitamina D₃ (colecalfiferol)

Numa balança analítica, pesou-se aproximadamente 100 mg de padrão de vitamina D₃ até ao miligrama e, num balão volumétrico de vidro de 100 mL, dissolveu-se em etanol absoluto, completando-se o volume até à marca com etanol. A solução mãe, contendo aproximadamente 1 mg/mL de vitamina D₃, foi armazenada na câmara fria devidamente etiquetada e protegida da luz.

Vitamina E (dl- α -tocoferol)

A solução mãe de dl- α -tocoferol, encontra-se guardada no ultracongelador, protegida da luz, num frasco apropriado e devidamente identificado. A sua preparação consiste na dissolução de cerca de 10 mg de dl- α -tocoferol em metanol, num balão volumétrico de 100 mL.

► **Soluções intermédias**

A preparação de uma solução intermédia só é necessária para o 13-*cis*-retinol. Para a preparar pipetou-se 1 mL da solução mãe de 13-*cis*-retinol num balão volumétrico de 20 mL e fez-se o volume com etanol.

► **Soluções de leitura**

Vitamina A (All-*trans*-retinol)

Para a preparação da solução de leitura de all-*trans*-retinol utilizou-se um balão volumétrico de 50 mL, onde se diluiu 0,7 mL da solução mãe de all-*trans*-retinol em etanol.

Vitamina A (13-*cis*-retinol)

Para preparar a solução de leitura de 13-*cis*-retinol pipetaram-se 2 mL da solução intermédia para um balão volumétrico de 50 mL e fez-se o volume com metanol.

Vitamina E (dl- α -tocoferol)

Para preparar a solução de leitura de dl- α -tocoferol pipetaram-se 25 mL da solução mãe num balão volumétrico de 50 mL cujo volume foi feito com metanol.

De forma a quantificar o teor dos analitos destas três soluções, mediram-se as absorvâncias ($DOA_{(analito)}$), numa célula de quartzo de 1 cm, no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 325 nm, 328 nm e 292 nm, para o all-*trans*-retinol, 13-*cis*-retinol e dl- α -tocoferol, respetivamente, utilizando-se como branco etanol no caso do all-*trans*-retinol ou metanol no caso do 13-*cis*-retinol e do dl- α -tocoferol. A partir da leitura obtida, calculou-se a concentração dos padrões de cada analito ($CA_{(analito)}$), em g/100 mL, através da seguinte equação:

$$CA_{(analito)} = \frac{DOA_{(analito)}}{E_{1\text{ cm}}^{1\%}} \quad (4.1)$$

onde $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ se trata do valor do coeficiente de absorção específica que, para o all-*trans*-retinol em solução etanólica a 325 nm tem o valor de 1830, para o 13-*cis*-retinol em solução metanólica a 328 nm tem o valor de 1686 e para o dl- α -tocoferol em solução metanólica a 292 nm tem o valor de 76.

► Soluções padrão de ensaio

A determinação das vitaminas A e E é feita por calibração externa, ou seja, recorrendo a uma reta de calibração. A reta de calibração utilizada neste trabalho é compreendida por 6 níveis de calibração e para a sua construção foram preparadas seis soluções padrão de trabalho, sendo cada uma delas constituída pela mistura de três soluções de calibração correspondentes a cada uma das vitaminas, isto é, all-*trans*-retinol, 13-*cis*-retinol e dl- α -tocoferol.

A preparação das três soluções de calibração foi feita da seguinte forma:

Vitamina A (all-*trans*-retinol) – Solução de calibração

Pipetou-se 1 mL da solução mãe de all-*trans*-retinol num balão volumétrico de 10 mL e perpez-se o seu volume com n-heptano.

Vitamina A (13-*cis*-retinol) – Solução de calibração

Pipetou-se 2,5 mL da solução intermédia de 13-*cis*-retinol num balão volumétrico de 10 mL e perpez-se o seu volume com n-heptano.

Vitamina E (dl- α -tocoferol) – Solução de calibração

Retiraram-se 20 mL da solução de leitura de dl- α -tocoferol para um balão de evaporador rotativo, em forma de pera, de 50 mL e colocou-se a evaporar no evaporador rotativo a uma temperatura máxima de 40 °C. Após evaporação reconstituiu-se com 20 mL de n-heptano.

Para cada solução padrão de trabalho foi utilizado um balão volumétrico de 10 mL e as diluições, feitas a partir de cada solução de calibração, realizaram-se de acordo com a Tabela 4.1. No final, o volume de cada balão volumétrico foi completado com n-heptano, o solvente utilizado na fase móvel.

Tabela 4.1 Volumes a adicionar a cada solução padrão de trabalho

Nível / Sol. Padrão	1	2	3	4	5	6
Sol. calibração all- <i>trans</i> -retinol (mL)	0,6	0,9	1,2	1,5	1,9	2,1
Sol. calibração 13- <i>cis</i> -retinol (mL)	0,4	0,7	1,0	1,3	1,5	1,7
Sol. calibração dl- α -tocoferol (mL)	0,6	0,9	1,3	1,7	2,0	2,2

O cálculo das concentrações de cada padrão é efetuado através da folha de cálculo DAN URQ-IM36 (apresentada no Anexo 2).

A determinação da vitamina D é feita por adição de padrão interno e por isso realizaram-se duas soluções padrão de ensaio:

Vitamina D₂ (ergocalciferol)

Pipetou-se 1 mL de solução mãe de vitamina D₂ num balão volumétrico de 100 mL e diluiu-se com etanol até à marca.

Vitamina D₃ (colecalciferol)

Pipetou-se 1 mL de solução mãe de vitamina D₃ num balão volumétrico de 100 mL e diluiu-se com etanol até à marca.

De forma a quantificar-se o teor em vitamina destas duas soluções, mediu-se a absorvância (A_{265}) numa célula de quartzo de 1 cm no espectrofotómetro, a um comprimento de onda de 265 nm, utilizando etanol como branco. As concentrações mássicas da vitamina D₂ ($C_M D_2$) e da vitamina D₃ ($C_M D_3$) das respetivas soluções, em µg/mL de solução, foram obtidas a partir da seguinte equação:

$$C_M D_{2 \text{ ou } 3} = \frac{A_{265} \times 10^4}{E_{1 \text{ cm}}^{1\%}} \quad (4.2)$$

A 265 nm, para a vitamina D₂, $E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 475$ e para a vitamina D₃, $E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 480$.

Com estas duas soluções padrão de ensaio, vitamina D₂ e vitamina D₃, foram preparadas duas misturas padrão de vitamina D₂ e vitamina D₃, uma para a cromatografia semi-preparativa e outra para a cromatografia analítica. Para a cromatografia analítica foram ainda preparados dois padrões individuais de vitamina D₂ e de vitamina D₃. Nestas quatro soluções, o solvente (etanol) foi evaporado num evaporador rotativo à temperatura de 40 °C e o resíduo obtido foi reconstituído em 10 mL de solvente adequado.

Mistura padrão de Vitamina D₂ e vitamina D₃ (cromatografia semi-preparativa)

Pipetou-se 1 mL de solução padrão de ensaio de vitamina D₂ e 1 mL de solução padrão de trabalho de vitamina D₃ para um balão de evaporador rotativo, em forma de pera de 50 mL. Após a evaporação completa do solvente, o resíduo foi reconstituído em 10 mL de n-heptano para HPLC.

Mistura padrão de Vitamina D₂ e vitamina D₃ (cromatografia analítica)

Pipetou-se 5 mL de solução padrão de trabalho de vitamina D₂ e 5 mL de solução padrão de trabalho de vitamina D₃ para um balão de evaporador rotativo, em forma de pera de 50 mL. Após a evaporação completa do solvente, o resíduo foi reconstituído em 10 mL de metanol para HPLC.

Padrão individual de Vitamina D₂ (cromatografia analítica)

Pipetou-se 5 mL de solução padrão de trabalho de vitamina D₂ para um balão de evaporador rotativo, em forma de pera de 50 mL. Após a evaporação completa do solvente, o resíduo foi reconstituído em 10 mL de metanol para HPLC.

Padrão individual de vitamina D₃ (cromatografia analítica)

Pipetou-se 5 mL de solução padrão de trabalho de vitamina D₃ para um balão de evaporador rotativo, em forma de pera de 50 mL. Após a evaporação completa do solvente, o resíduo foi reconstituído em 10 mL de metanol para HPLC.

4.1.4.3 SOLUÇÕES DE FASE MÓVEL

A fase móvel utilizada no sistema de HPLC é constituída por n-heptano e 2-propanol, numa proporção de 98:2 (v:v), respetivamente. O sistema de HPLC permite definir a proporção pretendida, pelo que estes dois reagentes foram colocados em frascos de fase móvel separados.

4.1.5 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Neste trabalho, inicialmente foram adquiridas amostras de produtos com elevado teor de gordura, nomeadamente, creme vegetal com sabor a manteiga e creme para barrar com sabor a chocolate. Estas duas amostras foram adquiridas durante o mês de março de 2017 em superfícies comerciais e tinham a validade 29/06/2017 e 10/09/2017, respetivamente. Foram também analisados dois materiais de referência (FAPAS 21102 e FAPAS 21104) e um material de referência certificado (NIST 2383). Estas amostras foram utilizadas nos estudos de otimização do método.

Após a otimização do método foram utilizadas amostras compostas recolhidas no âmbito do projeto europeu *TDS Exposure*. Neste projeto começou por se definir a

população de interesse (adultos dos 18 aos 75 anos) e através do estudo “Alimentação e estilos de vida da população portuguesa” (Póinhos *et al.*, 2009) obtiveram-se dados acerca do consumo dos alimentos por essa população, tendo os alimentos sido classificados e agrupados de acordo com o sistema de classificação FoodEx2 desenvolvido pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA). Para cada um dos grupos deste sistema de classificação foram selecionados os alimentos mais consumidos (até se atingir uma cobertura de 90% do consumo total), constituindo-se assim as diferentes amostras TDS. Cada amostra TDS é composta por 12 subamostras representativas dos hábitos de consumo da população para aquele tipo de alimento.

O plano de amostragem elaborado para as amostras TDS consistiu na recolha (em superfícies comerciais da região da Grande Lisboa) das subamostras que foram selecionadas de acordo com a distribuição populacional e as quotas de mercado das superfícies comerciais e na preparação de cada uma das subamostras. A preparação das subamostras teve em conta o modo como são consumidas, tendo sido necessário o tratamento culinário em algumas delas (como no caso dos pratos compostos). Constituiu-se cada uma das amostras TDS, subdividindo-se cada uma delas em diferentes recipientes de acordo com os analitos a analisar (macronutrientes, minerais, vitaminas, metais pesados, micotoxinas e nitratos) e armazenaram-se a -20 °C, até à sua análise nos laboratórios do INSA (Procedimento de Ensaio: Determinação de vitaminas A e E por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), DAN, 2014; Dias *et al.*, 2015; Almeida, 2017).

O plano de amostragem do projeto *TDS Exposure* teve a duração de dois anos, tendo sido iniciado em abril de 2014, pelo que as amostras que foram analisadas já se encontravam preparadas.

As amostras do projeto *TDS Exposure* analisadas no âmbito deste trabalho foram as seguintes:

► **Grupo 5 – Pratos Compostos**

- ✓ Açordas e migas;
- ✓ Almôndegas;
- ✓ Arroz à valenciana;
- ✓ Arroz de frango e de pato;
- ✓ Arroz de marisco;
- ✓ Arroz de vegetais;
- ✓ Bacalhau à Brás e à Gomes de Sá;

- ✓ Bacalhau com natas e desfeita de bacalhau;
- ✓ Caldeirada de peixe;
- ✓ Caldo verde;
- ✓ Canja de galinha;
- ✓ Carne à bolonhesa, à jardineira, à alentejana;
- ✓ Salgadinhos;
- ✓ Cozido à portuguesa;
- ✓ Creme de marisco e peixe;
- ✓ Dobrada;
- ✓ Empadão de peixe;
- ✓ Empadão de carne;
- ✓ Feijoada e sopas de carne e feijão;
- ✓ Francesinha;
- ✓ Hambúrguer;
- ✓ Lasanha bolonhesa e vegetariana;
- ✓ Puré de batata;
- ✓ Pizzas;
- ✓ Rancho;
- ✓ Salada de alface e tomate;
- ✓ Salada russa;
- ✓ Sopas de legumes;
- ✓ Sopas de legumes e leguminosas;
- ✓ Sopa de tomate.

▶ **Grupo 6 – Ovos e produtos à base de ovos**

- ✓ Ovos.

▶ **Grupo 7 - Peixe, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados**

- ✓ Atum fresco;
- ✓ Bacalhau;
- ✓ Camarão;
- ✓ Caracóis;

- ✓ Carapau;
- ✓ Conquilhas e ameijoas;
- ✓ Lulas, espetadas de lulas;
- ✓ Peixes vermelhos;
- ✓ Polvo.

▶ **Grupo 11 - Cereais e produtos à base de cereais**

- ✓ Croissants;
- ✓ Pão de leite;
- ✓ Pastel de nata;
- ✓ Queques.

▶ **Grupo 13 – Carne e produtos à base de carne**

- ✓ Enchidos;
- ✓ Fiambre;
- ✓ Frango;
- ✓ Perú;
- ✓ Presunto e bacon.

▶ **Grupo 14 – Leite e produtos lácteos**

- ✓ Leite creme e pudim flan

Em algumas das amostras mencionadas a vitamina D já tinha sido previamente quantificada no laboratório e, por esse motivo, estas amostras já se encontravam na forma de soluções amostra. Neste trabalho, para estas soluções amostra fizeram-se as diluições convenientes para a determinação das vitaminas A e E em cada um dos extratos e injetaram-se no sistema de HPLC.

A injeção destas amostras serviu para verificar se, aplicando as condições cromatográficas do método otimizado para a determinação simultânea das vitaminas A, E e D, também se conseguiam quantificar as vitaminas A e E nos extratos obtidos de acordo com o procedimento da vitamina D implementado no laboratório.

4.1.6 SAPONIFICAÇÃO

No dia anterior à realização da análise, retirou-se a amostra a analisar do congelador e deixou-se a descongelar umas horas na camara frigorífica. Numa balança analítica, determinou-se a massa adequada de amostra (entre 0,5 e 10 g) cuidadosamente, até ao decimo do mg, num erlenmeyer de boca esmerilada de 250 mL e adicionou-se 1 g de ácido ascórbico, um antioxidante, para evitar que a amostra oxide. No caso das amostras de cremes vegetais pesaram-se as amostras em duplicado, no entanto, no caso das amostras do projeto TDS Exposure apenas se fez uma toma. Após a pesagem guardou-se o erlenmeyer no frigorífico até à sua análise no dia seguinte.

Uma vez que todas as amostras a analisar apresentam gordura na sua constituição, foi necessário sujeitar as amostras a um processo de saponificação, com o objetivo de remover essa gordura, ou seja, desesterificar os ésteres de α -tocoferol e os ésteres de retinilo, de forma a quantificar o α -tocoferol, o *trans*-retinol e o *cis*-retinol, por HPLC. Deste modo, ao erlenmeyer, adicionaram-se 100 mL de etanol e 20 mL de hidróxido de potássio a 60%, agitando-se no final. No caso de também se pretender determinar a vitamina D adiciona-se o padrão interno de acordo com o descrito no procedimento do Anexo 1. De seguida colocou-se o erlenmeyer no banho de água termostaticado com sistema de condensação incorporado, à temperatura de 100 °C, durante 45 minutos. Em seguida, retirou-se o erlenmeyer do banho e colocou-se a arrefecer num recipiente com gelo.

4.1.7 EXTRAÇÃO

Depois de arrefecida, adicionou-se à solução resultante da saponificação 100 mL de água purificada, de forma a prevenir a formação de emulsões e, de seguida, transferiu-se esta nova solução para uma ampola de decantação de 500 mL. A extração das vitaminas A e E foi realizada com a solução de extração mencionada em 4.1.4.1, tendo-se realizado 3 extrações de 50 mL cada (150 mL). Reunidos os extratos etéreos das 3 extrações numa mesma ampola, lavou-se com água até a sua reação com a solução alcoólica de fenolftaleína ser neutra. Em seguida, a fase etérea neutralizada foi filtrada com um filtro de papel de 185 mm, contendo sulfato de sódio anidro, para um balão de evaporador rotativo em forma de pera de 250 mL.

4.1.8 EVAPORAÇÃO

O balão contendo os extratos etéreos foi colocado no evaporador rotativo, com o banho de água a 40 °C, de forma a conseguir evaporar-se o solvente. A pressão utilizada inicialmente foi de 300 mbar e, quando a quantidade já era muito reduzida, reduziu-se para 20 mbar. Quando já não havia qualquer vestígio de solvente, retirou-se o balão do evaporador rotativo.

4.1.9 RECONSTITUIÇÃO

No caso de se pretender determinar apenas as vitaminas A e E, após se ter retirado o balão do evaporador rotativo, retomou-se o resíduo de insaponificável em 10 mL de n-heptano. De seguida, filtrou-se a solução com um filtro de PVDF de 0,45 μm , com uma seringa de 10 mL, reservando-se o filtrado num frasco de vidro pequeno, o qual corresponde à solução amostra para determinação dos analitos pretendidos. E, por último, com uma pipeta de Pasteur, retirou-se a quantidade suficiente da solução de amostra para análise para um *vial* que se colocou no injetor automático do HPLC. No caso de algumas amostras, demasiado concentradas, foi necessário efetuar diluições. Estas diluições foram feitas a partir da solução amostra para análise, pipetando-se 1 mL desta solução para balões volumétricos de 5 ou 10 mL, conforme a diluição a efetuar. No caso de se pretender também determinar a vitamina D a reconstituição deve ser feita no volume indicado no procedimento descrito no Anexo 1. Ainda neste caso foram utilizadas, após a reconstituição diluições bastante superiores a 1/5 ou 1/10 por forma a adequar as concentrações à gama de trabalho das vitaminas A e E.

4.1.10 CROMATOGRAFIA

4.1.10.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições utilizadas na análise cromatográfica (vitaminas A e E, a parte semi-preparativa da vitamina D) foram as seguintes:

- ▶ **Fase estacionária:** coluna LiCrhosorb Si60, de 25 cm de comprimento por 4 mm de diâmetro e com partículas de 5 μm ;
- ▶ **Fase móvel:** n-heptano / 2-propanol (98:2 v/v), modo isocrático;
- ▶ **Caudal:** 2 mL/min;
- ▶ **Tempo de corrida:** \pm 10 minutos;

- ▶ **Temperatura do forno da coluna cromatográfica:** 37 °C;
- ▶ **Temperatura da câmara das soluções a injetar:** 15 °C;
- ▶ **Volume de injeção:** 10 μL e, no caso de as concentrações obtidas estarem fora da gama de trabalho, injeções entre 10 e 100 μL para o alfa-tocoferol e para o all-*trans*-retinol e entre 10 e 200 μL para o 13-*cis*-retinol;
- ▶ **Comprimentos de onda dos detetores de fluorescência (vitamina A e E) e de UV/Vis (vitamina D):**
 - ✓ Vitamina A: $\lambda_{\text{Excitação}} = 295 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{Emissão}} = 330 \text{ nm}$;
 - ✓ Vitamina E: $\lambda_{\text{Excitação}} = 325 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{Emissão}} = 475 \text{ nm}$;
 - ✓ Vitamina D: $\lambda = 265 \text{ nm}$.

Em primeiro lugar injetaram-se os 6 padrões da reta de calibração (soluções padrão de ensaio, mencionadas em 4.1.4.2) e de seguida as amostras (soluções de amostra para análise, mencionadas em 4.1.9). Para cada *vial* fizeram-se 2 injeções. Em relação à vitamina D injetaram-se as soluções padrão de acordo com o descrito no Anexo 1.

4.1.10.2 IDENTIFICAÇÃO

Os picos de interesse obtidos nos cromatogramas foram identificados com base nos tempos de retenção dos padrões, isto é, com base nos cromatogramas dos 6 padrões injetados obtiveram-se os tempos de retenção do α -tocoferol, do all-*trans*-retinol e do 13-*cis*-retinol e, através deles, identificaram-se os analitos correspondentes às vitaminas A e E nas amostras. No caso da vitamina D os tempos de retenção foram obtidos a partir da injeção do padrão contendo a mistura das vitaminas D ($D_2 + D_3$).

4.1.10.3 QUANTIFICAÇÃO

Através do software EMPOWER® integrado no sistema de HPLC, a quantificação das vitaminas A e E foi efetuada com base no método de padrão externo multinível e as retas de calibração foram determinadas pelo método dos mínimos quadrados. Com estas retas de calibração calcularam-se as concentrações dos analitos nas soluções amostra interpolando as respetivas áreas dos picos na reta de calibração respetiva. Considerando a toma da amostra e as diluições efetuadas, calcularam-se as concentrações das vitaminas A e E nas amostras.

O cálculo da concentração da vitamina A (all-*trans*-retinol e *cis*-retinol), em µg/100 g de amostra, é efetuado utilizando a folha de cálculo DAN URQ – IM25 (no Anexo 3), segundo as equações 4.3 e 4.4:

$$Vit A_{trans/cis} = \frac{S_{inj} \times V_{rec}}{m \times d} \times 100 \quad (4.3)$$

$$Vit A_{total} = Vit A_{trans} + 0,75 Vit A_{cis} \quad (4.4)$$

Sendo:

$Vit A_{trans}$ – Concentração final de Vitamina A (all-*trans*-retinol) na amostra (µg/100g)

$Vit A_{cis}$ – Concentração final de vitamina A (13-*cis*-retinol) na amostra (µg/100g)

S_{inj} – Concentração da solução analisada no cromatógrafo (µg/mL)

V_{rec} – Volume em que a toma de amostra foi reconstituída (mL)

m – Massa da toma de amostra (g)

d – Diluição efetuada na solução para análise

O cálculo da concentração da vitamina E (dl- α -tocoferol), em mg/100 g de amostra, é efetuado utilizando a folha de cálculo DAN URQ – IM26 (no Anexo 4), segundo a equação 4.5:

$$Vit E = \frac{S_{inj} \times V_{rec}}{m \times d} \times 0,1 \quad (4.5)$$

Sendo:

$Vit E$ – Concentração final de Vitamina E (dl- α -tocoferol) na amostra (mg/100g)

Para estes cálculos da concentração das amostras, as retas de calibração só foram utilizadas quando $r \geq 0,995$, sendo r o coeficiente de correlação da reta.

Neste trabalho não foi efetuada a quantificação de vitamina D. No que se refere a esta vitamina apenas se recolheram os extratos no tempo de retenção da vitamina D.

4.2 ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO

Com base nas três normas que servem de base aos dois procedimentos de ensaio mencionados, estudou-se a possibilidade da utilização do passo de extração e do passo de saponificação do método de análise da vitamina D implementado no laboratório para extrair e saponificar as vitaminas A e E.

4.2.1 OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

De forma a ser mais perceptível, na Tabela 4.2 apresentam-se resumidamente as condições de extração/saponificação utilizadas nos procedimentos para determinar as vitaminas A e E (método AE) e a vitamina D (método D).

Tabela 4.2 Condições de saponificação e extração utilizadas nos métodos de determinação das vitaminas A, E e D

Etapas do procedimento		Método D	Método AE
SAPONIFICAÇÃO	Tratamento da amostra	100 mL de EtOH + 1 g de AA + 20 mL de solução de KOH ¹ a 60%	50 mL de solução metanólica de AA ² a 0,5% + 5 mL de solução de KOH a 60%
	Tempo de permanência no banho-de-água	45 minutos	60 minutos
EXTRAÇÃO	Volume de extração	3 x 25 mL (75 mL)	4 x 100 mL (400 mL)

AA – Ácido Ascórbico **EtOH** – Etanol **KOH** – Hidróxido de Potássio

¹ No procedimento experimental apresentado no Anexo 1 são adicionados apenas 7,5 mL desta solução. Este valor foi alterado para 20 mL pelo facto de as amostras em estudo terem um elevado teor de gordura

² Solução metanólica de ácido ascórbico a 0,5% - dissolveram-se 0,5 g de ácido ascórbico em metanol, num balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume de 100 mL com metanol

O passo da saponificação difere em cada um dos métodos em termos do solvente, tempo e concentração da base. Deste modo, no método AE, no passo de saponificação, começou por se adicionar etanol em vez de metanol, da forma e nas quantidades indicadas no procedimento de ensaio da vitamina D e avaliou-se se os teores de vitaminas A e E se mantinham idênticos aos teores obtidos com o método AE. No que se refere ao tempo de saponificação, avaliou-se se os teores de vitaminas A e E para o tempo de saponificação do método D se mantinham idênticos aos teores obtidos pelo método AE.

No que se refere ao passo de extração, o método AE utiliza uma grande quantidade de reagentes durante este passo, comparativamente ao método D, havendo a necessidade de avaliar a possibilidade de reduzir a quantidade de reagentes de extração atualmente utilizada.

Nesse sentido, até se chegar ao volume de extração final foram realizados três estudos ao longo de vários dias. Numa primeira fase, estudaram-se em simultâneo os efeitos do tempo de saponificação e do volume de solvente de extração nos resultados dos teores das vitaminas A e E nos alimentos analisados. Neste estudo, tanto para os 60 minutos como para os 45 minutos, avaliaram-se os volumes de extração de 3 x 25 mL (método D), 4 x 50 mL e 4 x 100 mL (método AE), utilizando-se as amostras de creme vegetal com sabor a manteiga (79% de gordura), creme para barrar com sabor a chocolate (45% de gordura) e um material de referência, o FAPAS 21102 (fórmula infantil à base de leite).

Tendo como referência as normas EN 12821, 12822 e 12823-1, que sugerem a utilização de volumes de solvente de extração entre 50 e 150 mL e uma repetição do processo por 3 ou 4 vezes (número de extrações efetuadas), numa segunda fase, estudaram-se os volumes 4 x 25 mL e 3 x 50 mL, para 45 minutos de saponificação (uma vez que nesta fase já se tinha verificado que era possível extrair as vitaminas A e E apenas em 45 minutos) utilizando as mesmas amostras de cremes vegetais para barrar.

Após estes dois estudos, numa última fase, fez-se um ensaio para o material de referência FAPAS 21104 (alimento em pó para bebé utilizado na preparação de papas) para os 5 volumes diferentes em estudo e apenas para 45 minutos de saponificação (uma vez que na segunda fase de estudos já se tinha verificado que os 45 minutos eram suficientes para extrair as vitaminas A e E), de forma a ter-se também uma referência, já que na rotulagem é permitido um desvio apreciável em relação ao real.

Em suma, os volumes de extração estudados foram os seguintes:

- ▶ 3 x 25 mL (75 mL);
- ▶ 4 x 25 mL (100 mL);
- ▶ 3 x 50 mL (150 mL);
- ▶ 4 x 50 mL (200 mL);
- ▶ 4 x 100 mL (400 mL).

4.2.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A vitamina D está naturalmente presente nos alimentos sob a forma de colecalciferol (vitamina D₃). No entanto, há algumas exceções, nas quais está sob a forma de vitamina D₂. A determinação de vitamina D₃ ou D₂ numa solução apropriada de extrato da amostra é feita por HPLC semi-preparativa de fase normal seguida de HPLC analítica de fase inversa. No caso de se determinar a vitamina D₃, o padrão interno adicionado é a vitamina D₂ e na quantificação da vitamina D₂, o padrão interno a adicionar é a vitamina D₃. A vitamina D é detetada por espectrofotometria de ultravioleta (UV) e os picos são identificados com base nos tempos de retenção, sendo a determinação feita através das áreas dos picos do padrão interno, tendo em consideração o fator de resposta (Procedimento de Ensaio: Determinação de vitamina D por cromatografia líquida de alta resolução, DAN, 2015).

De notar que o equipamento de HPLC utilizado na análise semi-preparativa da vitamina D é o utilizado na análise das vitaminas A e E.

Para o estudo das novas condições do método de HPLC, utilizou-se um padrão com a mistura de vitamina D (mistura de padrões para a cromatografia semi-preparativa), que foi injetado no sistema de HPLC sob quatro condições cromatográficas diferentes, tendo por base os procedimentos do método AE e do método D atualmente utilizados no laboratório, de forma a avaliar a separação da vitamina D da vitamina E e da vitamina A (*all-trans*-retinol e *13-cis*-retinol).

Nas diferentes condições cromatográficas avaliadas no sistema de HPLC semi-preparativo utilizou-se a mesma fase móvel, mistura de n-heptano (A) e 2-propanol (B), nas diferentes proporções A:B. As condições foram as seguintes:

1. Fluxo de 1 mL/min e fase móvel na proporção de 97:3, condição utilizada no método D;
2. Fluxo de 2 mL/min e fase móvel na proporção de 98:2, condição utilizada no método AE;
3. Fluxo de 1 mL/min (método D) e fase móvel na proporção de 98:2 (método AE);
4. Fluxo de 2 mL/min (método AE) e fase móvel na proporção de 97:3 (método D).

De seguida preparou-se um padrão AED (mistura de padrões de vitaminas A, E e D), pipetando-se 0,5 mL de padrão de vitamina D (D_2+D_3) e 0,5 mL da solução padrão 6 (Tabela 4.1) para um *vial* de forma a testar-se a condição escolhida.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Uma vez que se teve como ponto de partida o procedimento já validado no laboratório do DAN, a validação feita no âmbito deste trabalho foi uma validação parcial. Deste modo, foram realizados estudos de exatidão e estudos de precisão em condições de repetibilidade e precisão intermédia, após a otimização do método para os processos de saponificação e extração. A determinação destes parâmetros foi feita com recurso a folhas de cálculo implementadas no DAN.

Exatidão

A exatidão deste método analítico foi avaliada através da análise de um material de referência certificado, MRC NIST 2383, constituído por uma mistura de matrizes alimentares de papas de bebé (*baby food*) contendo os analitos em questão (vitaminas A e E).

Precisão

► Repetibilidade e Precisão intermédia

A repetibilidade e a precisão intermédia do método foram avaliadas em simultâneo através da análise de diferentes amostras: uma amostra de creme vegetal para barrar com sabor a manteiga e três amostras compostas diferentes (doces à base de leite, salgados e ovos). Cada amostra foi analisada em duplicado e ao longo de três dias diferentes, fazendo um total de 24 resultados. Nestes ensaios manteve-se o mesmo equipamento, o mesmo analista e seguiu-se o mesmo procedimento experimental.

Na repetibilidade determinou-se o *CV* da repetibilidade, CV_r , e na precisão intermédia o *CV* da precisão intermédia, CV_{pi} .

Relativamente aos parâmetros de validação previamente avaliados no âmbito da acreditação do método em utilização no DAN, estes encontram-se apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Parâmetros de validação do método acreditado e em utilização no DAN

		Vitamina A		Vitamina E
		<i>all-trans-retinol</i>	<i>13-cis-retinol</i>	α -tocoferol
Limites analíticos	Limite de deteção	0,12 $\mu\text{g/mL}$ (5,9 $\mu\text{g}/100\text{g}$)	0,036 $\mu\text{g/mL}$ (1,8 $\mu\text{g}/100\text{g}$)	0,30 $\mu\text{g/mL}$ (0,015 $\mu\text{g}/100\text{g}$)
	Limite de quantificação	0,36 $\mu\text{g/mL}$ (18 $\mu\text{g}/100\text{g}$)	0,11 $\mu\text{g/mL}$ (5,4 $\mu\text{g}/100\text{g}$)	0,91 $\mu\text{g/mL}$ (0,046 $\mu\text{g}/100\text{g}$)
Precisão	Amostras	NIST 8435 ¹ e ENFALAC ²	NIST 8435 ¹	ENFALAC ²
	CVr	36% e 34% (respetivamente)	41%	2,7%
	CVpi	31% e 27% (respetivamente)	29%	2,9%
Exatidão	Amostras	FAPAS 2150 ³	FAPAS 2150 ³	FAPAS 2150 ³ e NIST 2383 ⁴
	Z-score	≤ 2 (aceitável)	≤ 2 (aceitável)	≤ 2 (aceitável)

CVr – Coeficiente de variação da repetibilidade

CVpi – Coeficiente de variação da precisão intermédia

¹ NIST 8435 (Leite em pó)

² Leite em pó ENFALAC

³ FAPAS 2150 (*Powdered Baby Food*)

⁴ NIST 2383 (*Baby Food*)

Uma vez que os métodos que tiveram por base o método desenvolvido já se encontravam previamente acreditados, os seus valores de incerteza já tinham sido previamente avaliadas, sendo o valor máximo de incerteza expandida relativa de 30 %. Por este facto, a discussão dos resultados apresentados neste subcapítulo foi efetuada tendo em consideração este valor de incerteza e, por isso, os resultados obtidos são apresentados com dois algarismos significativos.

Os teores das vitaminas A e E foram obtidos após o procedimento experimental através das folhas de cálculo apresentadas nos Anexos 3 e 4 e das retas de calibração construídas para os diferentes analitos, cis- e trans-retinol e α -tocoferol (Anexo 5).

5.1 ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO NO TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Tal como referido ao longo do procedimento experimental, no subcapítulo 4.1, após as fases orgânicas contendo as vitaminas A e E estarem reunidas, estas são filtradas, evaporadas e redissolvidas no solvente da fase móvel. Ora, como o volume total a filtrar e a evaporar são cerca de 400 mL, estes dois passos são demasiado morosos, chegando a ter de serem realizados em diversas vezes, o que contribui para um tempo total de análise elevado. E, também, como o solvente de extração se trata de uma mistura de dois reagentes, éter de petróleo e éter etílico na proporção 8:2 (v:v), isto gera um enorme desperdício de solventes de extração. Além disso são solventes tóxicos e por isso agressivos para o meio ambiente. Por estes motivos, fizeram-se estudos de otimização no tratamento das amostras, no processo de extração e também no processo de saponificação, na tentativa de tornar o método atualmente utilizado e acreditado no laboratório do DAN mais rápido, mais económico e mais amigo do ambiente.

No método desenvolvido utilizou-se, na saponificação, etanol (o solvente utilizado no laboratório para a determinação da vitamina D) em vez de metanol (o solvente utilizado no laboratório para a determinação simultânea das vitaminas A e E), por questões ambientais e de toxicidade para o operador. A diminuição do tempo de saponificação contribuiu para um tempo de análise mais curto.

Na Tabela 5.1, conforme descrito no subcapítulo 4.2.1, são apresentados os valores obtidos no estudo simultâneo do efeito do tempo e solvente de saponificação e do volume de solvente de extração nos teores de vitamina A e E das amostras de creme manteiga, creme chocolate e FAPAS 21102, e respetivos valores referenciados para as diferentes amostras (no caso dos cremes apresentam-se os valores rotulados).

Tabela 5.1 Teores de vitaminas A e E em diferentes amostras para diferentes condições de tratamento das amostras

Extração	Vitamina	Teor de vitamina (mg/100g)					
		Creme manteiga		Creme chocolate		FAPAS 21102	
		60 min	45 min	60 min	45 min	60 min	45 min
4 x 100 mL	A	0,53	0,59	0,40	0,42	–	–
	E	17	17	11	11	–	–
4 x 50 mL	A	0,68	0,44	0,48	0,40	–	–
	E	18	19	11	10	–	–
3 x 25 mL	A	–	0,18	–	0,21	0,14	–
	E	–	9	–	7	5	–
Rótulo (mg/100 g)	A	0,80		0,82		0,51	
	E	13		12		11	

– Não realizado

Analisando os dados obtidos na Tabela 5.1, para a extração com 100 mL (4 vezes), para o creme com sabor a manteiga e creme com sabor a chocolate, tanto para 60 minutos como para 45 minutos de saponificação, os teores de vitamina E obtidos foram, respetivamente, 17 e 11 mg/100g. Tendo em consideração o valor máximo de incerteza de 30% (mencionado anteriormente), a extração com 50 mL (4 vezes) também permitiu extrair a vitamina E, de igual modo, uma vez que os teores obtidos foram idênticos aos anteriores.

No caso da vitamina A, tendo também em consideração o valor máximo de incerteza de 30%, comparativamente à extração com 100 mL (4 vezes), a extração com 50 mL (4 vezes) também permitiu extrair a vitamina A.

Deste modo, a redução do tempo de saponificação de 60 minutos (condição inicial) para 45 minutos e a redução do volume de extração de 100 mL (condição inicial) para 50 mL, permitiram saponificar e extrair as vitaminas A e E das amostras adequadamente.

Comparando os valores obtidos para a extração com 25 mL (3 vezes) com os valores obtidos para os volumes de extração de 100 e 50 mL, verificou-se que a extração com 25 mL não se revelou suficiente para extrair as vitaminas A e E dos cremes com sabor a manteiga e com sabor a chocolate. Contudo, para se ter a certeza de que este volume de extração não era adequado, fez-se o ensaio para este volume de extração com o material de referência FAPAS 21102. Analisando os dados obtidos para este material de referência, é possível perceber que o volume de extração de 25 mL também não foi

suficiente para extrair as vitaminas A e E, uma vez que os valores obtidos foram muito inferiores aos valores declarados (Tabela 5.1). Através do cálculo do valor de *z-score* (equação 3.7), foi também possível verificar que o volume de 3 x 25 mL não foi suficiente, uma vez que para a vitamina A e para a vitamina E foram obtidos valores de 7 e 5 e assim, sendo superiores a 3 (resultado insatisfatório), confirmou-se que este volume de extração não foi adequado.

De acordo com os valores de rotulagem indicados para os cremes vegetais na Tabela 5.1, pode ver-se que, para a vitamina E, os valores obtidos estão próximos do valor rotulado ou ligeiramente acima deste, mas para a vitamina A os valores obtidos estão cerca de metade abaixo do valor rotulado, o que poderia induzir em erro, pois poderia pensar-se que o método utilizado não estaria a extrair a vitamina A na sua totalidade, o que seria um pouco de estranhar, uma vez que o aumento do volume de extração não aumentou o teor de vitamina A determinado.

Segundo o documento de orientação da Comissão Europeia (2012), que se destina a auxiliar as entidades fiscalizadoras na definição de tolerâncias para a rotulagem nutricional de alimentos e suplementos alimentares, publicado em Dezembro de 2012, a tolerância máxima aceitável, para as vitaminas, é de +50% e a tolerância mínima aceitável é de -35%.

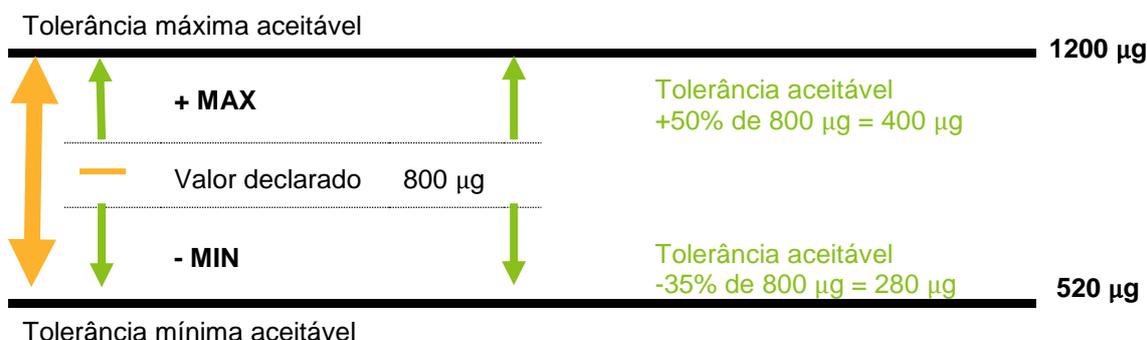


Figura 5.1 Exemplo de aplicação das tolerâncias, máxima e mínima, aceitáveis para a rotulagem de vitaminas (vitamina A em creme vegetal com sabor a manteiga) [Adaptado de FSE, 2014]

O esquema ilustrado na Figura 5.1, com o exemplo para o valor indicado no rótulo da embalagem de creme vegetal com sabor a manteiga, esclarece que, para esta amostra, os valores de vitamina A obtidos pelas análises devem estar entre 520 e 1200 µg. Verificando os valores da Tabela 5.1 pode ver-se que a vitamina A satisfaz o intervalo para o volume de extração 4 x 100 mL mas, para o volume de extração de 4 x 50 mL, apenas satisfaz o intervalo para 60 minutos de saponificação. Para 45 minutos de saponificação a vitamina A encontrou-se abaixo da tolerância mínima. Seguindo o mesmo esquema para esta mesma amostra, os valores de vitamina E

devem encontrar-se entre 8 e 20 mg, o que se pode verificar pela Tabela 5.1 que aconteceu. No caso da segunda amostra, creme para barrar com sabor a chocolate, seguindo também o mesmo esquema, a vitamina A deve estar entre 530 e 1224 μg e a vitamina E entre 8 e 18 mg. Verificando os valores obtidos na Tabela 5.1 pode ver-se que a vitamina E satisfaz o intervalo e que a vitamina A se encontrou abaixo da tolerância mínima. No entanto, embora os valores de vitamina A se tenham encontrado abaixo do intervalo de tolerância, este trabalho não teve como objetivo proceder com estudos para averiguar se o facto de as vitaminas A e E se encontrarem acima ou abaixo do intervalo de tolerância estabelecido pela Comissão Europeia (2012), pelo que nesse caso seria necessário analisar mais amostras do mesmo lote ou lotes diferentes.

Com base nos resultados obtidos e para o tempo de saponificação de 45 minutos, com vista a reduzir o volume de solventes de extração, foram feitos mais estudos com diferentes volumes de extração, 3 x 50 mL e 4 x 25 mL, volumes intermédios (entre 4 x 50 mL e 3 x 25 mL), para se averiguar se com esses volumes também é possível extrair as vitaminas A e E, tendo em consideração que o volume 4 x 50 mL se tinha revelado adequado. A amostra utilizada foi o creme com sabor a manteiga (creme manteiga), sendo os resultados apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Teores de vitamina A e E, para os diferentes volumes de extração, da amostra de creme vegetal com sabor a manteiga saponificada durante 45 minutos

Teor de vitamina (mg/100 g)	Extração	
	3 x 50 mL	4 x 25 mL
A	0,40	0,23
E	21	14

Analisando os dados obtidos na Tabela 5.2 e comparando com os dados obtidos na Tabela 5.1, o volume de 50 mL (três vezes) permitiu extrair as vitaminas A e E e o volume de 25 mL (4 vezes), contrariamente, não foi suficiente para extrair as mesmas vitaminas.

Os volumes de extração anteriormente estudados foram confirmados utilizando o material de referência FAPAS 21104, constituindo por um lado um tipo de matriz diferente e por outro uma matriz de referência. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 Teores de vitamina A e E do material de referência FAPAS 21104, saponificado durante 45 minutos, para os diferentes volumes de extração, e respectivos valores de referência

		Extração				
		4 x 100 mL	4 x 50 mL	3 x 50 mL	4 x 25 mL	3 x 25 mL
Teor de vitamina (mg/100 g)	A	0,37	0,43	0,41	0,40	0,33
	E	10	10	11	8	8
Referência (mg/100 g)	A	0,53 (0,36 a 0,70)				
	E	9,9 (7,9 a 12)				

Analisando os dados obtidos na Tabela 5.3, e tendo em conta também os valores obtidos na Tabela 5.1 e na Tabela 5.2, verifica-se que o menor volume capaz de extrair as vitaminas A e E é o volume 3 x 50 mL.

Analisando os valores de *z-score* apresentados na Tabela 5.4 pode verificar-se que apenas a vitamina A no volume de extração 3 x 25 mL apresenta um valor de *z-score* questionável ($2 < |z| \leq 3$). Os restantes valores obtidos são resultados satisfatórios, ou seja, $|z| \leq 2$.

Tabela 5.4 Valores de *z-score* das vitamina A e E, para o material de referência FAPAS 21104, nos diferentes volumes de extração

		Extração				
		4 x 100 mL	4 x 50 mL	3 x 50 mL	4 x 25 mL	3 x 25 mL
<i>z-score</i>	Vitamina A	1,8	1,1	1,4	1,5	2,3
$ z $	Vitamina E	0,10	0,10	1,1	1,9	1,9

Deste modo, foi possível otimizar o método não só no processo de extração como também no processo de saponificação, tornando-se numa mais valia em termos não só económicos e de tempo, mas também ambientais, uma vez que assim diminui-se o tempo total de análise das amostras, utilizam-se menores quantidades de reagentes e utilizou-se um solvente, sob o ponto de vista ambiental e de toxicidade, mais favorável na saponificação. Com isto, conseguiu reduzir-se o tempo de saponificação em 25% e o volume de solventes de extração em 63%.

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Tal como mencionado no Capítulo 4.1.3, procedeu-se ao desenvolvimento de um método HPLC (método AED) capaz de identificar e quantificar as vitaminas A, D e E em matrizes alimentares.

Na Figura 5.2, apresentam-se os tempos de retenção dos analitos α -tocoferol, cis-retinol e trans-retinol num cromatograma relativo ao padrão de vitaminas A e E.

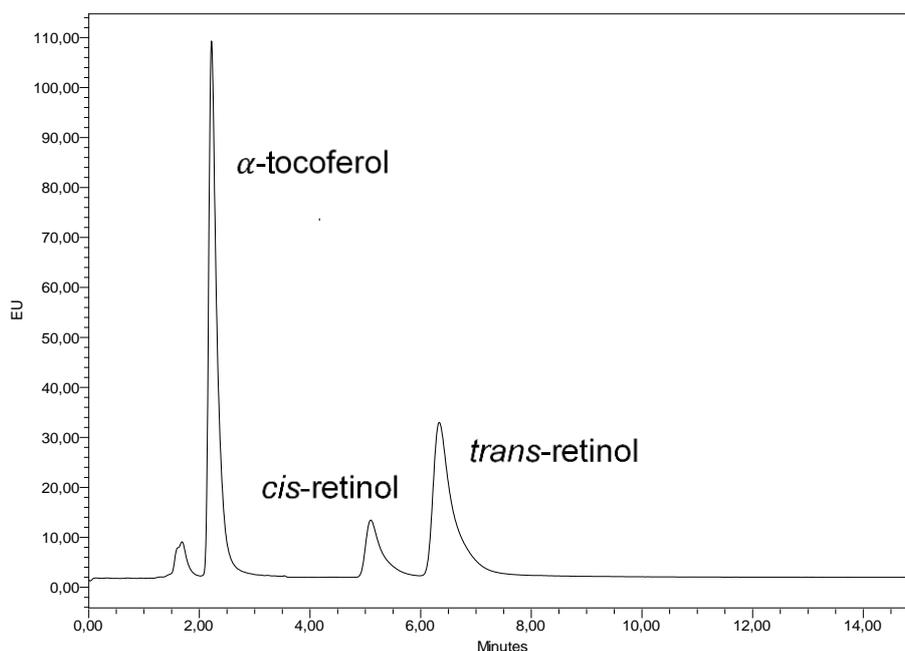


Figura 5.2 Cromatograma do padrão de vitaminas A e E (tempos de retenção: α -tocoferol 2,4 min, cis-retinol 5,2 min e trans-retinol 6,5 min; caudal: 2 mL/min)

De acordo com a Figura 5.2, os tempos de retenção do α -tocoferol, cis-retinol e trans-retinol são, respetivamente, 2,4 min, 5,2 min e 6,5 min.

Nas Figuras 5.3 a 5.6 apresentam-se os cromatogramas para cada uma das condições cromatográficas mencionadas no Capítulo 4.2.2 e os respetivos tempos de retenção obtidos para a vitamina D.

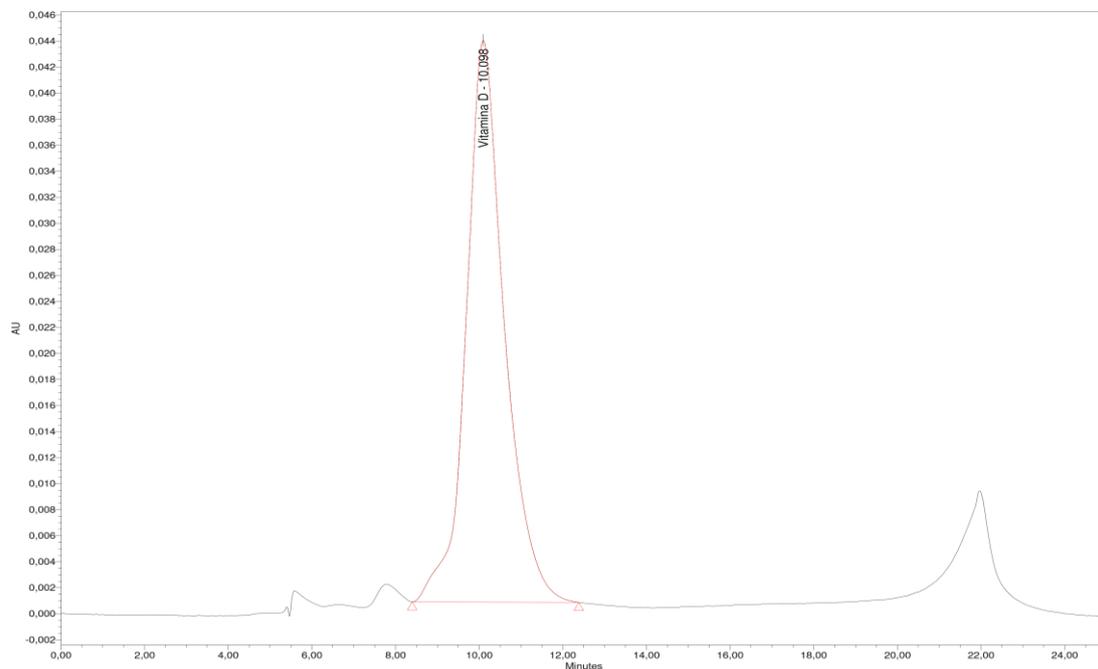


Figura 5.3 Cromatograma do padrão de vitamina D para um fluxo de 1 mL/min e fase móvel (n-heptano:propanol) 97:3 (método D)

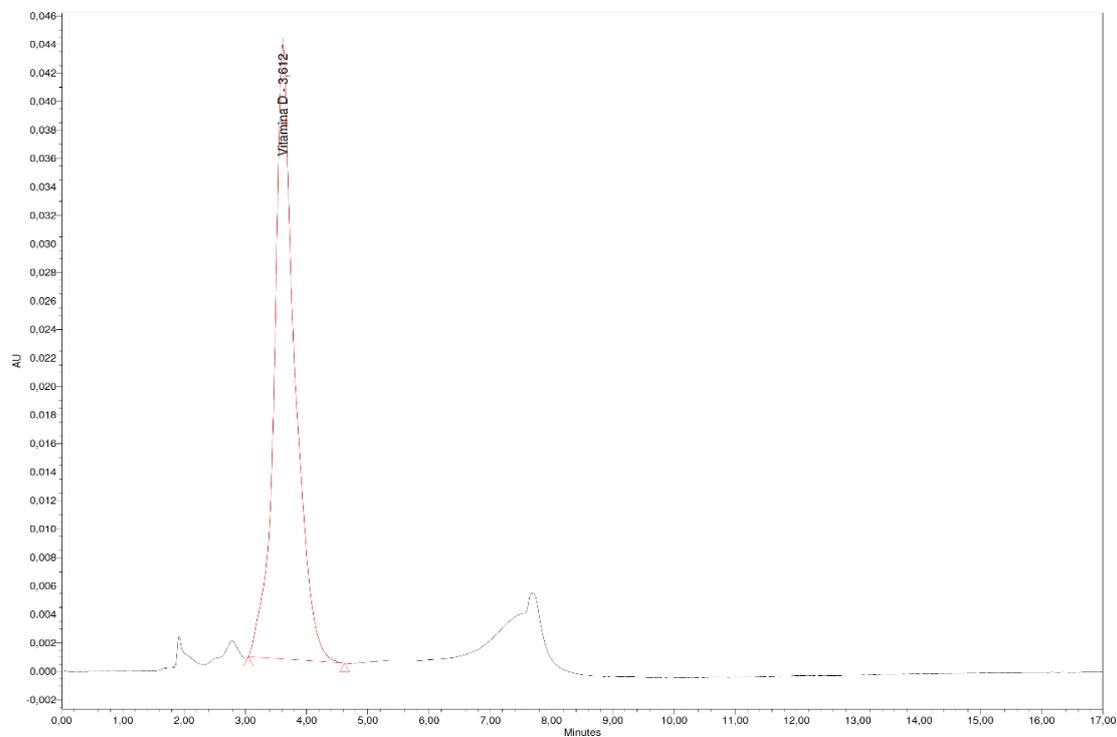


Figura 5.4 Cromatograma do padrão de vitamina D para um fluxo de 2 mL/min (método AE) e fase móvel (n-heptano:propanol) 97:3 (método D)

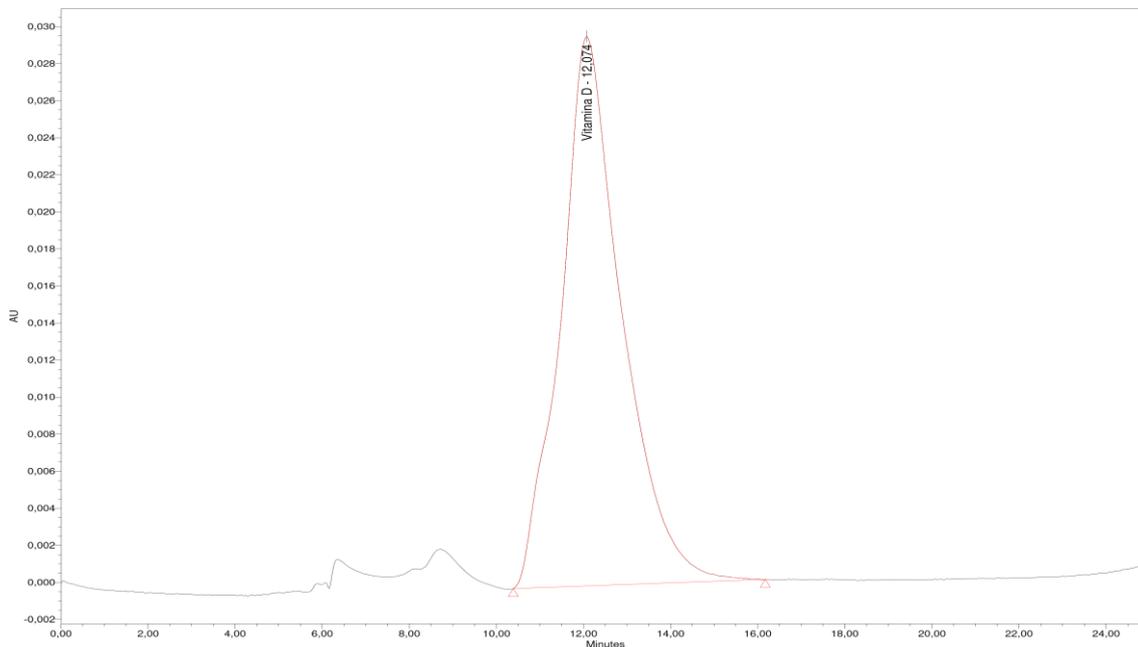


Figura 5.5 Cromatograma do padrão de vitamina D para um fluxo de 1 mL/min (método D) e fase móvel (n-heptano:propanol) 98:2 (método AE)

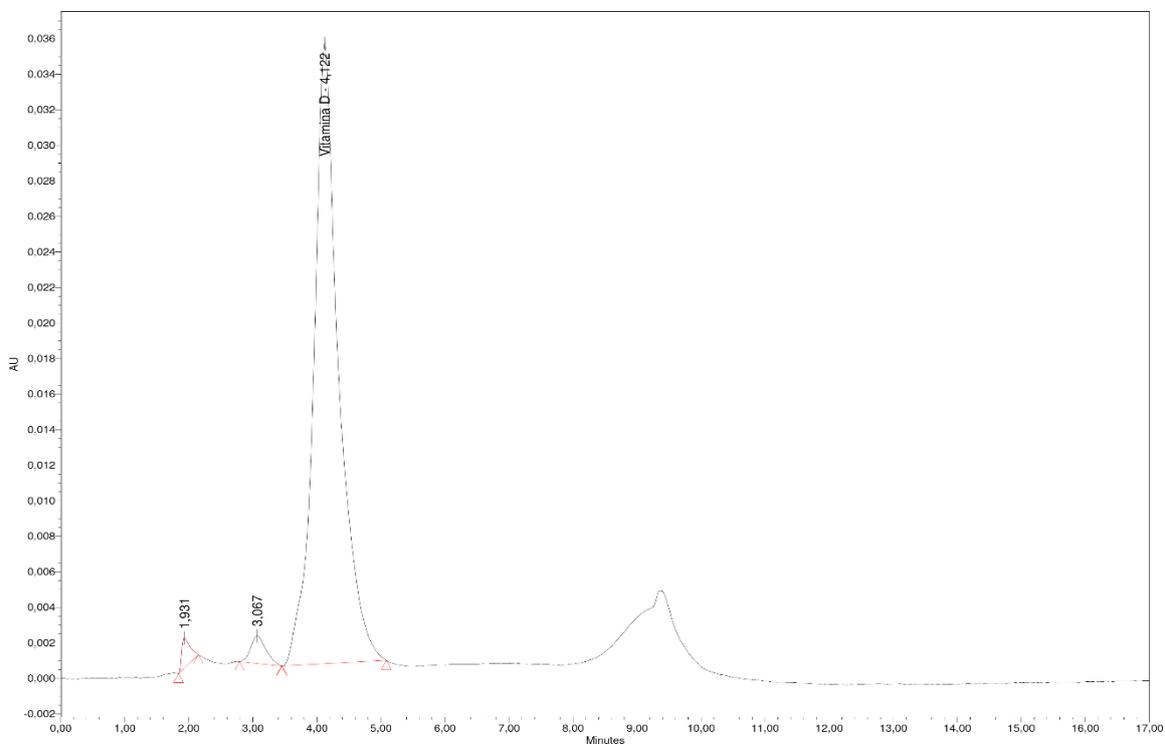


Figura 5.6 Cromatograma do padrão de vitamina D para um fluxo de 2 mL/min e fase móvel (n-heptano:propanol) 98:2 (método AE)

Analisando as Figuras 5.3 a 5.6, pode ver-se que com as condições do método D (Figura 5.3), a vitamina D tem um tempo de retenção de 10,098 minutos. Mantendo a proporção dos solventes da fase móvel em 97:3 e alterando o fluxo para 2 mL/min (Figura 5.4), o tempo de retenção da vitamina D passou a ser de 3,612 minutos. Mantendo o fluxo a 1 mL/min e alterando a fase móvel para a proporção de solventes de 98:2 (Figura 5.5), o tempo de retenção da vitamina D foi de 12,074 minutos. Com as condições do método das vitaminas A e E (Figura 5.6), a vitamina D tem um tempo de retenção de 4,122 minutos.

Desta forma, com base nos resultados e de maneira a que os diferentes picos saiam em tempos diferentes, sem haver sobreposição de picos, aparentemente será possível utilizar as condições cromatográficas utilizadas no procedimento de ensaio das vitaminas A e E, ou seja, fluxo de 2 mL/min e fase móvel na proporção de solventes de 98:2.

De forma a testar-se a condição escolhida, criou-se um padrão AED (mistura de padrões de vitaminas A, E e D) e injetou-se no sistema de HPLC com a condição cromatográfica escolhida. Na Figura 5.7 ilustra-se o cromatograma resultante desta injeção.

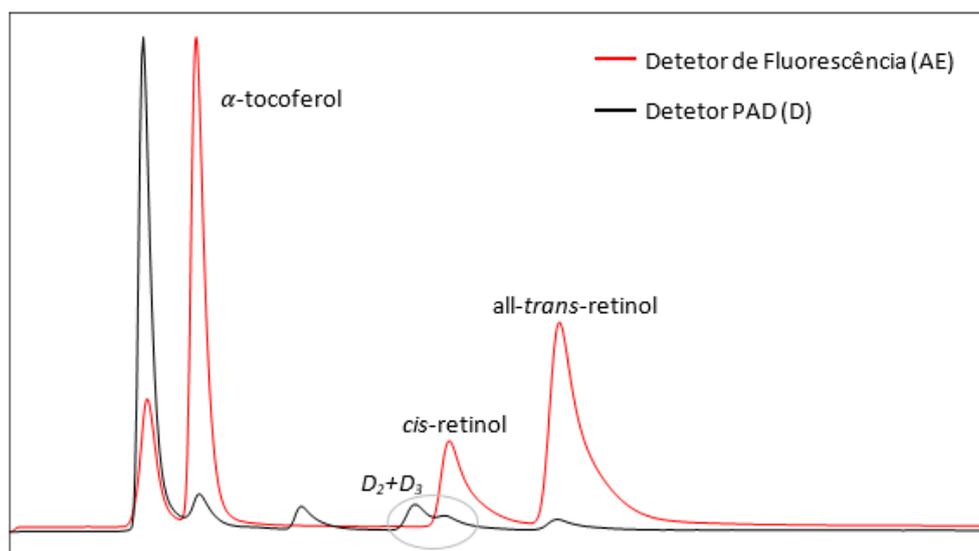


Figura 5.7 Cromatograma do padrão AED

Analisando a Figura 5.7, verifica-se que os picos correspondentes ao cis-retinol e à vitamina D (D_2+D_3) se sobrepõem num determinado momento.

Na tentativa de separar o cis-retinol da vitamina D, fizeram-se duas injeções do padrão da mistura das vitaminas D_2 e D_3 (cromatografia semi-preparativa), de forma a identificar-se o intervalo de tempo de retenção da vitamina D e de seguida fizeram-se

duas injeções do padrão AED e recolheram-se (no tempo de retenção da vitamina D identificado) as frações de cada injeção para a mesma pera de evaporação. Evaporou-se o solvente até à secagem, dissolveu-se em 0,5 mL de metanol e introduziu-se a quantidade adequada num *vial*. Recorrendo ao sistema de HPLC utilizado para a parte analítica da determinação da vitamina D, injetou-se o padrão de vitamina D (D_2+D_3) e a fração que contém *cis*-retinol e vitamina D mencionada, utilizando-se um caudal de 1,5 mL/min e as restantes condições cromatográficas indicadas no ponto 6.7.3 do Anexo 1. Na Figura 5.8 ilustra-se o cromatograma resultante.

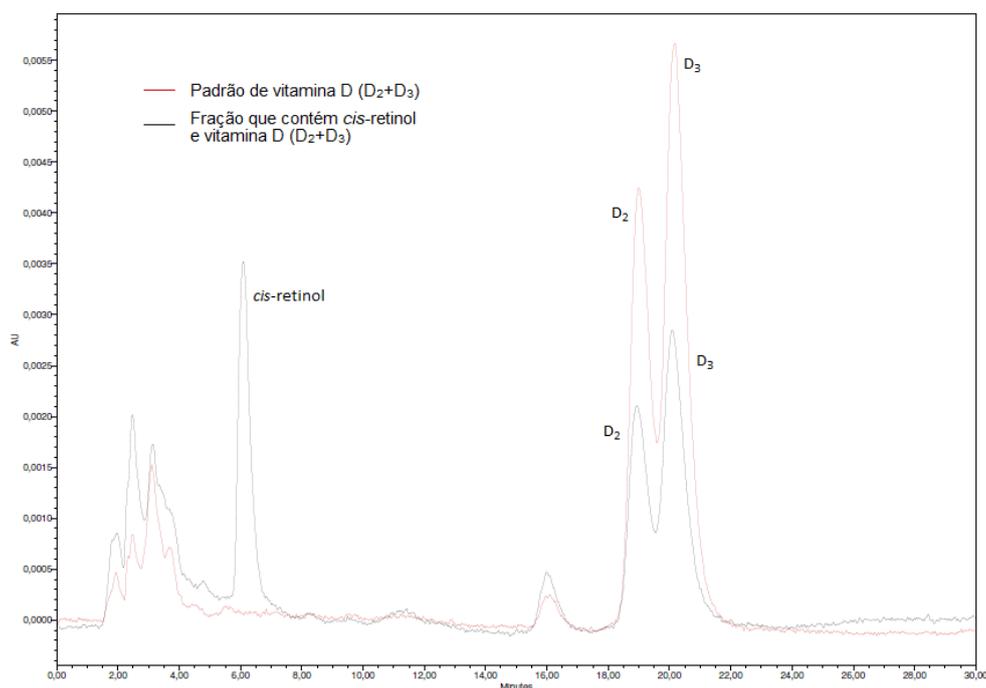


Figura 5.8 Cromatograma do padrão de vitamina D e da fração que contém *cis*-retinol e vitamina D (D_2+D_3)

Através da Figura 5.8 consegue verificar-se que é possível separar o *cis*-retinol da vitamina D, permitindo a quantificação da vitamina D.

Ao contrário das vitaminas A e E, a vitamina D é quantificada recorrendo ao método de padrão interno. Esta quantificação é realizada através de rácios de resposta entre o analito e o padrão interno, sendo a análise quantitativa realizada por comparação da resposta (área do pico) do analito presente na mistura com a resposta da solução padrão. Na Tabela 5.5 apresentam-se os valores obtidos para as áreas dos picos correspondentes à vitamina D_2 e à vitamina D_3 , para a solução padrão da mistura de vitaminas D_2+D_3 e para a fração que contém o *cis*-retinol e a mistura de vitaminas D_2+D_3 e respetivos fatores de resposta.

O cálculo dos fatores de resposta (FR) foi efetuado na folha de cálculo apresentada no Anexo 6, segundo a equação 5.1 (Procedimento de Ensaio: Determinação de vitamina D por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), DAN, 2015) e os valores determinados são apresentados na Tabela 5.5.

$$FR = \frac{A_{P,D_3} \times C_{P,D_2}}{A_{P,D_2} \times C_{P,D_3}} \quad (5.1)$$

em que,

A_{P,D_2} – Área do pico do padrão de vitamina D₂;

A_{P,D_3} – Área do pico do padrão de vitamina D₃;

C_{P,D_2} – Teor de vitamina D₂ na solução padrão de trabalho, em µg/mL, obtido recorrendo à absorvância da solução padrão medida no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 265 nm;

C_{P,D_3} – Teor de vitamina D₃ na solução padrão de trabalho, em µg/mL, obtido recorrendo à absorvância da solução padrão medida no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 265 nm.

Tabela 5.5 Valores de área de pico e fator de resposta do padrão D₂+D₃ e da fração recolhida na parte preparativa

	Analito	Área do pico	Fator de resposta
Padrão D₂+D₃	D ₂	187638	1,3
	D ₃	290203	
Fração D da parte preparativa	D ₂	92645	1,3
	D ₃	142700	

Analisando a Tabela 5.5, os fatores de resposta são iguais. Como a vitamina D é determinada por padrão interno, isto indica que o cis-retinol não interfere com as vitaminas D₂ e D₃, sendo separado destas vitaminas na parte analítica ou afetando igualmente os dois analitos. Assim, as vitaminas A (13-cis-retinol e all-trans-retinol) e a vitamina E podem ser quantificadas pelo método de calibração externa e a vitamina D pelo método de padrão interno.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Com o objetivo de validar o método para as novas condições de saponificação e extração, foram avaliados alguns parâmetros de validação de acordo com o referido no capítulo 4.6.

► Precisão

Os coeficientes de variação da repetibilidade, CV_r , e os coeficientes de variação de precisão intermédia, CV_{Pi} , para as vitaminas A e E, foram calculados através das equações 3.3 e 3.5, respetivamente, usando a folha de cálculo apresentada no Anexo 7.

Nas Tabelas 5.6 e 5.7 apresentam-se os valores de CV_r e CV_{Pi} obtidos para as vitaminas A e E nas amostras compostas por ovos, salgadinhos e doces à base de leite e na amostra de creme vegetal para barrar com sabor a manteiga, respetivamente.

Tabela 5.6 Coeficientes de variação da repetibilidade e da precisão intermédia nas amostras compostas por ovos, salgadinhos e doces à base de leite

	Vitamina A		Vitamina E
	all- <i>trans</i> -Retinol	13- <i>cis</i> -Retinol	α -tocoferol
CV_r (%)	3,7	5,5	11
CV_{pi} (%)	14	13	16

Tabela 5.7 Coeficientes de variação da repetibilidade e da precisão intermédia na amostra de creme vegetal para barrar com sabor a manteiga

	Vitamina A		Vitamina E
	all- <i>trans</i> -Retinol	13- <i>cis</i> -Retinol	α -tocoferol
CV_r (%)	7,9	5,9	8,1
CV_{pi} (%)	21	14	13

Na Tabela 5.8 apresentam-se os dados de CV_r e CV_{Pi} obtidos em diferentes amostras indicados pelas normas EN 12822 e 12823-1.

Tabela 5.8 Dados de precisão fornecidos pelas normas EN 12822 e 12823-1 para diferentes amostras

Norma	Amostra	CVr (%)			CVpi (%)		
		Vit A		Vit E	Vit A		Vit E
		All-trans-retinol	13-cis-retinol		All-trans-retinol	13-cis-retinol	
EN 12822	MRC 122 ¹	-	-	4,1	-	-	4,0
	MRC 421 ²	-	-	4,0	-	-	7,0
	Leite em pó	-	-	3,0	-	-	12,8
	Aveia em pó	-	-	9,0	-	-	16,8
EN 12823-1	MRC 122 ¹	3,8	7,7	-	10,0	30,8	-
	MRC 421 ²	2,1	5,0	-	3,4	24,0	-

¹ MRC 122 – Margarina² MRC 421 – Leite em pó

Tendo como referência os dados apresentados na Tabela 5.8 e comparando com os dados obtidos nas Tabelas 5.6 e 5.7 é possível afirmar que o método apresenta repetibilidade e precisão intermédia adequadas para as matrizes estudadas.

► Exatidão

A exatidão deste método analítico foi avaliada através da quantificação da vitamina A e da vitamina E numa amostra de material de referência certificado (MRC), NIST 2383, que apresentava um teor de vitamina A de 0,08 mg/100 g e um teor de vitamina E de 2,5 mg/100 g.

A avaliação deste parâmetro de validação foi feita recorrendo ao cálculo do valor de *z-score*, segundo a equação 3.7. De acordo com esta equação, confirma-se a exatidão do método se o módulo do valor obtido for igual ou inferior a 2 (resultado satisfatório).

Na Tabela 5.9 apresentam-se os teores obtidos para as duas vitaminas no MRC e os respetivos valores de *z-score*. Os valores de *z-score* obtidos, tanto para a vitamina A como para a vitamina E, são inferiores a 2 (satisfatórios), podendo afirmar-se que o método é exato para a determinação das vitaminas A e E.

Tabela 5.9 Teores de vitamina A e de vitamina E e respetivos *z-score* para o MRC NIST 2383

Teor de vitamina A (mg/100 g)	z	Teor de vitamina E (mg/100 g)	z
0,061	0,90	2,9	0,86

Os resultados de validação obtidos para as vitaminas A e E, utilizando o método desenvolvido, são indicativos de que é possível determinar estes analitos através deste método. Eventualmente será necessário estudar mais amostras de natureza diferente para obter uma validação mais completa. Será também necessário fazer ensaios de exatidão com materiais de referência certificados que contenham simultaneamente as vitaminas A, E e D.

5.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DO PROJETO *TDS EXPOSURE*

No âmbito do projeto TDS Exposure foram analisadas amostras de alimentos representativas do consumo da população portuguesa. No âmbito deste trabalho analisaram-se 50 amostras diferentes. À exceção das amostras em que a vitamina D já tinha sido previamente quantificada, as amostras analisadas neste trabalho foram preparadas e tratadas de acordo com o método otimizado neste trabalho (como referido ao longo do subcapítulo 4.1). Neste subcapítulo, todas as amostras foram analisadas pela técnica de HPLC segundo as novas condições cromatográficas desenvolvidas neste trabalho (referidas no ponto 4.1.10.1), ou seja, pelo método de determinação simultânea das vitaminas A, E e D (método AED). Alguns extratos de amostras analisadas de acordo com o método D foram injetados no sistema de HPLC para a determinação das vitaminas A e E de acordo com as condições cromatográficas do método AED. A grande maioria das amostras analisadas foram comparadas com os valores apresentados na Tabela de Composição de Alimentos (TCA) que se encontra disponível na Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar (PortFIR). Nos extratos das amostras preparadas de acordo com o método D que foram analisados, em algumas das amostras, as vitaminas A e E já tinham sido determinadas anteriormente no DAN, pelo que se fez uma comparação entre os dados obtidos neste trabalho e os dados obtidos anteriormente.

Como já foi mencionado, algumas amostras já se encontravam preparadas e, por isso, de forma a que a exposição de resultados seja mais clara, este subcapítulo foi dividido em dois: amostras determinadas segundo o método AED para a determinação das vitaminas A e E e amostras previamente preparadas segundo o método D para a determinação das mesmas vitaminas. Os resultados obtidos foram agrupados de acordo com o sistema de classificação de alimentos FoodEx2 desenvolvido pela EFSA. As amostras analisadas correspondem a alimentos classificados em 6 dos 20 grupos de alimentos diferentes do sistema FoodEx2.

5.4.1 AMOSTRAS DETERMINADAS SEGUNDO O MÉTODO AED PARA A DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS A E E

Do **Grupo 5 – Pratos Compostos** foram analisadas 29 matrizes alimentares, das quais 11 correspondem a pratos à base de carne (almôndegas e francesinha, por exemplo), 6 de sopa (canja de galinha, por exemplo), 5 à base de peixe (bacalhau à brás e empadão de atum, por exemplo), 4 à base de arroz (arroz à valenciana, por exemplo), 1 à base de cereais (pizza) e 2 de salada (salada russa e salada de alface e tomate).

Os resultados obtidos para os pratos compostos à base de carne, do Grupo 5, apresentam-se na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 Teores de vitamina A e vitamina E das amostras do Grupo 5 – pratos compostos, à base de carne

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Almôndegas	6,5	(0,83)	7,1	0,73
Carne à bolonhesa¹	(3,8)	(1,7)	(5,1)	0,32
Cozido à portuguesa²	(3,1)	(0,85)	(3,8)	0,086
Dobrada	(0,80)	(0,23)	(0,97)	0,24
Empadão de carne	(4,5)	(1,3)	(5,5)	0,46
Feijoada e sopas de carne e feijão³	(0,50)	< LD	(0,50)	0,21
Francesinha	31	5,3	35	0,51
Hambúrguer⁴	(3,4)	(1,2)	(4,3)	0,26
Lasanha⁵	8,4	2,5	10	1,4
Rancho	(0,94)	< LD	(0,94)	0,50
Salgadinhos⁶	(2,2)	(0,94)	(2,9)	3,2

LD – Limite de deteção (all-trans-retinol = 0,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,18 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,0030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de deteção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 4,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 2,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

¹ Carne à bolonhesa, à jardineira, à alentejana

² Cozido à portuguesa e cozido à portuguesa com grão

³ Feijoada, sopa à lavrador, sopa da pedra, sopa de carne

⁴ Hambúrguer de peru, de porco, de vaca

⁵ Lasanha bolonhesa e vegetariana

⁶ Chamuça, croquete, empada de carne, folhado de carne, folhado de queijo e fiambre, peixinhos da horta, rissol de camarão, rissol de carne, rissol de pescada

Analisando os resultados obtidos, verificou-se que, na maioria das amostras, os teores de vitamina A (cis- e trans-retinol) foram inferiores ao LQ correspondente, mas superiores ao respetivo LD, à exceção das amostras de rancho e de feijoada e sopas de carne e feijão, em que o cis-retinol se encontrou abaixo do LD (0,18 $\mu\text{g}/100\text{ g}$). Desta

forma, apenas as amostras compostas por almôndegas, francesinha e lasanha se encontraram acima do LQ de trans-retinol (4,6 µg/100 g) e cis-retinol (2,3 µg/100 g). No caso da vitamina E, todas as amostras apresentaram teores acima do LQ (0,030 mg/100 g).

Para a vitamina A, a amostra que apresentou maior teor foi a amostra de francesinha e no caso da vitamina E, a amostra de salgadinhos.

Na Tabela 5.11 apresentam-se os resultados obtidos para os pratos de sopa pertencentes ao Grupo 5.

Tabela 5.11 Teores de vitamina A e vitamina E das amostras do Grupo 5 – pratos compostos por sopa

Amostra	Teor de vitamina A (µg/100 g)			Teor de vitamina E (mg/100 g)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α-tocoferol
Caldo verde	(0,034)	(0,049)	(0,071)	0,15
Canja de galinha	(3,0)	(0,81)	(3,6)	0,076
Creme de marisco e peixe¹	(0,40)	(0,18)	(0,53)	0,34
Sopas de legumes²	(0,10)	< LD	(0,10)	0,29
Sopas de legumes e leguminosas³	< LD	< LD	< LD	0,38
Sopa de tomate	(2,3)	(0,73)	(2,8)	1,5

LD – Limite de detecção (all-trans-retinol = 0,6 µg/100 g; 13-cis-retinol = 0,18 µg/100 g; α-tocoferol = 0,0030 mg/100 g)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de detecção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 4,6 µg/100 g; 13-cis-retinol = 2,3 µg/100 g; α-tocoferol = 0,030 mg/100 g)

¹ Creme de camarão, creme de marisco, sopa de peixe

² Sopa de agrião, de cenouras, de espinafres, de feijão verde e vegetais

³ Sopa de couve e feijão, ervilhas, feijão, grão, grão com espinafres

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.11 não foi possível detetar a vitamina A na amostra de sopas de legumes e leguminosas, uma vez que os teores encontrados se encontravam abaixo dos LD correspondentes. Nas restantes amostras, embora se tenha conseguido detetar vitamina A, os teores foram inferiores aos LQ correspondentes. No caso da vitamina E, todas as amostras apresentaram teores superiores ao LQ (0,030 mg/100 g).

Na Tabela 5.12 apresentam-se os resultados obtidos para os pratos à base de peixe pertencentes ao Grupo 5.

Tabela 5.12 Teores de vitamina A e vitamina E das amostras do Grupo 5 – pratos compostos, à base de peixe

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Açordas e migas¹	(1,4)	(0,35)	(1,7)	1,5
Bacalhau à Brás e à Gomes de Sá	64	6,0	69	0,44
Bacalhau com natas e desfeita de bacalhau	22	3,9	25	0,65
Caldeirada de peixe²	57	7,1	62	2,5
Empadão de peixe³	7,1	2,9	9,3	1,4

LD – Limite de deteção (all-trans-retinol = 0,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,18 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,0030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de deteção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 4,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 2,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

¹ Açorda à alentejana, de bacalhau, de marisco, migas

² Caldeirada de bacalhau, de enguias, peixe e safio

³ Empadão de atum, de bacalhau, de peixe

De acordo com os resultados da Tabela 5.12 foi possível detetar todos os analitos em estudo, porém, para a vitamina A a amostra de açordas e migas apresentou teores abaixo dos respetivos LQ. As amostras constituídas por bacalhau à Brás e à Gomes de Sá e caldeirada de peixe foram as que apresentaram maiores teores de vitamina A. No caso da vitamina E, a matriz alimentar composta por caldeirada de bacalhau foi a que apresentou o maior teor.

Na Tabela 5.13 apresentam-se os dados obtidos para os pratos à base de arroz do Grupo 5 do sistema FoodEx2.

Tabela 5.13 Teores de vitamina A e vitamina E das amostras do Grupo 5 – pratos compostos, à base de arroz

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Arroz à valenciana	5,1	(1,5)	6,2	0,64
Arroz de frango e de pato	(1,4)	(0,43)	(1,7)	0,24
Arroz de marisco¹	10,0	(1,4)	11	0,38
Arroz de vegetais²	< LD	< LD	< LD	1,6

LD – Limite de deteção (all-trans-retinol = 0,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,18 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,0030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de deteção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 4,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 2,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

¹ Arroz de gambas, de lapas, de marisco

² Arroz de cenoura, de ervilhas, de tomate, de feijão e vegetais

De acordo com a Tabela 5.13, pelo facto de os teores encontrados serem inferiores aos correspondentes LD, não foi possível detetar vitamina A em arroz de vegetais, no entanto foi a amostra de arroz que apresentou um teor de vitamina E mais elevado. Das restantes amostras, apenas a amostra de arroz de frango e de pato apresentou teores abaixo dos respetivos LQ. No caso da vitamina E, todas as amostras apresentaram teores superiores ao LQ.

Na Tabela 5.14 apresentam-se os dados obtidos para os pratos à base de produtos hortícolas e à base de cereais, pertencentes ao Grupo 5 de pratos compostos.

Tabela 5.14 Teores de vitamina A e vitamina E das amostras do Grupo 5 – pratos compostos, à base de produtos hortícolas e cereais

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Pizzas¹	21	5,0	25	1,9
Salada de alface e tomate	< LD	< LD	< LD	0,54
Salada russa	(2,2)	(0,38)	(2,5)	2,0

LD – Limite de deteção (all-trans-retinol = 0,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,18 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,0030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de deteção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 4,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 2,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

¹ Pizza de chouriço, fiambre, camarão, pepperoni, fiambre e ananás, frango e fiambre, presunto, alcachofras e cogumelos

Analisando a Tabela 5.14, na salada de alface e tomate não foi detetada vitamina A, estando o teor tanto de cis- como de trans-retinol abaixo dos respetivos LD. Os restantes analitos conseguiram ser detetados, mas, no caso da salada russa, os teores de vitamina A encontrados estavam abaixo dos LQ correspondentes. Foi possível quantificar vitamina E em todas as amostras, sendo a salada russa a que apresentou o maior teor desta vitamina.

Do **Grupo 6 – Ovos e produtos à base de ovos** foi analisada uma amostra composta por ovos, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 Teores de vitamina A e E das amostras do Grupo 6 – Ovos e produtos à base de ovos

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Ovos	51	11	59	2,8

Como seria de esperar, os resultados obtidos (Tabela 5.15) mostraram elevados teores de vitamina A e de vitamina E nos ovos.

As matrizes alimentares analisadas do **Grupo 13 – Carne e produtos à base de carne** foram produtos de carne (peru) e produtos de charcutaria (fiambre, por exemplo). Os resultados obtidos para estas amostras compostas encontram-se na Tabela 5.16.

Tabela 5.16 Teores de vitamina A e E das amostras do Grupo 13 – Carne e produtos à base de carne

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Fiambre	(0,24)	(0,092)	(0,31)	0,15
Peru	< LD	< LD	< LD	0,076
Presunto e bacon	< LD	< LD	< LD	0,038

LD – Limite de detecção (all-trans-retinol = 0,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,18 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,0030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de detecção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 4,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 2,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

Analisando a Tabela 5.16, a vitamina E foi detetada nas três amostras, tendo-se conseguido obter teores superiores ao LQ. A vitamina A, no entanto, apenas se conseguiu detetar na amostra de fiambre, estando, mesmo assim, os teores de cis- e trans-retinol abaixo dos respetivos LQ.

Por fim, do **Grupo 14 – Leite e produtos lácteos** foi analisada uma matriz alimentar constituída por leite creme e pudim flan. Os resultados obtidos para esta matriz alimentar encontram-se na Tabela 5.17.

Tabela 5.17 Teores de Vitamina A e E das amostras do Grupo 14 – Leite e produtos lácteos

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Leite creme e pudim flan	42	9,3	49	0,41

LD – Limite de detecção (all-trans-retinol = 0,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,18 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,0030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de detecção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 4,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 2,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,030 $\text{mg}/100\text{ g}$)

Tanto no leite creme como no pudim flan o ingrediente maioritário é o leite, que tem 0,03 $\text{mg}/100\text{ g}$ de vitamina E e 20 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de vitamina A (TCA, 2017). No entanto ambos os doces levam bastantes ovos na sua preparação e estes têm teores de vitaminas A e E muito mais elevados, havendo um efeito de diluição por parte do leite.

Deste modo, analisando a Tabela 5.17, os valores obtidos foram os esperados, estando concordantes com os teores dos ingredientes leite e ovos.

5.4.2 EXTRATOS DAS AMOSTRAS OBTIDOS DE ACORDO COM O MÉTODO D PARA A DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS A E E

As amostras correspondentes a este subcapítulo foram saponificadas e extraídas de acordo com o método D por outro colaborador, sem o intuito de determinar as vitaminas A e E. Aproveitando esta oportunidade, foram utilizados para testar as concentrações/condições cromatográficas do método AED.

Do **Grupo 5 – Pratos Compostos** foi analisada uma matriz alimentar constituída por puré de batata, apresentando-se os dados obtidos para esta amostra na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 Teores de Vitamina A e E para a amostra de puré de batata do Grupo 5 – pratos compostos

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Puré de batata	6,4	0,85	7,0	1,4

LD – Limite de Detecção (all-trans-retinol = 0,48 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,14 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,0012 $\text{mg}/100\text{ g}$)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de deteção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 3,7 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 1,8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,011 $\text{mg}/100\text{ g}$)

Analisando os resultados obtidos na Tabela 5.18, verifica-se que foi possível quantificar tanto a vitamina A como a vitamina E, sendo os valores obtidos superiores aos respetivos LQ.

Do **Grupo 7 – Peixe, produtos de pesca, anfíbios, répteis e invertebrados** foram analisadas 9 matrizes alimentares, sendo os valores obtidos apresentados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19 Teores de Vitamina A e E das amostras do Grupo 7 – peixe, produtos de pesca, anfíbios, répteis e invertebrados

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Atum fresco	9,3	(1,0)	10	0,33
Bacalhau	(1,2)	(0,47)	(1,5)	0,40
Camarão	(0,89)	(0,074)	(0,95)	3,5
Caracóis	(1,0)	(0,31)	(1,3)	0,37
Carapau	< LD	< LD	< LD	0,093
Conquilhas e ameijoas	(0,32)	(0,058)	(0,37)	0,028
Lulas¹	(2,1)	(0,46)	(2,5)	18
Peixes vermelhos²	(1,1)	(0,67)	(1,6)	2,0
Polvo	(2,2)	(0,33)	(2,5)	4,7

LD – Limite de Detecção (all-trans-retinol = 0,48 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,14 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,0012 $\text{mg}/100\text{ g}$)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de deteção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 3,7 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 1,8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,011 $\text{mg}/100\text{ g}$)

¹ Lulas, espetada de lulas

² Abrótea, cantarilho, peixe vermelho

De acordo com a Tabela 5.19, tanto o teor de cis- como o de trans-retinol estão abaixo dos respectivos LQ em todas as amostras analisadas, à exceção do atum fresco, sendo que na amostra de carapau não foi sequer possível detetar a vitamina A, estando ambos os analitos abaixo dos respectivos LD. No caso da vitamina E, foi possível detetar e quantificar esta vitamina em todas as amostras, estando os teores obtidos acima do LQ. As lulas apresentaram elevados teores de vitamina E, enquanto que na vitamina A foi o atum que mostrou o maior teor.

Os valores obtidos para as amostras de camarão, conquilhas e ameijoas, polvo e caracóis, são apresentados apenas a título indicativo, uma vez que os valores de vitamina E foram obtidos por extrapolação da curva de calibração. Estas amostras foram as primeiras a ser analisadas pelo método AED, não tendo sido possível fazer a diluição adequada por falta de extrato para realizar as diluições. Por outro lado, estes extratos foram obtidos a partir de amostras com elevada massa para a determinação da vitamina E, apresentando-se demasiado concentradas.

As matrizes alimentares analisadas pertencentes ao **Grupo 11 – Cereais e produtos à base de cereais** foram produtos de pastelaria e padaria. Na Tabela 5.20 estão identificadas as amostras e os seus respetivos teores de vitaminas A e E.

Tabela 5.20 Teores de vitamina A e E das amostras do Grupo 11 – Cereais e produtos à base de cereais

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Croissants	8,0	0,96	8,7	1,6
Pão de leite	5,3	(0,57)	5,7	2,6
Pastel de nata	11	2,7	13	1,3
Queques	4,5	(0,36)	4,8	2,8

LD – Limite de deteção (all-trans-retinol = 0,19 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,058 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,00050 $\text{mg}/100\text{ g}$)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de deteção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 1,5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,72 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,0045 $\text{mg}/100\text{ g}$)

Pela Tabela 5.20 pode ver-se que as amostras de pastelaria/padaria têm elevados teores de vitamina E, o que está relacionado com os elevados teores de gordura que apresentam. O pastel de nata foi o que teve o maior teor de vitamina A, o que pode resultar dos ingredientes gemas de ovos e nata que são usados na preparação deste produto. Os queques foram os que tiveram a maior quantidade de vitamina E.

As matrizes alimentares analisadas pertencentes ao **Grupo 13 – Carne e produtos à base de carne** foram produtos de carne (frango) e produtos de charcutaria (enchidos). Os resultados obtidos para estas amostras encontram-se na Tabela 5.21.

Tabela 5.21 Teores de vitamina A e E das amostras do Grupo 13 – Carne e produtos à base de carne

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
	all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Enchidos¹	< LD	< LD	< LD	0,064
Frango	3,2	(0,62)	3,7	0,55

LD – Limite de deteção (all-trans-retinol = 0,19 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,058 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,00050 $\text{mg}/100\text{ g}$)

() – Teor abaixo do limite de quantificação e acima do limite de deteção

LQ – Limite de quantificação (all-trans-retinol = 1,5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 13-cis-retinol = 0,72 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; α -tocoferol = 0,0045 $\text{mg}/100\text{ g}$)

¹ Chouriço, alheira, paio, chourição

Conforme a Tabela 5.21, foi possível quantificar a vitamina E tanto nos enchidos como no frango. No entanto, no caso da vitamina A, nos enchidos não foi possível quantificar nem detetar o cis- ou o trans-retinol, por os valores se encontrarem abaixo dos respetivos LD.

Por forma a ter-se um meio de comparação, na Tabela 5.22 apresentam-se os teores de vitamina A e vitamina E que se obtiveram em algumas das amostras apresentadas neste subcapítulo e os teores que se obtiveram anteriormente no DAN nessas mesmas amostras.

Tabela 5.22 Teores de vitamina A e vitamina E de alguns dos extratos de amostras determinados pelo método AED obtidos neste trabalho e pelo DAN

Amostra		Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)
		all-trans-retinol	13-cis-retinol	Vit A total	α -tocoferol
Bacalhau	Este trabalho	1,2	0,47	(1,5)	0,40
	DAN	ND	ND	ND	0,20
Camarão	Este trabalho	0,89	0,074	(0,95)	3,5
	DAN	ND	ND	ND	ND
Pão de leite	Este trabalho	5,3	0,57	5,7	2,6
	DAN	9,9	0	9,9	2,4
Queques	Este trabalho	4,5	0,36	4,8	2,8
	DAN	5,8	0	5,8	2,4

ND – Não detetado (inferior aos limites de deteção)

Analisando a Tabela 5.22 é possível verificar que os teores tanto de vitamina A como de vitamina E obtidos na amostra de queques foram idênticos. Na amostra de pão de leite os teores de vitamina E obtidos também foram idênticos aos obtidos pelo DAN mas o teor de vitamina A encontrou-se abaixo do teor obtido pelo DAN. No caso das amostras de bacalhau e camarão, ao contrário dos dados fornecidos pelo DAN, neste trabalho foi possível detetar as vitaminas nestas amostras, no entanto, conforme apresentado na Tabela 5.19, os teores obtidos encontraram-se abaixo dos LQ correspondentes. O facto de neste trabalho se ter conseguido detetar as vitaminas A e E nestas duas últimas amostras e no DAN não pode ser justificado pelas diferentes quantidades de massa utilizadas, pois no DAN as massas utilizadas foram inferiores às utilizadas nestas duas amostras.

Uma vez que a maior parte das amostras analisadas, tanto no subcapítulo 5.4.1 como no subcapítulo 5.4.2, se tratam de pratos típicos portugueses, há uma grande escassez a nível de resultados determinados por outros autores, pelo que, para completar a análise dos resultados obtidos neste trabalho, foi realizada uma comparação com dados fornecidos pela Tabela da Composição de Alimentos (TCA) que se encontra disponível na Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar (PortFIR).

Devido à extensão dos dados, dividiram-se novamente os mesmos de acordo com o sistema de classificação de alimentos FoodEx2.

Nas Tabelas 5.23 a 5.26 encontram-se os dados para o **Grupo 5 – Pratos compostos**.

Tabela 5.23 Teores de vitamina A e vitamina E em pratos compostos à base de carne obtidos neste trabalho e tabelados na TCA

Amostras	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)	
	Este trabalho	TCA	Este trabalho	TCA
Almôndegas	7,1	37 - 46	0,73	0,34 – 0,60
Carne à bolonhesa¹	5,1	0,67 - 75	0,32	0,19 – 1,17
Cozido à portuguesa²	3,8	0 – 0,33	0,086	0,14 – 0,75
Empadão de carne	5,5	18 - 38	0,46	0,25 – 0,30
Feijoada e sopas de carne e feijão³	0,50	0 - 27	0,21	0,12 – 0,93
Francesinha	35	21	0,51	0,26
Hamburger	4,3	0 – 0,50	0,26	0,1 – 0,37
Lasanha⁴	10	67	1,4	0,25
Rancho	0,94	0 – 0,67	0,50	0,16 – 0,48
Salgadinhos⁵	2,9	8,8 - 175	3,2	0,42 – 5,2

¹ Carne à bolonhesa, à jardineira, à alentejana, rojões

² Cozido à portuguesa e cozido à portuguesa com grão

³ Feijoada, sopa à lavrador, sopa de carne

⁴ Lasanha bolonhesa

⁵ Chamuça, croquete, empada de carne, folhado de carne, peixinhos da horta, rissol de camarão, rissol de carne, rissol de pescada

Relativamente à vitamina A, das amostras apresentadas na Tabela 5.23, apenas a carne à bolonhesa, a feijoada e sopas de carne e feijão, a francesinha e o rancho apresentam dados concordantes com os dados indicados pela TCA. As restantes amostras ou estão muito abaixo ou muito acima dos valores indicados pela TCA.

No caso da vitamina E, à exceção das amostras de cozido à portuguesa e de lasanha, os teores obtidos nas amostras analisadas encontram-se concordantes com os valores fornecidos pela TCA. Os teores destas exceções para a vitamina E encontram-se muito discrepantes dos valores indicados pela TCA.

Tabela 5.24 Teores de vitamina A e vitamina E em pratos compostos por sopa e salada, à base de cereais e no puré de batata obtidos neste trabalho e tabelados na TCA

Amostras	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)	
	Este trabalho	TCA	Este trabalho	TCA
Caldo verde	0,071	0,17	0,15	0,22
Canja de galinha	3,6	1,0 – 3,0	0,076	0,03 – 0,09
Creme de marisco e peixe¹	0,53	0,33 – 25	0,34	0,24 – 0,47
Salada de alface e tomate	ND	0,33	0,54	1,14
Salada russa	2,5	7,8	2,0	1,38
Sopas de legumes²	0,10	0 – 14	0,34	0,14 – 1,49
Sopas de legumes e leguminosas³	ND	0 – 0,50	0,38	0,28 – 0,82
Sopa de tomate	2,8	7,2	1,5	0,46
Puré de batata	7,0	36	1,4	0,18
Pizzas⁴	25	29 - 53	1,9	0,38 – 4,57

ND – Não detetado (inferior aos limites de deteção)

¹ Creme de camarão, sopa de peixe

² Sopa de agrião, de cenouras, de espinafres, de feijão verde e vegetais

³ Sopa de ervilhas, feijão, grão, grão com espinafres

⁴ Pizza de fiambre, fiambre e ananás

Das amostras apresentadas na Tabela 5.24, os teores de vitamina A apresentados não se encontram na sua maioria concordantes com os indicados pela TCA. Na canja de galinha e nas pizzas os teores obtidos são bastante próximos dos indicados pela TCA e no creme de marisco e sopas de legumes os teores obtidos encontram-se dentro dos intervalos de valores fornecidos pela TCA. Nas restantes os teores de vitamina A são inferiores aos da TCA.

Em relação à vitamina E, a salada de alface e tomate, a sopa de tomate e o puré de batata são as amostras com teores mais dispareos dos teores fornecidos pela TCA. Nas restantes amostras os teores de vitamina E encontram-se ou dentro do intervalo de valores indicado na TCA ou muito próximos destes.

Tabela 5.25 Teores de vitamina A e vitamina E em pratos compostos à base de peixe obtidos neste trabalho e tabelados na TCA

Amostras	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)	
	Este trabalho	TCA	Este trabalho	TCA
Açordas¹	1,7	7,3 - 29	1,5	0,23 – 0,91
Bacalhau à Brás e Bacalhau à Gomes de Sá	69	14 - 38	0,44	0,88 – 4,37
Bacalhau com natas e desfeita de bacalhau	25	17 - 130	0,65	0,29 – 1,4
Caldeirada de peixe²	62	1,5 - 435	2,5	0,44 – 1,84
Empadão de peixe³	9,3	39 - 86	1,4	0,2 – 0,78

¹ Açorda à alentejana, de bacalhau, de marisco

² Caldeirada de bacalhau, de enguias, peixe e safio

³ Empadão de atum, de bacalhau, de peixe

Conforme a Tabela 5.25, apenas as amostras de bacalhau com natas e desfeita de bacalhau e a caldeirada de peixe apresentam teores de vitamina A dentro do intervalo de valores indicado pela TCA. As restantes amostras apresentam valores muito dispare, estando muito superiores ou muito inferiores aos valores indicados pela TCA.

No caso da vitamina E, apenas o teor da matriz alimentar composta por bacalhau com natas e desfeita de bacalhau está concordante com o intervalo de valores dado pela TCA. Os restantes teores de vitamina E ou são inferiores ou superiores aos intervalos de valores fornecidos na TCA.

Tabela 5.26 Teores de vitamina A e vitamina E em pratos compostos à base de arroz obtidos neste trabalho e tabelados na TCA

Amostras	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)	
	Este trabalho	TCA	Este trabalho	TCA
Arroz à valenciana	6,2	42	0,64	0,66
Arroz de frango e pato	1,7	4,0 - 15	0,24	0,1 – 0,2
Arroz de marisco¹	11	0 - 60	0,38	0,43 – 0,88
Arroz de vegetais²	ND	0 - 21	1,6	0,05 – 1,35

ND – Não detetado (inferior aos limites de deteção)

¹ Arroz de gambas, de marisco

² Arroz de cenoura, de ervilhas, de tomate, de feijão

Pela Tabela 5.26, as amostras de arroz em que se conseguiu detetar a vitamina A, apresentam valores muito inferiores aos valores fornecidos pela TCA, à exceção do arroz de marisco em que se obteve um teor concordante com o intervalo fornecido pela TCA. Já para a vitamina E, os teores obtidos em todas as amostras de arroz estão concordantes com os valores da TCA.

Na Tabela 5.27 são apresentados os dados do **Grupo 6 – Ovos e produtos à base de ovos**.

Tabela 5.27 Teores de vitamina A e vitamina E nos ovos obtidos neste trabalho e tabelados na TCA

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)	
	Este trabalho	TCA	Este trabalho	TCA
Ovos	59	170 - 228	2,8	2,3 – 2,95

De acordo com a Tabela 5.27, na matriz alimentar composta por ovos, o teor de vitamina A encontra-se muito abaixo do valor indicado pela TCA enquanto o teor de vitamina E se encontra dentro do intervalo de dados fornecido pela TCA. A discrepância no teor de vitamina A pode estar relacionado com uma alteração na alimentação das galinhas e/ou de raças poedeiras utilizadas.

Na Tabela 5.28 estão indicados os dados do **Grupo 7 – Peixe, produtos de pesca, anfíbios, répteis e invertebrados**.

Tabela 5.28 Teores de vitamina A e vitamina E em peixes e produtos de pesca, anfíbios, répteis e invertebrados obtidos neste trabalho e tabelados na TCA

Amostras	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)	
	Este trabalho	TCA	Este trabalho	TCA
Abrótea¹	1,6	1,0 – 18	2,0	0,04 – 1,89
Atum fresco	10	12	0,33	0,8
Bacalhau	1,5	1,0 – 4,0	0,40	0,28 – 0,34
Camarão	0,95	2,0	3,5	0,82 – 0,9
Carapau	ND	8 - 21	0,093	0,18 – 0,79
Polvo	2,5	7,0	4,7	2,1

ND – Não detetado (inferior aos limites de deteção)

¹ Abrótea, cantarilho, peixe vermelho

Analisando a Tabela 5.28, relativamente à vitamina A, à exceção do camarão e do polvo, nas diferentes matrizes compostas obtiveram-se valores concordantes com os intervalos de dados fornecidos pela TCA. Relativamente à vitamina E, à exceção da abrótea e do bacalhau, em que os valores são concordantes, os valores obtidos encontram-se abaixo ou acima dos valores indicados pela TCA.

Na Tabela 5.29 apresentam-se os dados do **Grupo 11 – Cereais e produtos à base de cereais**.

Tabela 5.29 Teores de vitamina A e vitamina E em produtos à base de cereais obtidos neste trabalho e tabelados na TCA

Amostras	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)	
	Este trabalho	TCA	Este trabalho	TCA
Croissants	8,7	21	1,6	0,06
Pão de leite	5,7	82	2,6	0,19
Pastel de nata	13	97	1,3	0,4
Queques	4,8	168	2,8	1,1

Observando a Tabela 5.29, tanto para a vitamina A como para a vitamina E, os teores obtidos no decorrer deste trabalho em comparação com os dados fornecidos pela TCA foram todos diferentes e discrepantes. Na vitamina E os valores foram mais elevados e na vitamina A foram bastante inferiores.

Os dados do **Grupo 13 – Carne e produtos à base de carne** encontram-se apresentados na Tabela 5.30.

Tabela 5.30 Teores de vitamina A e vitamina E em produtos à base de carne obtidos neste trabalho e tabelados na TCA

Amostras	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)	
	Este trabalho	TCA	Este trabalho	TCA
Enchidos¹	ND	0 - 10	0,064	0,2 – 0,4
Fiambre	0,31	0	0,15	0,16
Frango	3,7	0 – 39	0,55	0,1 – 0,78
Peru	ND	10 - 32	0,076	0 – 0,31
Presunto e bacon	ND	0	0,038	0,08 – 0,2

ND – Não detetado (inferior aos limites de deteção)

¹ Chouriço, alheira, paio

Conforme a Tabela 5.30, nas amostras em que foi possível detetar a vitamina A, a amostra de frango encontra-se dentro do intervalo de valores dado pela TCA. A TCA indica que a vitamina A está ausente no fiambre, no entanto neste trabalho, embora em pequena quantidade, foi detetada vitamina A nesta amostra. No que diz respeito à vitamina E, o teor no fiambre é idêntico ao da TCA e o de frango e peru estão compreendidos pelos intervalos de dados da TCA. Na matriz de enchidos e na matriz de presunto e bacon, os teores de vitamina E são inferiores aos teores fornecidos pela TCA.

Por fim, na Tabela 5.31, apresentam-se os dados referentes ao **Grupo 14 – Leite e produtos lácteos**.

Tabela 5.31 Teores de vitamina A e vitamina E em produtos lácteos obtidos neste trabalho e tabelados na TCA

Amostra	Teor de vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		Teor de vitamina E ($\text{mg}/100\text{ g}$)	
	Este trabalho	TCA	Este trabalho	TCA
Leite creme e pudim flan	49	75 - 104	0,41	0,79 – 0,82

Como se pode ver pela Tabela 5.31, os valores de vitamina A e E apresentados pela matriz composta por leite creme e pudim flan são inferiores aos dados fornecidos pela TCA.

6

CONCLUSÕES

O método de cromatografia líquida de alta resolução utilizado neste trabalho revelou ser adequado para a quantificação de diferentes matrizes alimentares estudadas.

O procedimento de ensaio para a determinação simultânea de vitamina A e vitamina E, atualmente em utilização no laboratório do DAN, foi otimizado nomeadamente através da diminuição do tempo de saponificação, da utilização de um solvente de saponificação mais amigo do ambiente e da diminuição do volume total de extração. Mantendo como base as normas EN 12822 e 12823-1, o novo procedimento permitiu reduzir significativamente o tempo de execução e o consumo de reagentes utilizados durante cada ensaio, com vantagens a nível económico e ambiental.

Com a otimização do processo de saponificação conseguiu reduzir-se o tempo de saponificação em 25% (de 60 para 45 minutos) e com a otimização do processo de extração foi possível reduzir o consumo de reagentes de extração (mistura de éter de petróleo e éter etílico na proporção de 8:2, v:v) em 63% (de 400 para 150 mL).

As alterações introduzidas foram validadas através do estudo de diferentes parâmetros, nomeadamente a precisão intermédia e a exatidão. Nas amostras de cremes vegetais para barrar, as estimativas de repetibilidade e precisão intermédia obtidas para as vitaminas A e E, respetivamente, conduziram aos coeficientes de variação da repetibilidade (CV_r) de 7,9% e 8,1%, e aos coeficientes de variação da precisão intermédia (CV_{pi}) de 21% e 13% e nas amostras compostas por ovos, salgadinhos e doces à base de leite, coeficientes de variação de 3,7% e 11% para a repetibilidade e de 14% e 16% para a precisão intermédia. Os valores de z-score obtidos para as amostras de material de referência e material de referência certificado foram inferiores a 2, ou seja, foram aceitáveis.

Estes resultados indicam, assim, que os ensaios de otimização permitiram quantificar as vitaminas A e E nas matrizes alimentares com níveis de precisão de acordo com os obtidos na metodologia anterior e com exatidão aceitável.

As alterações realizadas nas condições cromatográficas do mesmo procedimento de ensaio, permitiram o desenvolvimento de um novo método cromatográfico, capaz de determinar simultaneamente as vitaminas A, E e D. As vitaminas A e E pelo método do padrão externo, recorrendo a uma reta de calibração, e a vitamina D pelo método do padrão interno, recorrendo a dois sistemas de HPLC, um primeiro semi-preparativo para purificação e concentração e um segundo analítico para quantificação.

A vitamina E foi detetada em todas as amostras analisadas do projeto *TDS Exposure*. A determinação da vitamina A pelo método da determinação simultânea das vitaminas A, E e D, exige cuidados adicionais na recolha da fração contendo a vitamina D para a cromatografia analítica de forma a não recolher também a vitamina A. A determinação simultânea das três vitaminas, ou de vitamina D e uma das vitaminas A ou E, em amostras em que tal for necessário, constitui uma elevada poupança em termos de tempo de tratamento das amostras até obter as soluções amostras para injeção no sistema de HPLC e também de solventes orgânicos, o que é económica e ambientalmente significativo.

Os teores de vitamina A mais elevados obtidos nas amostras analisadas foram: lasanha (10 µg/100 g), atum fresco (10 µg/100 g), arroz de marisco (11 µg/100 g), pastel de nata (13 µg/100 g), bacalhau com natas e desfeita de bacalhau (25 µg/100 g), pizzas (25 µg/100 g), francesinha (35 µg/100 g), ovos (59 µg/100 g), caldeirada de peixe (62 µg/100 g), bacalhau à Brás e bacalhau à Gomes de Sá (69 µg/100 g), e leite creme e pudim flan (49 µg/100 g).

Os teores de vitamina E mais elevados obtidos nas amostras analisadas foram: pastel de nata (1,3 mg/100 g), lasanha (1,4 mg/100 g), empadão de peixe (1,4 mg/100 g), puré de batata (1,4 mg/100 g), sopa de tomate (1,5 mg/100 g), açordas e migas (1,5 mg/100 g), arroz de vegetais (1,6 mg/100 g), croissants (1,6 mg/100 g), pizzas (1,9 mg/100 g), salada russa (2,0 mg/100 g), abrótea (2,0 mg/100 g), caldeirada de peixe (2,5 mg/100 g), pão de leite (2,6 mg/100 g), ovos (2,8 mg/100 g), queques (2,8 mg/100 g), salgadinhos (3,2 mg/100 g), camarão (3,5 mg/100 g), polvo (4,7 mg/100 g) e lulas (18 mg/100 g).

As diferenças entre os dados analíticos obtidos neste trabalho nos extratos das amostras previamente preparadas de acordo com o Método D e os dados fornecidos pelo DAN podem dever-se ao facto de nas determinações identificadas pelo DAN se terem utilizado diferentes condições de análise, como por exemplo a utilização de quantidades de massa de amostras diferentes, conduzindo a limites de quantificação e deteção diferentes.

As diferenças encontradas entre os dados analíticos obtidos neste trabalho e os dados apresentados na Tabela da Composição de Alimentos (TCA) pode estar na utilização de diferentes receitas para a preparação dos diferentes componentes de uma determinada matriz, podendo existir diferenças mesmo de receita para receita, bastando o indivíduo que segue uma determinada receita não utilizar os mesmos ingredientes, isto é, por exemplo, utilizar manteiga em vez de margarina, no decorrer da preparação.

Estas diferenças evidenciam quer a importância dos ingredientes/receitas no teor de vitaminas do prato final consumido quer a importância das TCA acompanharem as evoluções dos consumos de alimentos pelas populações de forma a conterem dados atualizados sobre a composição de novos alimentos/hábitos alimentares. Só com estes dados atualizados será possível avaliar a ingestão de vitaminas pela população.

Os dados obtidos no presente trabalho são um contributo para a avaliação da ingestão das vitaminas A, E e D pela população portuguesa no âmbito do projeto *TDS Exposure*.

De acordo com a pesquisa bibliográfica efetuada, apesar do método de HPLC ser o mais utilizado na determinação destas vitaminas em alimentos, já estão a ser estudados e colocados em prática novos métodos de análise, como é o caso da UHPLC e da UPCC. Estas duas técnicas mostram ser bastante promissoras para a determinação dos analitos estudados neste trabalho, uma vez que permitem a redução da quantidade de solventes e do tempo necessário para realizar as análises, os principais problemas na utilização da técnica de HPLC para matrizes alimentares.

O presente trabalho foi alvo de apresentações sob a forma de painel, no Fórum de Engenharia Química e Biológica no ISEL, em Lisboa, e na 10ª Reunião Anual do PortFir no INSA, em Lisboa, sendo apresentados nos Anexos 8 e 9, respetivamente.

Após a otimização e validação de um método de HPLC para a determinação simultânea das vitaminas A, D e E e sua aplicação a amostras de pratos compostos sugerem-se algumas propostas de trabalho que podem ser desenvolvidas futuramente:

- ▶ Realização de ensaios de precisão utilizando outras matrizes com vitamina A e vitamina E, por forma a complementar os estudos de precisão para as vitaminas A e E;
- ▶ Aplicação das novas condições cromatográficas na determinação simultânea de vitamina A, vitamina E e vitamina D;
- ▶ Aplicação de outra técnica de análise para além do HPLC, como por exemplo UHPLC, com vista a reduzir a quantidade de solventes e assim diminuir o tempo de análise e o impacto ambiental;
- ▶ Avaliação da ingestão de vitamina A, vitamina E e vitamina D pelos portugueses tendo em consideração os consumos e os resultados analíticos obtidos.

Almeida, A. C. (2017) *Avaliação analítica do teor de carotenoides em produtos hortícolas e pratos compostos representativos do consumo da população portuguesa*. Tese de Mestrado. Lisboa: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL).

Alves, M; Bastos, M.; Leitão, F.; Marques, G.; Ribeiro, G; Carrilho, F. (2013) *Vitamina D - importância da avaliação laboratorial*. Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, vol. 8(1), p. 32-39. DOI: 10.1016/j.rpedm.2012.12.001

AOAC International. (2007) *Official methods of analysis* (18th ed., 2005). Atualmente através da revisão 2, 2007 (*Online*). Gaithersburg, MD.

Aqel, A.; Kareem, Y.; Al-Rifai, A.; Allothman, Z. A. (2014) *Vitamin Analysis in Food by UPLC-MS*. Em Naushad, Mu.; Khan, M. R. Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectroscopy: Evaluation and Applications in Food Analysis. Florida, USA: CRC Press. ISBN: 978-1-4665-9155-4

Arsenault, J. C.; McDonald, P. D. (2014) *Beginners Guide to Liquid Chromatography*. EUA: John Wiley & Sons. ISBN: 978-1-879732-02-5.

Ball, G. F. M. (2000) *The Fat-Soluble Vitamins*. Em Nollet, L. M. L. Food Analysis by HPLC (2nd edition). New York, USA: Marcel Dekker. ISBN: 0-8247-8460-X.

Ball, G. F. M. (2004) *Vitamins: Their Role in the Human Body*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. ISBN: 0-632-06478-1.

Balogh, M. P. (2009) *The Mass Spectrometry Primer*. Milford, USA: Waters Corporation. ISBN: 1-879732-04-1

Belitz, H.-D.; Grosch, W; Schieberle, P. (2009) *Food Chemistry*. Berlin, NL: Springer. ISBN: 978-3-540-69933-0.

Berg, H., Turner, C.; Dahlberg L.; Mathiasson, L. (2000) *Determination of food constituents based on SFE: applications to vitamins A and E in meat and milk*. Journal of biochemical and biophysical methods, vol 43, p. 391-401. DOI: 10.1016/S0165-022X(00)00063-4

Berger, S. (2013). *Kazimierz (Casimir) Funk – Pioneer in Vitaminology – 101 Anniversary of His Discovery – Special Note*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, vol. 63, p. 201-205. DOI:10.2478/v10222-012-0100-6

CE, Comissão Europeia. (2012) Documento de Orientação para a Rotulagem Nutricional. Portugal: Comissão Europeia, Direção-Geral da Saúde e dos Consumidores. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/labelling_legislation_en

Chauveau-Duriot, B.; Doreau, M.; Nozière, P.; Graulet, B. (2010) *Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: Validation of a novel UPLC method*. Analytical and bioanalytical chemistry, vol. 397, p. 777-790. DOI: 10.1007/s00216-010-3594-y.

Chen, S.; Yu, H.; Kao, J.; Yang, C.; Chianga, S.; et al. (2015) Consumption of vitamin D2 enhanced mushrooms is associated with improved bone health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 26, p. 696–703.

Chirkin, V. A.; Karpov, S. I.; Selemenev, V. F.; Shumskiy, N. I. (2013) *Determination of Fat-Soluble Vitamins in Foods, Vitamin and Mineral Formulations, Feed Premixes, and Blood Serum by Reversed-Phase HPLC*. *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 68, p. 748-753. DOI: 10.1134/S1061934813080042.

Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. (1997) *Introdução a métodos cromatográficos* (7ª edição). São Paulo, Brasil: Editora da UNICAMP. ISBN: 85-268-0164-3.

Combs, G. F. (2008) *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. (3th edition). USA: Elsevier Academic Press. ISBN: 0-12-802965-7.

Costa-Félix, R. P. B.; Bernardes, A. (2017) *Metrologia: Fundamentos* (Volume 1). Rio de Janeiro, Brasil: Brasport. ISBN: 978-85-7452-834-2.

DAN, Departamento de Alimentação e Nutrição. (2014) *Procedimento de Ensaio: Determinação de vitaminas A e E por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)*. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP.

DAN, Departamento de Alimentação e Nutrição. (2015) *Procedimento de Ensaio: Determinação de vitamina D por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)*. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP.

Degani, A. L. G.; Cass, Q. B.; Vieira, P. C. (1998) *Cromatografia: um breve ensaio*. *Revista Química Nova na Escola*, nº7, p. 21-25.

Dias, M. G.; Vasco, E.; Pité, M.; Oliveira, L. (2015) *Estudo de dieta total piloto para avaliação da ingestão de nutrientes e da exposição a contaminantes: amostragem*. Boletim Epidemiológico Observações, vol. 4, nº especial 5, p. 7-9. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.18/3008>

EFSA, European Food Safety Authority, Scientific Committee on Food. (2006) Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Mineral. ISBN: 92-9199-014-0

Eitenmiller, R. R.; Ye, L.; Landen Jr., W. O. (2008) *Vitamin analysis for the health and food sciences*. Florida, USA: CRC Press. ISBN: 978-0-8493-9771-4.

EN 12821:2009. Foodstuffs – Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography - Measurement of cholecalciferol (D3) or ergocalciferol (D2). CEN, 2009.

EN 12822:2014. Foodstuffs – Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography – Measurement of α -, β -, γ - and δ -tocopherol. CEN, 2014.

EN 12823-1:2014. Foodstuffs – Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography – Part 1: Measurement of all-E-retinol and 13-Z-retinol. CEN, 2014.

EN ISO/IEC 17025:2005(E). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/IEC, 2005.

EN ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment – General requirements for proficiency testing. ISO/IEC, 2010.

Ettre, L. S. (1993) *Nomenclature for Chromatography (IUPAC Recommendations 1993)*. Pure and Applied. Chemistry, vol.65, No.4, p. 819-872. DOI: 10.1351/pac199365040819

Fanali, C.; D'Orazio, G.; Fanali, S.; Gentili, A. (2017) Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis. Trends in Analytical Chemistry (TrAC), vol. 87, p. 82-97, DOI: 10.1016/j.trac.2016.12.001

FNB, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (US). (2000) Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington (DC), USA: National Academic Press. ISBN: 0-309-06935-1.

FSE, Food Supplements Europe. (2013) Facts about vitamins, minerals and other food components with health effects. Bruxelas, Bélgica: Food Supplements Europe. ISBN: 9789081760225.

FSE, Food Supplements Europe. (2014) Setting of tolerances for nutrient values declared on a label – Guidance For Food Supplements. Bruxelas, Bélgica: Food Supplements Europe.

Gu, G.; Brosig, K.; Kennedy, L.; Oglobline, A.; Richardson, G.; Walker, B. (2014) *Simultaneous Analysis of Vitamin A and D3 in Vitamin Premixes and Concentrates by Convergence Chromatography/PDA Detection*. Em Acquity UPC2 Food Applications Notebook: Expanding analytical capability of food testing laboratories. Milford, USA: Waters Corporation. Waters Application Note No. 720005220en.

Holick, M. F.; Binkley, N. C.; Bischoff-Ferrari, H. A.; Gordon, C. M.; Hanley, D. A.; et al. (2011) *Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 96, p. 1911-1930. DOI: 10.1210/jc.2011-0385

INE, Instituto Nacional de Estatística. (2017). *Balança Alimentar Portuguesa 2012-2016*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I. P. ISBN: 978-989-25-0389-9.

INMETRO. (2011) DOQ-CGCRE-008: *Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos*. Revisão 5. Brasil: Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

ISO 8466-1:1990. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function. International Organization for Standardization, Genève, 1990.

ISO 8466-2:1993. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 2: Calibration strategy for non-linear second order calibration functions. International Organization for Standardization, Genève, 1993.

IUPAC-IUB. (1975) *Nomenclature Of Carotenoids (Rules approved 1974)*. Pure and Applied. Chemistry, vol.41, No.3, p. 405-431. DOI: 10.1351/pac197541030405

IUPAC-IUB. (1983) *Nomenclature Of Retinoids (Provisional)*. Pure and Applied Chemistry, vol.55, No.4, p. 721-726. DOI: 10.1351/pac198855040721

Jardim, I. C. S. F. (2010) *Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas*. Scientia Chromatographica, vol.2, N°1, p. 13-25. ISSN: 1984-4433

Jedlička, A.; Klimeš, J. (2004) *Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins in Different Matrices Using High-Performance Liquid Chromatography*. Chemical Papers, vol. 59, n°3, p. 202-222. ISSN: 1336-9075.

Johnson, L. E. (2017) *Vitamin D*. Acedido em 28 de Setembro de 2017. Disponível na página Web dos Manuais MSD: <http://www.msmanuals.com/professional/nutritional-disorders/vitamin-deficiency,-dependency,-and-toxicity/vitamin-d>

Karaźniewicz-Łada, M.; Główka, A. (2016) *A review of chromatographic methods for the determination of water- and fat-soluble vitamins in biological fluids*. Journal of Separation Science, vol. 39, p. 132–148.

Kienen, V.; Costa, W. F.; Visentainer, J. V.; Souza, N. E.; Oliveira, C. C. (2007) *Development of a green chromatographic method for determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplement*. Talanta, vol. 75, n° 1, p. 141-146. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.10.043

Kupiec, T. (2004) *Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography*. International Journal of Pharmaceutical Compounding, vol. 8, No. 3, p. 223-227.

Lanças, F. M. (2004) *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise* (6ª edição). São Carlos, Brasil: RiMa. ISBN: 85-7656-025-9

Luque-García, J. L.; Luque de Castro, M.D. (2001) *Extraction of fat-soluble vitamins*. Journal of chromatography A, vol. 935, p. 3-11. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01118-9

McCabe, D. R. (2014). *Beginners guide to UPLC: Ultra-Performance Liquid Chromatography*. USA: Waters Corporation. ISBN: 978-1-879732-07-0.

Momenbeik, F.; Bagheri, N. (2015) *Optimization of Fat-Soluble Vitamins Separations by Reversed-Phase Liquid Chromatography with the Use of Aliphatic Alcohols as Mobile*

Phase Additives. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, vol. 38, nº 14, p.1355-1360. DOI: 10.1080/10826076.2015.1048873

Moy, G. G. (2013) *Total Diet Studies - What They Are and Why They Are Important*. Em Moy, Gerald G. e Vannoort, Richard W. Total Diet Studies. New York, EUA: Springer. ISBN: 978-1-4419-7688-8.

Murphy, S. P.; Barr, S. I. (2007) *Dietary Reference Intakes for Vitamins*. Em Zempleni, J.; Bucker, R. B.; McCormick, D. B.; Suttie, J. W. Handbook of Vitamins (4th edition). Florida, USA: CRC Press. ISBN 0-8493-4022-5.

Nimalaratne, C.; Sun, C.; Wu, J.; Curtis, J. M.; Schieber, A. (2014) *Quantification of selected fat soluble vitamins and carotenoids in infant formula and dietary supplements using fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Food Research International, vol. 66, p. 69–77. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.08.034

Norman, A. W.; Henry, Helen L. (2007) *Vitamin D*. Em Zempleni, J.; Bucker, R. B.; McCormick, D. B.; Suttie, J. W. Handbook of Vitamins (4th edition). Florida, USA: CRC Press. ISBN 0-8493-4022-5.

OGC001:IPAC:2010. Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025. Portugal: Instituto Portugues de Acreditação (IPAC), 2010.

Pegg, R. B.; Landen, Jr., W. O.; Eitenmiller, Ronald R. (2010) *Vitamin Analysis*. Em Nielsen, S.S. Food Analysis (4th edition). New York, USA: Springer. ISBN: 978-1-4419-1477-4.

Plonka, J.; Toczek, A.; Tomczyk, V. (2012) *Multivitamin Analysis of Fruits, Fruit-Vegetable Juices, and Diet Supplements*. Food Analytical Methods, vol. 5, No. 5, p. 1167-1176. DOI: 10.1007/s12161-011-9349-3.

Póinhos, R.; Franchini, B.; Afonso, C.; Correia, F.; Teixeira, V. H.; et al. (2009) Alimentação e estilos de vida da população Portuguesa: metodologia e resultados preliminares. Alimentação Humana, vol. 15, nº 3, pp. 43-60. Disponível em: <http://www.spcna.pt/noticias/?imc=1n&fmo=ln&day=11&month=02&year=2011¬icia=637>

Rebello-Marques, A.; Moreira, R. T.; Nunes, C.; Gomes, J.; Aires, C.; et al. (2017) A vitamina D nos Cuidados de Saúde Primários, a importância do seu doseamento e a sua suplementação. *Revista Patient Care (edição portuguesa)*, vol. 22, nº 233, p. 30-41.

Regulamento (UE) 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 304/18.

RELACRE. (2000) *Guia RELACRE 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Portugal: Instituto Português da Qualidade (IPQ).

Roat, M. I. (2017) *Ceratomalacia*. Acedido em 8 de Setembro de 2017. Disponível na página *Web* dos Manuais MSD: www.msmanuals.com/pt-pt/casa/distúrbios-oftalmológicos/doenças-da-córnea/ceratomalacia

Ross, C.; Harrison, E. H. (2007) *Vitamin A: Nutritional Aspects of Retinoids and Carotenoids*. Em Zempleni, J.; Bucker, R. B.; McCormick, D. B.; Suttie, J. W. *Handbook of Vitamins* (4th edition). Florida, USA: CRC Press. ISBN 0-8493-4022-5.

Sabbatini, R. M. E. (2000) *A História das Vitaminas: Alimentos que Salvam*. *Revista Nutriweb On-Line*, vol. 2, nº 1, Jan-Mar 2000. Disponível em: <http://www.nutriweb.org.br/n0201/hipovitaminoses.htm>

Sigma-Aldrich. (1998) *Guide to Solid Phase Extraction*. Supelco, Bulletin 910.

Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; Holler, F. J.; West, D. M. (2006) *Fundamentos de Química Analítica* (tradução da 8^a edição norte-americana). São Paulo, Brasil: Cengage Learning, 2006. ISBN: 8522104360.

Stevens, J.; Dowell, D. (2012) *Determination of Vitamins D2 and D3 in Infant Formula and Adult Nutritionals by Ultra-Pressure Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detection (UPLC-MS/MS): First Action 2011.12*. *Journal of AOAC International*, vol. 95, No. 3, p. 577-582. DOI: 10.5740/jaoacint.CS2011_12

Strohecker, R.; Henning, H. M. (1967) *Análisis de Vitaminas: Métodos Comprobados*. Traduzido por Mayor, F. Madrid, Espanha: Paz Montalvo.

Swanson, M. A.; Evenson, P. (2002) *Nutritional Additives*. Em Branen, A.L.; Davidson, P. M.; Salminen, Seppo; Thorngate III, J. H. *Food Additives* (2nd edition). New York, USA: Marcel Dekker. ISBN: 0-8247-9343-9

Tabela de Composição dos Alimentos (TCA). (2017) Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. Disponível na página *Web* do programa PortFIR, Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar: <http://portfir.insa.pt/>

Turner, C.; King, J. W.; Mathiasson, L. (2001) Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *Journal of Chromatography A*, vol. 936, p. 215-237. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01082-2

Traber, M. G. (2007) *Vitamin E*. Em Zempleni, J.; Bucker, R. B.; McCormick, D. B.; Suttie, J. W. *Handbook of Vitamins* (4th edition). Florida, USA: CRC Press. ISBN 0-8493-4022-5.

Waters Corporation. (2014). *Beginner's Guide to Convergence Chromatography*. USA: Waters Corporation. ISBN: 978-0-615-98496-4.

WHO/FAO, World Health Organization/ Food and Agriculture Organization. (2002) *Human Vitamin and Mineral Requirements: Report of a joint FAO/WHO expert consultation*. Rome, IT: WHO/FAO.

WHO, World Health Organization. (2005) *Total Diet Studies: A Recipe For Safer Food*. GEMS Food brochure on Total Diet Study. Acedido em 16 de Fevereiro de 2017. Disponível em: http://www.tds-exposure.eu/wp-content/uploads/tdsexposure/WP1/TDS_GEMSFood.pdf

Youdim, A. (2017). *Overview of Nutrition*. Acedido em 16 de Fevereiro de 2017. Disponível na página *Web* dos Manuais MSD: <http://www.msmanuals.com/en-pt/professional/nutritional-disorders/nutrition-general-considerations/overview-of-nutrition>

ANEXO 1

Excerto do procedimento de ensaio para a determinação de vitamina D por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)



DAN URQ-PE52_02 L

Página 5 e 6 de 11

6. Modo de proceder

6.1 Generalidades

A vitamina D é sensível à radiação UV e aos agentes oxidantes (ex. oxigénio atmosférico). Todo o trabalho deve ser realizado ao abrigo da luz solar directa ou sob luz amarela, sempre que possível utilizando material de vidro âmbar, folha de alumínio ou materiais absorventes.

Deve adicionar-se anti-oxidantes às soluções contendo a vitamina D extraída.

Os solventes devem se evaporados sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotativo (5.3.6) e temperatura inferior ou igual a 40°C.

A amostra problema (AP) deve ser sempre analisada em duplicado.

Quando se desconhece qual das formas de vitamina D está presente ou se estarão presentes as duas formas fazer primeiro um ensaio para verificação, sem adição de padrão interno.

6.2 Tratamento da amostra

Tomar uma amostra representativa do alimento, triturá-la ou/e homogeneizá-la (Grindomix – 5.3.8) o mais possível. Evitar a exposição a altas temperaturas, pré-arrefecendo antes de triturar, se necessário.

6.3 Saponificação

Pesar cuidadosamente em duplicado, 0,5 a 100 g da amostra a analisar (ou outra quantidade julgada mais conveniente para o produto), para *erlenmeyer* de 250 mL (5.2.9), numa balança analítica (6.3.1), adicionar à amostra 100 mL de etanol (5.1.3) e 1 g de ácido ascórbico (5.1.1) e homogeneizar (Ultraturrax – 5.3.8); a seguir adicionar 7,5 mL de hidróxido de potássio a 60% (5.1.15.1) e agitar.

Adicionar o anti-oxidante (ácido ascórbico) à amostra sempre antes da adição do hidróxido de potássio.

Se se determinar a vitamina D₃, pipetar uma quantidade apropriada de solução padrão de vitamina D₂ (5.1.16.3) para o *erlenmeyer* de saponificação (5.2.9). A quantidade de solução padrão de vitamina D₂ adicionada deverá ser similar à quantidade de vitamina D₃ esperada na amostra.

Se se determinar a vitamina D₂, proceder da mesma forma mas adicionar solução padrão de vitamina D₃ (5.1.16.4).

Colocar no banho-de-água termostalizada com sistema de condensação incorporado (5.3.2).

Saponificar 45 minutos à temperatura de 100°C. Se após a saponificação e arrefecimento, ainda estiverem presentes gorduras ou óleo na superfície da mistura de saponificação o tempo deve ser prolongado ou então adicionada mais solução de hidróxido de potássio.

6.4 Extração

Para evitar a formação de emulsões, adicionar água (5.1.2) à solução de amostra saponificada de forma que a proporção de álcool em relação à água na solução resultante seja 1:1.

Extrair 3 vezes com 25 mL da solução de solventes (5.1.15.3), em ampola de decantação de 500 mL (5.2.1). Reunir os extractos etéreos numa ampola de decantação de 500 mL (5.2.1) e lavar com água (5.1.2) até reacção neutra à fenolftaleína (5.1.6). Filtrar por papel de filtro (5.3.14) contendo sulfato de sódio anidro (5.1.11) para balões de evaporador rotativo em forma de pera de 250 mL (5.2.5).

6.5 Evaporação

Evaporar os extractos da amostra utilizando um evaporador rotativo (5.3.6), sob pressão reduzida e a temperatura que não exceda 40°C.

6.6 Diluição

Retomar o resíduo de insaponificável em volume de n-heptano (5.1.9) adequado à amostra em análise (por exemplo 0,8 mL). Filtrar as soluções com filtro de PVDF de 0,45 µm (5.3.15), com seringas de 5 mL (5.2.19), para um frasquinho para injetor automático (*vial*) (5.2.11) — **solução amostra para análise semi-preparativa**.

Nota: O procedimento pode ser interrompido neste ponto e os frascos do injetor automático contendo as soluções de padrões e amostras guardados no frigorífico para injeção no dia seguinte.

6.7 Cromatografia

6.7.1 Identificação

Identificar as vitaminas D₂ e D₃ por comparação dos tempos de retenção dos cromatogramas da amostra com os obtidos com os padrões (5.1.16.7 e 5.1.16.8) sob as mesmas condições cromatográficas.

6.7.2 Semi-preparativa – Purificação e concentração

Fase estacionária: 5.3.3

Fase móvel: 5.1.14.1

λ: 265 nm

Fluxo: 1 mL/min.

Volume de injeção: 200 µl

Temperatura do forno da coluna cromatográfica: 37°C.

Temperatura da câmara das soluções a injectar: 15 °C.

Tempo de corrida (stop time): ± 10 min (confirmar em cada dia de trabalho após injeção da mistura padrão, ajustar se necessário).

Obtenção da fracção contendo vitamina D:

Injectar a mistura padrão semi-preparativa (5.1.16.5) no sistema HPLC semi-preparativa (5.3.9) até que o pico único de vitamina D elua com um tempo de retenção reprodutível; determinar o intervalo de tempo de recolha da fracção que contém a vitamina D nas amostras.

Fazer duas injeções da solução amostra para análise semi-preparativa (6.6) e recolher as fracções com vitamina D. Fazer a recolha das fracções provenientes das 2 injeções para a mesma pera de evaporação (5.2.6).

Evaporar até à secagem e dissolver num volume apropriado de metanol (5.1.8) (por exemplo 0,5 mL). Para um frasco para injetor automático (*vial*) (5.2.11) colocar a quantidade apropriada.

6.7.3 Analítica – Quantificação

Fase estacionária: 5.3.4 (150 mm)

Fase móvel: 5.1.14.2

λ: 265 nm

Fluxo: 0,8 mL/min.

Volume de injeção: 100 µl

Temperatura do forno da coluna cromatográfica: 37°C.

Temperatura da câmara das soluções a injectar: 15 °C.

Tempo de corrida (stop time): ± 18 min (confirmar em cada dia de trabalho após injeção da mistura padrão, ajustar se necessário).

Injectar os padrões individuais de vitamina D₂ (5.1.16.7) e D₃ (5.1.16.8), a mistura padrão de vitamina D₂ e D₃, e a **solução de amostra para análise analítica** no sistema de HPLC analítico (5.3.10).

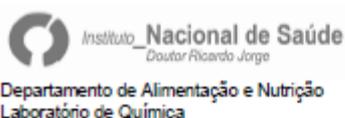
6.7.4 Quantificação dos analitos

O *software* do HPLC permite fazer a integração automática ou manual dos diferentes picos. O critério para a definição da linha de base deverá ser o mesmo nas amostras e nos padrões.

A quantificação é baseada no método do padrão interno. Os cálculos são efetuados e registados no impresso DAN URQ-IM231_01 L.

ANEXO 2

Exemplo de uma folha de cálculo para a determinação das concentrações dos padrões de all-*trans*-retinol, 13-*cis*-retinol e α -tocoferol



Data: 29/05/2017

CONCENTRAÇÃO DOS PADRÕES

Determinação por espectrofotometria

	VITAMINA A all- <i>trans</i> -retinol	VITAMINA A 13- <i>cis</i> -retinol	VITAMINA E dl- α -tocoferol
Data preparação solução mãe	24/02/2014	03/01/2011	05/05/2017
Comprimento de onda (nm)	325	328	292
E ($1\%_{1cm}$)	1830	1686	76
Solvente	Etanol	Metanol	Metanol
Absorvância	0,406	0,298	0,354
Diluição da Solução de Leitura	7/500	1/500	1/2
Concentração da Solução de Leitura (mcg/mL)	2,2158	1,7657	46,5395
Concentração da Solução Mãe (mcg/mL)	158,2748	882,8588	93,0789

Soluções padrão de ensaio

Nível de calibração	1	2	3	4	5	6
Diluição Sol. Mãe all- <i>trans</i> retinol	1/10					
Diluição Sol. Mãe 13- <i>cis</i> -retinol	1/80					
Conc. Solução Calibração all- <i>trans</i> retinol (mcg/mL)	15,8275					
Conc. Solução Calibração 13- <i>cis</i> retinol (mcg/mL)	11,0357					
Volume Solução Calibração all- <i>trans</i> retinol (mL)	0,6	0,9	1,2	1,5	1,9	2,1
Volume Solução Calibração 13- <i>cis</i> retinol (mL)	0,4	0,7	1,0	1,3	1,5	1,7
Volume Solução Calibração dl- α -tocoferol (mL)	0,6	0,9	1,3	1,7	2,0	2,2
Volume final de sol. Padrão (mL)	10	10	10	10	10	10
Concentração do Padrão de all- <i>trans</i> -retinol (mcg/ml)	0,94965	1,42447	1,89930	2,37412	3,00722	3,32377
Concentração do Padrão de 13- <i>cis</i> retinol (mcg/ml)	0,44143	0,77250	1,10357	1,43465	1,65536	1,87608
Concentração do Padrão de dl- α -tocoferol (mcg/ml)	2,7924	4,1886	6,0501	7,9117	9,3079	10,2387

Rubrica:

Data:

ANEXO 3

Exemplo de uma folha de cálculo para a determinação do teor de vitamina A (all-*trans*-retinol e 13-*cis*-retinol)



Departamento de Alimentação e Nutrição, Laboratório de química

PARÂMETRO:

Vitamina A (all-*trans* retinol e 13-*cis* retinol)

Nº/Data de Entrada:

Amostra:

MRC NIST 2383

Observações:

AMOSTRA	all- <i>trans</i> retinol		13- <i>cis</i> retinol		all- <i>trans</i> retinol		13- <i>cis</i> retinol	
	1	2	1	2	3	4	3	4
Data de início de análise:	06/06/2017							
Executante:	RDP							
Pasta Nº:								
Diluição na técnica	1							
Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL)								
Resíduos ≤ 10 %	Sim		sim		sim		sim	
Coefficiente correlação (r) ≥ 0,995	Sim		sim		sim		sim	
Toma da amostra (g)	20,1068	20,2285	20,1068	20,2285			0,0000	0,0000
Volume em que a amostra é diluída (mL)	10	10	10	10			0	0
Diluição posterior	1	1	10	10				
Concentração Sol. Analisadas (µg/mL)	1,1830	1,2660	0,0000	0,0000				
Concentração da Toma de Amostra (µg/100g Amostra)	58,8358	62,5850	0,0000	0,0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Concentração Média da Amostra (µg/100g Amostra)	60,7104		0,0000		#DIV/0!		#DIV/0!	
repetibilidade (CV _r =5%)	OK		Repetir		#DIV/0!		#DIV/0!	
r (repetibilidade)	8,4995		0,0000		#DIV/0!		#DIV/0!	
Concentração Total de Vitamina A (µg/100g Amostra)	60,7104				#DIV/0!			
Data de fim de análise	08/06/2017							

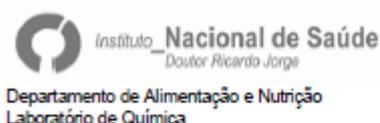
Resultado Final:

Validação (Rubrica e data):

Confirmação (Rubrica e data):

ANEXO 4

Exemplo de uma folha de cálculo para a determinação do teor de vitamina E (dl- α -tocoferol)



PARÂMETRO: Vitamina E (dl- α -tocoferol)

Nº/Data de Entrada:

Amostra:

Observações:

MRC NIST 2383

Toma de Amostra	1	2	3	4
Data de início de análise:	06/06/2017			
Executante:	RDP			
Pasta Nº:				
Diluição na técnica	1			
Rectas de Calibração: Y(área) vs X(μ g/mL)				
Resíduos $\leq 10\%$	Sim		Sim	
Coefficiente correlação ($r \geq 0,995$)	Sim		Sim	
Toma da amostra (g)	20,1068	20,2285		
Volume em que a amostra é diluída (mL)	10	10		
Diluição posterior	1/5	1/5		
Concentração Sol. Analisadas (μ g/mL)	12,1610	11,4890		
Concentração da Toma de Amostra (mg/100g amostra)	3,0241	2,8398	#DIV/0!	#DIV/0!
Concentração Média da Amostra (mg/100g Amostra)	2,9320		#DIV/0!	
repetibilidade ($CV_r=5\%$)	OK		#DIV/0!	
r (repetibilidade)	0,4105		#DIV/0!	
Concentração Média de Acetato de alfa-tocoferol (mg/100g Amostra)	3,2185		#DIV/0!	
Data de fim de análise:	08/06/2017			

Resultado Final:

Confirmação (Rubrica e data):

Validação (Rubrica e data):

ANEXO 5

Exemplo de um relatório de construção de uma reta de calibração no programa EMPOWER® para cada analito (all-*trans*-retinol, 13-*cis*-retinol e dl- α -tocoferol)

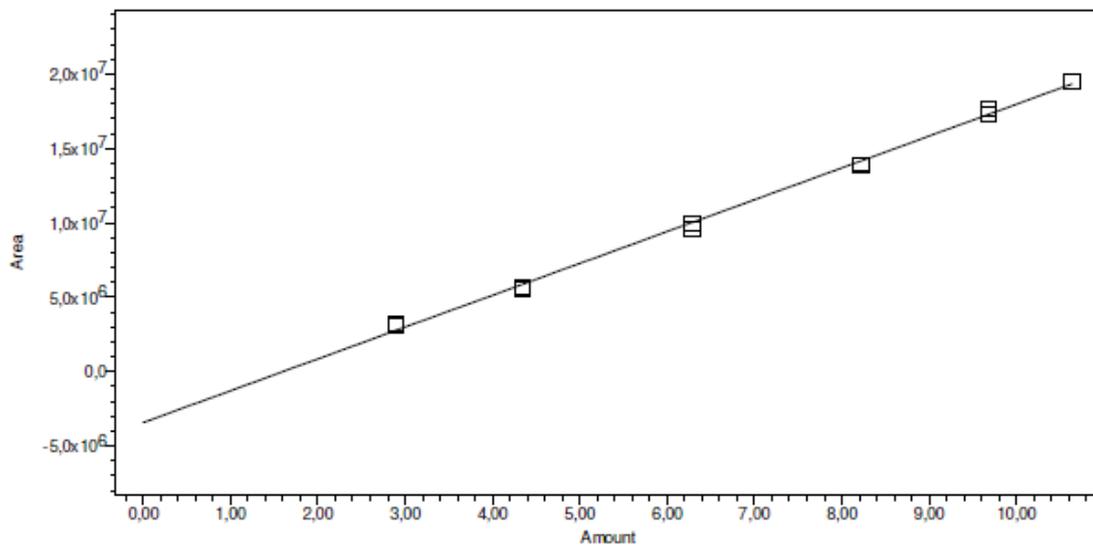


LC Calibration Report

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: ReferencialVitamina AED

Processing Method:	170711 AED RDP	Project Name:	ReferencialVitamina AED
Processing Method ID:	3334	System:	HPLC2
Calibration ID:	3336	Channel:	2475ChA ex295/em330
Date Calibrated:	12-07-2017 22:46:08	Proc. Chnl. Descr.:	2475ChA ex295/em330



Name: alfa-tocoferol; RT: 2,235; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 3337; R: 0,998855; R²: 0,997711; Weighting: None; Equation: $Y = 2,14e+006 X - 3,43e+006$; Standard Error 3,115050e+005; Residual Sum of Squares 9,703534e+011

Peak: alfa-tocoferol

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	Pad 1 AE	3340	alfa-tocoferol		2,901	3239244,347	3,116	-6,90	No	No
2	Pad 1 AE	3341	alfa-tocoferol		2,901	3113985,370	3,058	-5,12	No	No
3	Pad 2 AE	3342	alfa-tocoferol		4,352	5706215,711	4,269	1,94	No	No
4	Pad 2 AE	3344	alfa-tocoferol		4,352	5577346,990	4,209	3,40	No	No
5	Pad 3 AE	3345	alfa-tocoferol		6,286	9959833,441	6,257	0,47	No	No
6	Pad 3 AE	3346	alfa-tocoferol		6,286	9558117,498	6,069	3,58	No	No
7	Pad 4 AE	3348	alfa-tocoferol		8,220	13910925,387	8,103	1,45	No	No
8	Pad 4 AE	3350	alfa-tocoferol		8,220	13923501,175	8,109	1,38	No	No
9	Pad 5 AE	3351	alfa-tocoferol		9,671	17296004,143	9,685	-0,14	No	No
10	Pad 5 AE	3352	alfa-tocoferol		9,671	17616479,794	9,834	-1,66	No	No
11	Pad 6 AE	3353	alfa-tocoferol		10,638	19543886,329	10,735	-0,90	No	No
12	Pad 6 AE	3354	alfa-tocoferol		10,638	19458050,770	10,695	-0,53	No	No

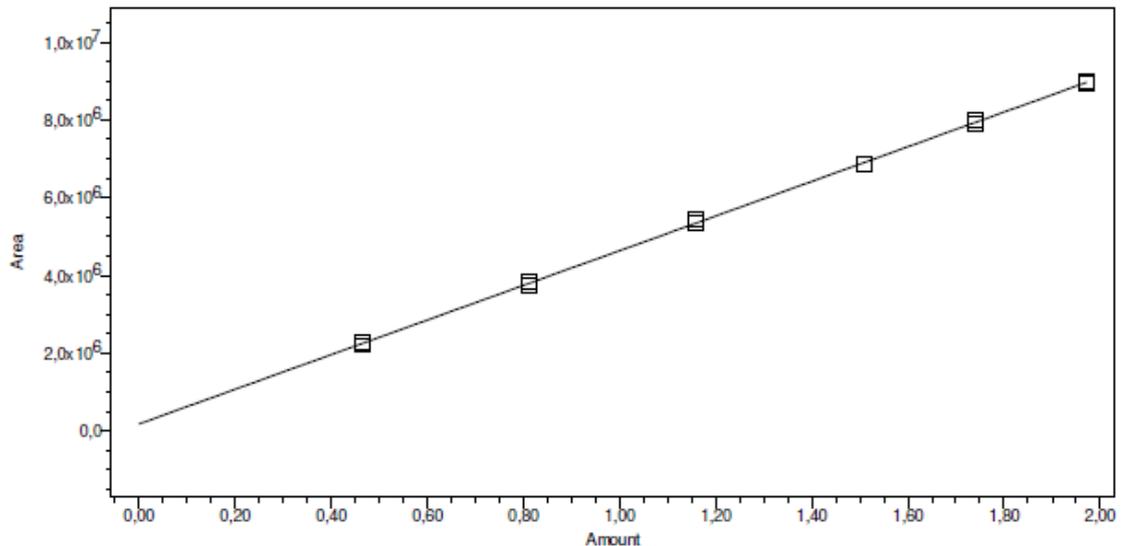


LC Calibration Report

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencia/Vitamina AED

Calibration Plot group contains no data.



Name: cis-retinol; RT: 5,648; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 3338; R: 0,999793; R²: 0,999586; Weighting: None; Equation: $Y = 4,46e+006 X + 1,81e+005$; Standard Error 5,196159e+004; Residual Sum of Squares 2,700006e+010

Peak: cis-retinol

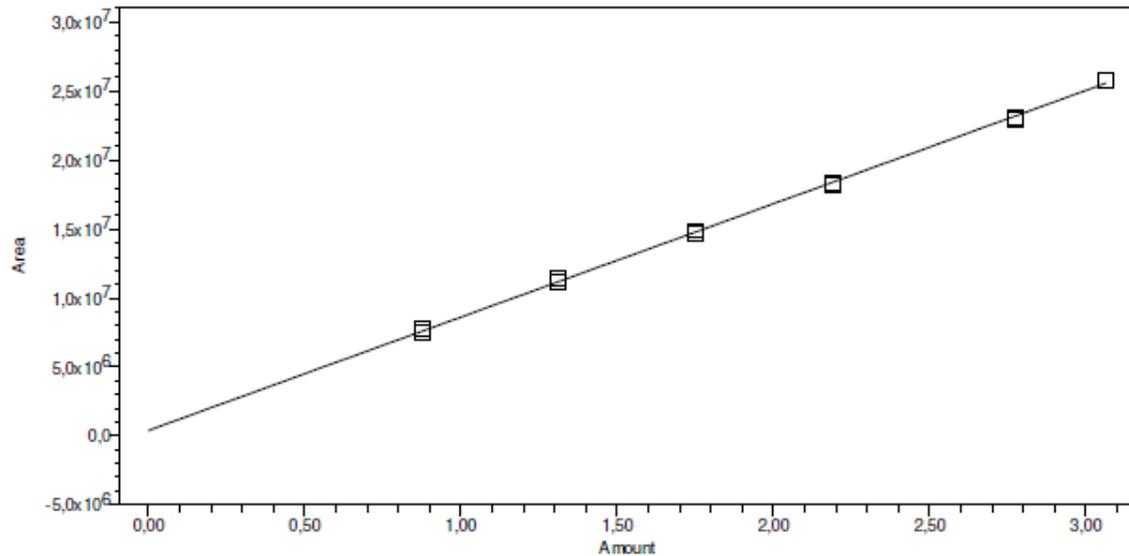
	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	Pad 1 AE	3340	cis-retinol		0,464	2262162,139	0,467	-0,72	No	No
2	Pad 1 AE	3341	cis-retinol		0,464	2209813,980	0,455	1,84	No	No
3	Pad 2 AE	3342	cis-retinol		0,812	3851235,286	0,824	-1,48	No	No
4	Pad 2 AE	3344	cis-retinol		0,812	3744995,190	0,800	1,46	No	No
5	Pad 3 AE	3345	cis-retinol		1,160	5433318,546	1,179	-1,65	No	No
6	Pad 3 AE	3346	cis-retinol		1,160	5342084,918	1,158	0,09	No	No
7	Pad 4 AE	3348	cis-retinol		1,507	6855257,895	1,498	0,62	No	No
8	Pad 4 AE	3350	cis-retinol		1,507	6846663,420	1,496	0,75	No	No
9	Pad 5 AE	3351	cis-retinol		1,739	7998514,181	1,755	-0,88	No	No
10	Pad 5 AE	3352	cis-retinol		1,739	7890250,582	1,730	0,51	No	No
11	Pad 6 AE	3353	cis-retinol		1,971	8933948,363	1,965	0,33	No	No
12	Pad 6 AE	3354	cis-retinol		1,971	8992916,441	1,978	-0,34	No	No



LC Calibration Report

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencia/Vitamina AED



Name: trans-retinol; RT: 7,199; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 3339; R: 0,999653; R²: 0,999305; Weighting: None; Equation: $Y = 8,22e+006 X + 3,95e+005$; Standard Error 1,829433e+005; Residual Sum of Squares 3,346824e+011

Peak: trans-retinol

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	Pad 1 AE	3340	trans-retinol		0,875	7712731,951	0,890	-1,65	No	No
2	Pad 1 AE	3341	trans-retinol		0,875	7516851,992	0,866	1,05	No	No
3	Pad 2 AE	3342	trans-retinol		1,313	11446782,441	1,344	-2,32	No	No
4	Pad 2 AE	3344	trans-retinol		1,313	11103976,516	1,303	0,80	No	No
5	Pad 3 AE	3345	trans-retinol		1,751	14889755,363	1,763	-0,70	No	No
6	Pad 3 AE	3346	trans-retinol		1,751	14624290,387	1,731	1,15	No	No
7	Pad 4 AE	3348	trans-retinol		2,189	18295275,767	2,177	0,51	No	No
8	Pad 4 AE	3350	trans-retinol		2,189	18236535,007	2,170	0,84	No	No
9	Pad 5 AE	3351	trans-retinol		2,772	23042274,833	2,755	0,63	No	No
10	Pad 5 AE	3352	trans-retinol		2,772	22965747,076	2,746	0,97	No	No
11	Pad 6 AE	3353	trans-retinol		3,064	25853667,437	3,097	-1,06	No	No
12	Pad 6 AE	3354	trans-retinol		3,064	25761828,258	3,086	-0,70	No	No

ANEXO 6

Exemplo de uma folha de cálculo para a determinação dos fatores de resposta



Departamento de Alimentação e Nutrição
Laboratório de Química

PARÂMETRO:	Vitamina D ₃		
DATA:	29/05/2017	Executante:	RDP
AMOSTRA:	Padrão AED	Nº/Data Entrada:	
Observações:		Pasta Nº:	

	D ₂	D ₃
λ (nm)	265	265
E ^{-1%} 1cm (em etanol)	475	480
Absorvância A	0,5085	0,623
Conc. do Padrão C _p (µg/ml) = (A x 10 ⁴ / E)	10,705	12,969
Áreas(médias) dos picos dos Padrões A _{p,D1}	187638	290203
Fator de Resposta F _R = (A _{p,D3} x C _{p,D2}) / (A _{p,D2} x C _{p,D3}) =	1,27667	

	i=1	i=2
Massa ou Volume M _i (g) ou V _i (ml)		
Volume Padrão Interno V _{Pi,D2} (ml)		
Diluição		
Concentração Padrão Interno C _{LD2} (µg/ml)	#DIV/0!	#DIV/0!
Área de Pico de D ₂ , A _{i,D2}		
Área do Pico de D ₃ , A _{i,D3}		
C _{LD3} =(A _{i,D3} xV _{Pi,D2} x100) / (A _{i,D2} xV _R xM _i ou V _i) (µg/100 g ou ml)	#DIV/0!	#DIV/0!
Repetibilidade (adequada se CV <= 5%)	#DIV/0!	
Repetibilidade r	#DIV/0!	
C _{D3, média} = (C _{1,D3} + C _{2,D3}) / 2 (µg/100 g ou ml)	#DIV/0!	
Data do fim da análise	05/06/2017	

Resultado Final:	#DIV/0!
Confirmação (Rubrica e data):	
Validação (Rubrica e data):	

ANEXO 7

Exemplo de uma folha de cálculo para a determinação dos coeficientes de variação para a precisão intermédia e para a repetibilidade



Departamento de Alimentação e Nutrição
Laboratório de Química

DADOS DE PRECISÃO

METODO **DAN URQ-PE52_02 L** Analito **Vitamina E** Unidades: **mg / 100 g**
Matriz **30 (salgados), 44 (ovos) e 131 (leite creme e pudim flan)**

Amostras diferentes em dias diferentes - repetibilidade

Dia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
data de análise	17.08.2017	24.08.2017	29.08.2017	17.08.2017	24.08.2017	29.08.2017	31.08.2017	17.08.2017	24.08.2017	29.08.2017
	3,3727303 3,6758314	3,2598072 3,3779911	2,8863844 2,5150091	2,6435576 3,0277652	2,8403989 2,2738498	2,8796564 3,0588157	2,413351 2,9789544	0,3831571 0,3742185	0,4304233 0,4304233	0,407246 0,4145567

CALCULOS

\bar{x} médio	3,5242809	3,3188992	2,7006968	2,8356614	2,5571243	2,9692361	2,6961527	0,3786878	0,4304233	0,4109014
s_i	0,2143248	0,0835687	0,262602	0,2716758	0,4006107	0,1266847	0,399942	0,0063206	0	0,0051695
v_i	0,0459351	0,0069837	0,0689598	0,0738078	0,160489	0,016049	0,1599536	3,995E-05	0	2,672E-05
v_i	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
v média rep (s_r^2)	0,05913533									

Amostras iguais em dias diferentes

Dia 1	3,5242809	2,8356614	0,3786878
Dia 2	3,3188992	2,5571243	0,4304233
Dia 3	2,7006968	2,9692361	0,4109014
Dia 4	2,6961527		

CALCULOS

V_i	0,1837744	0,0315523	0,0006826	#DIV/0!						
v_i	2	3	2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
V média entdia (s_r^2)	0,0662244									
$V_{PI} (s_{PI}^2)$	0,1253597									
s_r	0,2431776									
s_{PI}	0,3540618									
CV_r (%)	11,143656									
CV_{PI} (%)	16,224944									
r	0,6808972									
Pi	0,991373									

ANEXO 8

Painel exposto no Fórum de Engenharia Química e Biológica'17, ISEL, Lisboa (2017)



Determinação simultânea das vitaminas A e E em alimentos por HPLC Otimização dos processos de saponificação e extração

Rute Paz ^{a,b}, M. Celeste Serra ^a, M. Graça Dias ^b

^a Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Departamento de Engenharia Química, Rua Conselheiro Emílio Navarro 1, 1959-007 Lisboa, Portugal

^b Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Departamento de Alimentação e Nutrição, Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal

e-mail: M.Graca.Dias@insa.min-saude.pt

Introdução

As vitaminas são compostos essenciais ao metabolismo dos organismos vivos. São, frequentemente, classificadas de acordo com a sua solubilidade em hidrossolúveis (complexo B e vitamina C) e lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K). Embora sejam necessárias em pequenas quantidades, para as vitaminas lipossolúveis existe o risco de deficiência quando consumidas em níveis insuficientes ou de toxicidade se ingeridas em doses elevadas.^{1,2} A vitamina A tem um papel essencial na visão ao participar no mecanismo de formação de células nervosas sensíveis à luz (fotorreceptores) na retina, ajudando a manter a visão noturna. A dose diária recomendada (DDR) para a vitamina A é de 700/900 µg para mulheres/homens.³ A vitamina E atua como antioxidante, protegendo as células contra danos causados pelos radicais livres, sendo a sua DDR de 13 mg.³ Os alimentos são a principal fonte de vitaminas pelo que, em termos de dieta humana, é importante proceder à sua determinação analítica em matrizes alimentares. A análise das vitaminas A e E nos alimentos é, em geral, realizada pelo método de HPLC (Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência). Antes da análise cromatográfica e com o objetivo de extrair os analitos da matriz, é necessário um passo para a remoção, limpeza e/ou pré-concentração dos analitos alvo.^{4,5}

Objetivo

Otimização do método de saponificação das amostras e do processo de extração líquido-líquido com o objetivo de diminuir o tempo de saponificação e o volume de solventes usados na extração das vitaminas A e E das matrizes alimentares.

Procedimento Experimental



CONDIÇÕES DE SAPONIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO

AMOSTRAS:
Creme vegetal (79% gordura)
Creme com chocolate (45% gordura)

TEMPO DE SAPONIFICAÇÃO
45 minutos
60 minutos

VOLUME DE SOLVENTE
25 mL
50 mL
100 mL

ETAPAS DE EXTRAÇÃO
3 extrações
4 extrações

EXTRAÇÃO



- 1 Adicionar água à solução de amostra saponificada;
- 2 Transferir a mistura para uma ampola de decantação;
- 3 Adicionar solventes de extração (éter de petróleo + éter etílico, 8:2 v/v) e agitar;
- 4 Decantar a fase inferior e repetir a extração;
- 5 Reunir os extratos etéreos e lavar com água até reação neutra;
- 6 Filtrar por papel de filtro, contendo sulfato de sódio anidro.

Resultados

Tabela 1: Teores de vitaminas A e E em cremes vegetais utilizando diferentes condições de tratamento das amostras

Extração	Saponificação de 60 min				Saponificação de 45 min					
	4 x 100 mL		4 x 50 mL		4 x 100 mL		4 x 50 mL		3 x 25 mL	
	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E
Creme vegetal	0,53	17	0,58	18	0,59	19	0,44	19	0,18	9
Creme chocolate	0,40	11	0,48	11	0,42	10	0,40	10	0,21	7

* A (all-trans-retinol e 13-cis-retinol, vitamina A) e E (α-tocoferol, vitamina E)

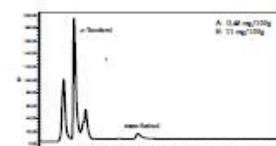


Figura 1: Cromatograma de amostra de creme com chocolate

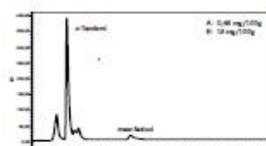


Figura 2: Cromatograma de amostra de creme vegetal

Conclusões

- ✓ A redução do tempo de saponificação de 60 min para 45 min permitiu saponificar as amostras adequadamente;
- ✓ Para um tempo de saponificação de 60 minutos (condição inicial) a redução do volume de extração de 100 mL (condição inicial) para 50 mL permitiu extrair as vitaminas A e E das amostras;
- ✓ Comparando todos os resultados verificou-se que a extração com 25 mL (três vezes) não se revelou suficiente para extrair as vitaminas A e E;
- ✓ De acordo com os resultados obtidos e com vista a reduzir o volume de solventes, os próximos passos serão o estudo da extração com os volumes: 3 x 50 mL e 4 x 25 mL.

¹ Combs, Gerald F (2008). The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. 3rd ed. USA: Elsevier Academic Press.

² Ronald B. Pegg, W.C. Landon, Jr. e Ronald R. Eskin (2010). Vitamin Analysis. [ed.] S.G. Nielsen. Food Analysis. 4th ed. USA: Springer.

³ Johnson, Larry E. (2017). Manual Merck: Overview of Vitamin. Disponível em: <http://www.merckmanuals.com/in-pharmacology-of-nutrition/vitamin-overview-of-vitamin>.

⁴ EN 13832 (2014). Foodstuffs – Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography measurement of α-, β-, γ- and δ-tocopherols.

⁵ Instituto Nacional de Saúde, INSA (2014). Procedimento Experimental: Determinação de vitaminas A e E por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

ANEXO 9

Painel exposto na 10ª Reunião Anual PortFir, INSA, Lisboa (2017)



INTRODUÇÃO

As vitaminas são compostas essenciais ao metabolismo dos seres humanos, sendo frequentemente classificadas de acordo com a sua solubilidade, em hidrossolúveis e lipossolúveis (ex. A, D, E). Em estudos sobre a composição de alimentos é importante proceder à determinação analítica destas vitaminas através de métodos validados que permitam a comparação e rastreabilidade dos resultados.^{1,2}

OBJETIVO

Otimização dos processos de saponificação e extração líquido-líquido, com vista a diminuir o tempo de saponificação e o volume de solventes utilizados na extração das vitaminas A e E das matrizes alimentares e subsequente avaliação da repetibilidade, precisão intermédia e exatidão.

Revalidação de um método de HPLC previamente acreditado no laboratório, com base nas normas EN 12822³ e 12823-1⁴.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras:

- ▶ Creme vegetal (79% gordura)
- ▶ Creme com chocolate (45% gordura)
- ▶ Farinha láctea (FAPAS 21104)
- ▶ Material de Referência Certificado (NIST 2383)
- ▶ Leite creme e pudim flan
- ▶ Ovos
- ▶ Salgados

Condições de extração e saponificação:

Volume de solvente:	Tempo de:
▶ 3 x 25 mL (75 mL)	▶ 45 minutos
▶ 4 x 25 mL (100 mL)	▶ 60 minutos
▶ 3 x 50 mL (150 mL)	
▶ 4 x 50 mL (200 mL)	
▶ 4 x 100 mL (400 mL)	

Condição original

Etapas de extração:

1. Adicionar água à solução de amostra saponificada;
2. Transferir a mistura para uma ampola de decantação;
3. Adicionar solventes de extração (éter de petróleo + éter etílico, 8:2 v/v) e agitar;
4. Decantar a fase inferior e repetir a extração;
5. Reunir os extratos etéreo e lavar com água até pH neutro;
6. Filtrar por papel de filtro, contendo Na₂SO₄ anidro.



RESULTADOS

Tabela 1: Teores de vitamina A e E para diferentes condições de tratamento das amostras

Extração	Saponificação de 60 minutos				Saponificação de 45 minutos									
	4 x 100 mL		4 x 50 mL		4 x 100 mL		4 x 50 mL		3 x 50 mL		4 x 25 mL		3 x 25 mL	
Teor de vitamina (mg/100 g)														
	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E
Creme manteiga	0,53	17	0,68	18	0,59	17	0,44	19	0,40	21	0,23	14	0,18	9,0
Creme chocolate	0,40	11	0,48	11	0,42	11	0,40	10	-	-	-	-	0,21	7,0
FAPAS 21104	-	-	-	-	0,37	10	0,43	10	0,41	11	0,40	8,0	0,33	8,0

- Ensaio não realizado

Tabela 2: Coeficientes de variação da repetibilidade (CV_r) e da precisão intermédia (CV_p)

	Vitamina A		Vitamina E
	all-trans-Retinol	13-cis-Retinol	α-tocoferol
CV _r (%)	3,7	5,5	11,1
CV _p (%)	14,2	13,2	16,2

Tabela 3: Teores de vitamina A e de vitamina E e respetivos z-score para o MRC NIST 2383

Teor de vitamina A (mg/100 g)	z	Teor de vitamina E (mg/100 g)	z
0,0610	1,3	2,9	1,2

• Material de Referência FAPAS 21104 z-scores obtidos inferiores a 2, para todos os volumes de extração apresentadas na tabela 1, à exceção da vitamina A no volume de extração de 3 x 25 mL.

CONCLUSÕES

- ▶ A redução do tempo de saponificação de 60 para 45 min permitiu saponificar as amostras adequadamente, conduzindo a uma redução de 25% do tempo de saponificação;
- ▶ Comparando todos os resultados e tendo em conta os valores de z-score obtidos para o FAPAS 21104, o menor volume capaz de extrair as vitaminas A e E é 3 x 50 mL, permitindo baixar o consumo de reagentes de extração (mistura de éter de petróleo e éter etílico na proporção 8:2, v/v) em 63%;
- ▶ Tendo como referência as normas EN 12822 e 12823-1 é possível afirmar que as novas condições do método apresentam repetibilidade e precisão intermédia adequadas;
- ▶ Os valores de z-score obtidos na tabela 3, para ambas as vitaminas, foram inferiores a 2, correspondendo a resultados satisfatórios, pelo que nas condições utilizadas, o desempenho do método/operador para a determinação das vitaminas A e E é adequado.

¹ Combs, Gerald F. (2008). The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. 2nd ed. USA: Elsevier Academic Press.

² Frazão (2008). Guia Prático 11 - Validação de métodos internos de laboratório em análise química. PCD, Portugal.

³ EN 12822:2014. Foodstuffs - Determination of vitamin B by high performance liquid chromatography - Measurement of α-, β-, γ- and B-tocopherol. CEN, 2014.

⁴ EN 12823-1:2014. Foodstuffs - Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography - Part 1: Measurement of all-trans and 13-trans. CEN, 2014.

