



Validação e aplicação de métodos cromatográficos para determinação de vitaminas em suplementos

Validation and application of chromatographic methods for determination of vitamins in supplements

RIALA6/1689

Lucile Tiemi ABE-MATSUMOTO^{1,2*}, Geni Rodrigues SAMPAIO², Deborah Helena Markowicz BASTOS²

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Química, Física e Sensorial, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Doutor Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2939. E-mail: lucileabe@ial.sp.gov.br

²Laboratório de Bromatologia, Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Doutor Arnaldo, 714, São Paulo, SP, Brasil. CEP 01246-904

Recebido: 15.01.2016 - Aceito para publicação: 10.05.2016

RESUMO

Foram propostas duas metodologias para realizar a determinação de vitaminas em suplementos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): uma para a determinação simultânea de vitaminas lipossolúveis (acetato de retinol, palmitato de retinol, acetato de α -tocoferol e β -caroteno) e outra para a determinação simultânea de vitaminas hidrossolúveis (B1, vitamina C, nicotinamida, ácido nicotínico, B6 e ácido pantotênico). A validação das metodologias foi realizada utilizando-se material de referência certificado SRM 3280 do NIST e padrões de vitaminas. Os limites de detecção (LDs) e de quantificação (LQs) variaram entre 0,3 e 4,3 $\mu\text{g/mL}$ e entre 0,5 e 14,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os percentuais de recuperação dos padrões adicionados nas matrizes variaram entre 92 % e 109 % e entre 86 % e 108 % no material de referência. A repetitividade foi calculada utilizando-se o desvio padrão relativo (RSD); e foram detectados valores entre 0,2 % e 9,6 %. Os métodos validados foram aplicados para a determinação de vitaminas A, E, B1, C, niacina, B6 e ácido pantotênico em 10 amostras de suplementos vitamínicos. Ambos os métodos são adequados para a análise de vitaminas em suplementos e suas aplicações serão imprescindíveis, visto a necessidade urgente de efetuar monitoramento e fiscalização destes produtos.

Palavras-chave. suplementos nutricionais, vitaminas lipossolúveis, vitaminas hidrossolúveis, validação, cromatografia líquida.

ABSTRACT

Two methodologies were proposed for determining vitamins in supplements by means of high performance liquid chromatography (HPLC): one for simultaneous determination of fat soluble vitamins (retinyl acetate, retinyl palmitate, α -tocopheryl acetate and β -carotene), and the other for the simultaneous determination of water soluble vitamins (B1, C, nicotinamide, nicotinic acid, B6 and pantothenic acid). The methodologies were validated using certified reference material SRM 3280 from NIST and vitamins standards. The limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs) ranged from 0.3 to 4.3 $\mu\text{g/mL}$ and from 0.5 to 14.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The recoveries of spiked vitamin standards in supplements ranged from 92 % to 109 %, and from 86 % to 108 % in the reference material. The repeatability was calculated by the relative standard deviation (RSD), with values from 0.2 % to 9.6 %. The validated methods were applied for determining vitamins A, E, B1, C, niacin, B6 and pantothenic acid in 10 multivitamin supplements samples. Both methods are suitable for determining vitamins in multivitamin supplements, and their applications will be essential, considering the urgent need for monitoring and for surveying these products.

Keywords. nutritional supplements, fat-soluble vitamins, water-soluble vitamins, validation, liquid chromatography.

INTRODUÇÃO

Estudos sugerem aumento do consumo de suplementos vitamínicos e minerais no Brasil, sendo comparável aos encontrados em países como os Estados Unidos e a Alemanha^{1,2}. Esta categoria de produtos passou a ser isenta de registro no Ministério da Saúde a partir de 2010³, facilitando ainda mais a sua comercialização no mercado brasileiro. As informações sobre qualidade e segurança destes produtos são, na maioria das vezes, limitadas às informações constantes nos rótulos, porém, as concentrações de vitaminas declaradas na informação nutricional da rotulagem poderão ser confirmadas somente após análise destes produtos com metodologias analíticas validadas⁴.

Para a determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos, a maioria das técnicas envolve etapas de saponificação, extração com solvente orgânico e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência ou ultravioleta-visível (UV-Vis). A determinação de vitaminas hidrossolúveis foi realizada durante muitos anos por métodos microbiológicos e espectrofotométricos e, posteriormente, também por CLAE^{5,6}. Novas técnicas cromatográficas têm sido desenvolvidas apresentando diversas vantagens tais como: redução no tempo de análise, utilização de menor quantidade de solventes, maior eficiência, além da possibilidade de quantificar várias vitaminas em uma mesma análise. O uso de CLAE com detector de massas e a técnica por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), por exemplo, permitem essas vantagens, porém são equipamentos de alto custo^{7,8,9}.

A análise de vitaminas envolve alguns desafios. Sua determinação exige cuidados especiais, principalmente devido a sensibilidade destes compostos à luz, oxigênio, temperatura e alterações de pH⁵. Em alimentos *in natura*, as vitaminas encontram-se em baixas concentrações, muitas vezes com a presença de interferentes em matrizes complexas. Em suplementos, as vitaminas estão presentes em concentrações maiores, porém, há grande variação entre as concentrações de vitaminas adicionadas nestes produtos,

dificultando a extração e análise simultânea de alguns compostos¹⁰. As concentrações de vitamina B₁₂ e de vitamina C, por exemplo, encontram-se próximos de 2 µg e 45 mg, respectivamente em uma porção.

O tamanho da porção para análise é um fator importante a se considerar, já que algumas vitaminas são microencapsuladas com a finalidade de garantir sua estabilidade durante o período de armazenamento e as partículas podem não estar homogeneamente distribuídas. As tecnologias como a nano e a microencapsulação estão rapidamente evoluindo, sendo que os diferentes processos utilizados podem dificultar a extração de algumas vitaminas¹¹. Devido às dificuldades para se estabelecer um método prático e seguro para análise de vitaminas em suplementos vitamínicos, o *National Institute of Standard and Technology* (NIST) produziu recentemente um material de referência de multivitamínicos e multielementos¹². Este material serve de suporte para a validação de metodologias de análise destes produtos permitindo aos laboratórios a implantação de metodologias confiáveis, possibilitando uma fiscalização adequada para oferecer produtos com maior garantia de qualidade aos consumidores.

Com a isenção da obrigatoriedade de registro sanitário, a fiscalização de suplementos vitamínicos por órgãos competentes torna-se extremamente necessária para assegurar a idoneidade dos mesmos. Assim, este trabalho teve como objetivo, adequar e validar metodologias para determinação de vitaminas em suplementos vitamínicos nas formas de comprimidos, drágeas, cápsulas gelatinosas duras e moles e soluções, visando estabelecer métodos de fácil e rápida execução para a implantação na rotina, tanto em laboratórios de saúde pública quanto em laboratórios de controle de qualidade nas indústrias.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões, reagentes, material de referência certificado e amostras

Os padrões de acetato de retinol, acetato de α -tocoferol, β -caroteno, cloridrato de tiamina (B1), riboflavina (B2), cloridrato de piridoxina (B6), nicotinamida, ácido nicotínico e ácido pantotênico foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis,

EUA); o palmitato de retinol da Fluka (Buchs, Suíça) e o ácido ascórbico (C) da Supelco (Bellefonte, EUA). Foram utilizados os seguintes solventes grau cromatográfico: metanol da Carlo Erba e acetoneitrila, hexano e clorofórmio da J. T. Baker® (Bakerbond, EUA). Trietilamina e BHT (butil hidroxitolueno) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis, EUA), HCl (ácido clorídrico) e ácido orto-fosfórico, da Merck® (Darmstadt, Alemanha), e fosfato de sódio monobásico, da Calbiochem® (San Diego, EUA). O material de referência SRM 3280 - *Multivitamin/Multielement Tablet*, foi adquirido do NIST e as amostras de suplementos vitamínicos foram adquiridas no comércio da cidade de São Paulo (SP).

A solução tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 3,0) foi preparada semanalmente, dissolvendo-se 6,9 g de fosfato de sódio monobásico em 1 L de água Milli-Q e o pH foi ajustado para $3,0 \pm 0,1$ com adição de ácido ortofosfórico 85 %. A solução foi colocada em banho ultrassônico por 10 min e filtrada em membranas de 0,45 µm antes do uso.

Equipamentos

A pulverização das matrizes drágeas e comprimidos foi realizada em moinho vibratório, modelo MM400, marca Retsch Technology® (Haan, Alemanha). Para os procedimentos de análise, utilizou-se balança analítica modelo XS205, marca Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suíça); banho ultrassônico modelo Ultracleaner 1400, marca Unique (São Paulo, Brasil); centrífuga modelo 3-18K, marca Sigma (Osterode, Alemanha); concentrador de amostras modelo Centrivap, marca Labconco (Kansas City, EUA). A leitura das absorvâncias dos padrões de vitaminas e de β-caroteno foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível modelo UV-X1650PC, marca Shimadzu® (Kyoto, Japão) e o ajuste de pH da solução tampão foi realizado em pHmetro digital, modelo PG1800, marca Gehaka® (São Paulo, Brasil). A água foi purificada pelo sistema Milli-Q, da Millipore (Bedford, EUA).

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo LC-20AT, com injetor automático SIL-20AC, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos PDA-20A, marca

Shimadzu® (Kyoto, Japão). Para ambos os métodos, foi utilizada coluna de fase reversa C18 Shim-Pack VP-ODS-2 (150 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), marca Shimadzu (Kyoto, Japão).

Preparo das amostras de suplementos vitamínicos

Um mínimo de dez unidades das amostras em drágeas ou comprimidos foram pesadas para o cálculo do peso médio real, e estas foram trituradas em moinho utilizando vasos de moagem de 50 mL, com frequência de 20 Hz durante 1 min. Para a determinação das vitaminas A e E e β-caroteno foi necessária uma etapa adicional: as amostras trituradas previamente, foram passadas em tamis de 100 Mesh, e o conteúdo retido no tamis foi pulverizado em vaso de moagem de 10 mL com frequência de 20 Hz durante 30 s, para que todo o pó atingisse uma granulometria menor que 150 µm, ou seja, passasse pelo tamis de 100 Mesh.

As cápsulas gelatinosas duras foram abertas manualmente e o conteúdo (pó) de dez unidades foi homogeneizado em frascos de polipropileno. As cápsulas gelatinosas moles de matriz oleosa foram abertas com auxílio de estilete e o conteúdo de dez unidades foi homogeneizado em tubos de polipropileno. Nestes dois tipos de cápsulas, o conteúdo foi completamente removido para a pesagem das cápsulas vazias. Determinou-se por diferença entre os pesos das cápsulas inteiras e das cápsulas vazias, o peso médio do conteúdo de dez unidades. Em matrizes líquidas, os frascos foram agitados antes da tomada de amostra para garantir sua homogeneidade.

Metodologia proposta para a determinação de vitaminas A e E e β-caroteno

O desenvolvimento da metodologia foi baseado no método descrito por Thomas et al¹³ com modificações. As etapas de adequação do ensaio, que levaram a alterações no método original, bem como os resultados da validação do ensaio estão descritas no item resultados e discussões. A fase móvel foi constituída de metanol com 0,1 % de trietilamina : etanol (75 : 25, v/v), com fluxo de 1,0 mL/min, em modo isocrático, com forno de coluna a 35 °C. O volume de injeção foi de 20 µL e a temperatura no injetor automático foi mantida a 15 °C para minimizar a degradação das

vitaminas. O tempo da análise cromatográfica foi de 25 min.

Cerca de 250 mg da amostra pulverizada foram pesadas em tubo de polipropileno com tampa rosqueada com capacidade de 50 mL. Foi adicionado 1 mL de HCl 0,1 M aos tubos, os quais foram sonicados a 40 kHz em banho ultrassônico por 15 min. A extração dos analitos foi realizada em três etapas utilizando 10, 10 e 5 mL de hexano respectivamente para a primeira, segunda e terceira extrações. Após cada adição de hexano, os tubos foram homogeneizados em agitador tipo Vortex por 1 min, colocados em banho ultrassônico por 5 min, agitados novamente em agitador tipo Vortex por 30 s e centrifugados a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C. Após cada centrifugação, os extratos foram transferidos para balões volumétricos âmbar de 25 mL com auxílio de micropipeta, e o volume final foi completado com hexano. Alíquotas de 3 mL do extrato hexânico foram transferidos para tubos de vidro de 10 mL e colocados em concentrador de amostras por 10 min a 40 °C para evaporação do solvente. Quando foi observado algum resíduo líquido no tubo, este foi completamente seco com auxílio de nitrogênio. As amostras foram ressuspensas em 2 mL de álcool etílico com BHT a 0,3 mg/mL, filtrados em membranas de 0,45 µm (Millipore) para frascos tipo *vial* âmbar.

Para a análise dos suplementos com matriz oleosa, utilizou-se quantidade de amostra entre 150 e 400 mg, e para análise em matriz líquida, pipetou-se um volume entre 1 e 3 mL, dependendo da concentração de vitaminas declaradas na informação nutricional. A extração de vitaminas A e E e β-caroteno foi realizada seguindo o mesmo procedimento utilizado para as matrizes pulverizadas, excluindo-se a primeira etapa correspondente a adição de HCl 0,1 M com banho ultrassônico por 15 min.

Para a curva de calibração, os padrões de acetato e palmitato de retinol e acetato de α-tocoferol foram dissolvidos em álcool etílico e o padrão de β-caroteno foi dissolvido em hexano. As concentrações das soluções de estoque foram determinadas espectrofotometricamente pela Lei de Lambert-Beer, utilizando as seguintes absorvidades molares: 1560 dL/g.cm para acetato

de retinol a 325 nm, 1000 dL/g.cm para palmitato de retinol a 325 nm, 43,6 dL/g.cm para acetato de α-tocoferol a 284 nm e 2590 dL/g.cm para β-caroteno a 450 nm^{13,14}.

As curvas de calibração foram construídas em cinco níveis nas seguintes faixas de concentração: 0,95 a 30,42 µg/mL para acetato de retinol; 36,68 a 586,81 µg/mL para acetato de α-tocoferol; 2,41 a 76,96 µg/mL para palmitato de retinol e 3,09 a 51,64 µg/mL para β-caroteno.

Para a expressão dos resultados foram utilizados os fatores 0,872, 0,546 e 0,167 respectivamente para acetato de retinol, palmitato de retinol e β-caroteno e o fator 0,91 para o acetato de α-tocoferol^{15,16}. Uma porção corresponde à ingestão diária de suplemento recomendada pelo fabricante.

Metodologia proposta para a determinação de vitaminas hidrossolúveis

A fase móvel foi constituída de metanol (A) e tampão fosfato de sódio 0,05 M (B), em modo de gradiente linear, iniciando com 98 % de A, passando para 40 % de A em 9 min, retornando para a condição inicial em 15 min, e mantendo-se nesta proporção até 25 min para equilíbrio da fase móvel, com fluxo de 0,8 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL e as temperaturas no injetor automático e no forno de coluna foram mantidas a 15 °C e 26 °C, respectivamente. O ácido pantotênico foi detectado a 209 nm, a tiamina, vitamina C, nicotinamida e ácido nicotínico a 254 nm, riboflavina a 268 nm e a piridoxina a 283 nm.

Cerca de 350 mg da amostra pulverizada foram pesadas em tubo de polipropileno com tampa rosqueada com capacidade de 50 mL. Foram adicionados 35 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 3,0) aos tubos, os quais foram agitados em agitador tipo Vortex por 20 s, filtrados em papel de filtro quantitativo, e em seguida em membranas de 0,22 µm (Millipore) para frascos tipo *vial* âmbar. As análises cromatográficas foram realizadas imediatamente após o preparo.

Para análise em matriz oleosa, pesou-se uma quantidade de amostra entre 150 e 400 mg, adicionou-se 5 mL de clorofórmio e foram realizadas

3 extrações com 10 mL de tampão fosfato. A cada adição de tampão, os tubos foram agitados em agitador tipo Vortex por 20 s. Após a separação das fases, a fase aquosa foi transferida para frasco de polipropileno com auxílio de pipeta automática. Cerca de 2 mL de fase aquosa foi filtrada em filtros de 0,22 µm (Millipore) para frascos tipo *vial* âmbar e analisadas imediatamente por CLAE.

Em matriz líquida, pipetou-se um volume entre 1 e 3 mL, seguindo o mesmo procedimento utilizado para as matrizes pulverizadas.

Os padrões das vitaminas hidrossolúveis foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 0,05 M e as curvas de calibração foram construídas em cinco níveis nas seguintes faixas de concentração: 11,1 a 177,6 µg/mL para nicotinamida; 29,8 a 476,9 µg/mL para vitamina C; 3,8 a 60,4 µg/mL para tiamina; 3,7 a 59,3 µg/mL para piridoxina; 3,7 a 59,3 µg/mL para ácido pantotênico e 10,4 a 166,3 µg/mL para ácido nicotínico. Os resultados foram expressos em miligramas (mg) de vitamina por porção de suplemento.

Validação

As validações dos métodos foram realizadas de acordo com o documento de caráter orientativo da Coordenação Geral de Acreditação DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011)¹⁷. Os seguintes parâmetros de desempenho foram determinados:

Seletividade

Para o estudo da seletividade, foram selecionadas amostras de suplementos vitamínicos e minerais com ausência do analito a ser estudado, os quais foram utilizados como o branco da amostra. Para a avaliação da seletividade foram realizados os ensaios em dois grupos de amostras de teste, um com a matriz (branco da amostra) e outro sem a matriz (branco do ensaio), seguindo a metodologia proposta. As análises foram realizadas em seis replicatas independentes para cada grupo, com adição de um nível de concentração do padrão do analito.

O efeito da matriz suplementos vitamínicos

e minerais foi verificado pelo teste F, para comprovar a homogeneidade das variâncias e pelo teste t, para a comparação das médias. Em cada grupo, foi verificada a existência de *outlier*, através do teste de Grubbs. Os seguintes critérios de aceitação foram utilizados: Se $G_{calc} < 1,887$ não há *outlier*; se $t_{calc} < t_{tab}$ e $F_{calc} < F_{tab}$ não há efeito de matriz; se $t_{calc} > t_{tab}$ e/ou $F_{calc} > F_{tab}$ há necessidade da adição padrão.

Linearidade e Faixa de Trabalho

O estudo da linearidade foi realizado com cinco níveis de concentração. Os padrões foram preparados em triplicatas e os valores de suas áreas foram usados para a obtenção da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Um estudo da linearidade foi estabelecido para o método por meio do coeficiente de regressão linear (r) da reta. O coeficiente de correlação quadrado (r^2) é normalmente mais utilizado porque fornece a ideia percentual de correlação dos pontos com a reta. Quanto mais próximo de 1 é o r^2 , melhor é a representação do modelo matemático expresso pela equação de reta. Para o conjunto de dados obtidos foi calculado o valor de r^2 e um valor maior que 0,995 foi requerido.

O método dos mínimos quadrados supõe que os resíduos têm a mesma variância. Na calibração isto significa que a dispersão das medidas é independente do valor da concentração. Esta condição de variância uniforme é chamada homocedasticidade. Para verificar se o sistema é homocedástico (variâncias iguais) ou heterocedástico (variâncias diferentes) foi aplicado o teste de Cochran, visando avaliar como é a variância ao longo da curva. Os valores dos resíduos foram lançados em gráfico e foi observada se a distribuição dos pontos era aleatória, livre de tendências.

Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Foram adicionadas pequenas concentrações dos analitos ao branco da amostra e utilizou-se como critério para determinação do limite de detecção, as concentrações que equivalassem a uma área de pico cerca de três vezes maiores que o ruído. Utilizando a fórmula $LD = LQ/3,3$,

estabeleceu-se o LQ. A precisão e exatidão das áreas correspondentes ao LQ foram confirmadas, preparando seis replicatas nestas concentrações, e quantificando conforme os métodos analíticos estabelecidos.

Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação dos padrões adicionados nas matrizes de suplementos vitamínicos. Foram preparadas em triplicatas, amostras de suplementos com adição de padrão em três níveis de concentração, que foram quantificadas conforme os métodos analíticos estabelecidos. Além disso, foi analisado o material de referência SRM 3280 *Multivitamin/Multielement tablet* em 6 replicatas.

Precisão

Para a repetitividade, foram utilizados os resultados obtidos no teste de recuperação de amostras fortificadas, calculando-se o desvio padrão para cada nível de concentração e o desvio padrão relativo (RSD).

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. O nível de significância estabelecido para os testes estatísticos aplicados na validação das metodologias foi de $\alpha = 5\%$. Todas as análises dos dados foram realizadas pelo programa Microsoft® Excel 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Adequação da metodologia para determinação de vitaminas A e E e β -caroteno

Condições cromatográficas

O desenvolvimento da metodologia foi iniciado pelas condições cromatográficas de separação e de detecção do acetato de retinol, palmitato de retinol, acetato de α -tocoferol e β -caroteno em CLAE utilizando detectores de arranjo de diodos e de fluorescência em série. Inicialmente, foi utilizada uma coluna de fase reversa C18, Shim-Pack VP-ODS-2 (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 μ m, marca Shimadzu) e fase móvel metanol com 0,05 % de trietilamina : acetonitrila

(96 : 4, v/v). Porém, nestas condições, não ocorreu eluição do β -caroteno em 60 min. Para uma eluição mais rápida do β -caroteno, havia a necessidade de se utilizar uma fase móvel menos polar. A escolha dos solventes da fase móvel foi baseada no método descrito por Kand'ar et al¹⁸, pois o uso de etanol apresenta a vantagem de ser menos tóxico e o metanol, por ser de baixo custo. Com esta fase móvel, foi necessária uma corrida de 45 min para a eluição de todos os analitos. Para redução do tempo de corrida, foi utilizada uma coluna de mesma composição, porém com comprimento de 150 mm, tornando possível a eluição e separação de todos os compostos de interesse em 25 min, permitindo boa resolução para todos os picos cromatográficos.

Detecção

Inicialmente, foi utilizado o detector de arranjo de diodos (DAD) para detecção do acetato e palmitato de retinol ($\lambda = 325$ nm) e do β -caroteno ($\lambda = 450$ nm), em série com o detector de fluorescência ($\lambda_{ex} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm) para detecção do acetato de α -tocoferol. Para a análise simultânea das vitaminas A e E normalmente utilizam-se estes dois detectores, já que a intensidade de resposta dos tocoferóis no UV é relativamente menor quando comparado à intensidade de resposta dos retinóis. Ao analisar estes dois analitos em concentrações equivalentes, os picos cromatográficos ficaram desproporcionais, dificultando a quantificação dos tocoferóis pelo UV e levando à necessidade de uso do detector de fluorescência, o qual apresenta maior sensibilidade. Porém, nos suplementos vitamínicos a concentração de acetato de α -tocoferol encontrada é cerca de 10 a 15 vezes maior que a concentração de acetato de retinol. Assim, a curva de calibração foi construída levando-se em consideração estas proporções, o que possibilitou a quantificação de ambas utilizando somente o DAD.

Preparo de amostra e extração das vitaminas

No método proposto por Thomas et al¹³, utilizaram-se 2 g de amostra e no mínimo 100 mL de solvente orgânico, e a etapa de extração das vitaminas foi realizada *overnight*, o que não se

mostrou muito prático. Assim, a extração foi realizada utilizando-se 0,2 a 0,3 g de amostra e reduzindo-se o volume de solvente para 25 mL. Porém, com a redução da quantidade de amostra foi necessária uma homogeneização adequada dos suplementos vitamínicos. O pó obtido após trituração dos comprimidos no moinho vibratório, utilizando vasos de moagem de 50 mL, com frequência de 20 Hz durante 1 min apresentou-se visualmente homogêneo, porém, após análise das vitaminas, observou-se que a homogeneização não foi suficiente para um resultado satisfatório, em relação ao acetato de retinol, o qual apresentou coeficiente de variação acima de 20 % para análise em quadruplicata. Para melhorar a homogeneização, a amostra pulverizada foi passada em tamis de 100 *mesh* e o resíduo retido foi novamente triturado em vasos de moagem de 10 mL por 30 s até que todo o pó passasse pelo tamis de 100 *mesh*. Com esta etapa de homogeneização foi possível obter resultados com coeficientes de variação menores que 10 %. Além disso, foi realizado teste de extração das amostras utilizando somente o Vortex por 1 min após adição de hexano, ou o Vortex por 1 min seguido de ultrassom por 5 min e novamente o Vortex por 30 s. A eficiência da extração foi confirmada pela quantificação dos analitos extraídos do resíduo após as três extrações, ou seja, realizando a quarta extração e verificando-se que as concentrações de vitaminas encontrados nesta última não foram significativas.

Nos suplementos vitamínicos, a vitamina A pode ser adicionada nas formas de acetato ou palmitato de retinol ou ainda como o β -caroteno, e as suas concentrações são expressas como $\mu\text{g ER}$ (equivalentes de retinol) por porção. A vitamina E é adicionada na forma de acetato de α -tocoferol e expressa como $\text{mg } \alpha\text{-TE}$ (equivalentes de α -tocoferol) por porção.

Adequação da metodologia para determinação de vitaminas hidrossolúveis

Condições cromatográficas

Utilizou-se inicialmente as fases móveis tampão fosfato de sódio 0,05 M (A) e acetonitrila (B), em modo de gradiente, com fluxo de

1,0 mL/min. Foram testadas concentrações de acetonitrila entre 2 e 25 % nas condições iniciais, aumentando linearmente para 40 %, porém, não houve separação com boa resolução dos picos de piridoxina e nicotinamida. Ao substituir a acetonitrila pelo metanol, houve melhor separação dos compostos, sendo estabelecida a proporção de 2 % de metanol nas condições iniciais com fluxo de 0,8 mL/min.

Preparo de amostra e extração das vitaminas

Utilizou-se 350 mg de amostra com 35 mL de tampão fosfato, combinando-se agitação em Vortex e banho ultrassônico, testando-se a segunda extração para certificar-se de que a extração única era suficiente. A agitação por 1 min em Vortex, com 5 min em banho ultrassônico, seguido de 30 s de agitação em Vortex e centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C (Método A), mostrou-se satisfatória para a extração e quantificação das vitaminas B1, C, niacina, B6, riboflavina e ácido pantotênico em material de referência certificado. As análises em material de referência foram realizadas com seis repetições em dois dias distintos. As seis replicatas foram preparadas simultaneamente, assim, o tempo decorrido entre as injeções subsequentes foi de 25 min, tempo correspondente a uma análise. A média dos resultados para a vitamina C foi satisfatória, considerando a incerteza do valor certificado, porém, foi visível a sua degradação com o tempo (**Figura 1**). O preenchimento dos *vials* até a sua capacidade máxima para minimizar a ação do oxigênio, e o seu armazenamento em compartimento refrigerado do auto injetor, não foram suficientes para evitar a degradação da vitamina C.

Assim, verificou-se a necessidade de se realizar uma extração rápida, agitando-se o tubo com a amostra e a solução tampão fosfato somente em Vortex por 20 s. Para reduzir ainda mais o tempo de extração, optou-se por não centrifugar a amostra. A solução foi então filtrada primeiramente em filtro de papel quantitativo e em seguida em filtros de 0,22 μm e a análise cromatográfica foi realizada imediatamente após cada preparo. Desta forma, o tempo máximo a partir do início de preparo até a análise cromatográfica foi reduzido de 20 min

para cerca de 5 min (Método B). O material de referência foi também analisado por este método de extração em seis replicatas em dois dias distintos, e verificaram-se melhores resultados em relação à vitamina C (Figura 1). Com esta extração, a quantificação da riboflavina ficou prejudicada, provavelmente, porque esta vitamina tem baixa solubilidade em solução aquosa, e uma extração rápida não foi suficiente para a recuperação adequada desta vitamina. Porém, optou-se pelo método sem centrifugação para priorizar a análise de vitamina C, tendo em vista que esta vitamina é o componente mais abundante nas amostras de suplementos vitamínicos disponíveis no comércio. Esta extração se mostrou rápida e prática, apesar da necessidade de análise imediata no cromatógrafo após cada extração.

Ao analisar algumas amostras comerciais pelos dois métodos de extração (A e B), verificou-se que não havia um padrão para a velocidade de degradação da vitamina C. Ao comparar as concentrações de vitamina C analisadas por ambos os métodos, observou-se porcentagens de degradação entre 18 e 83 % nos resultados obtidos pelo método A quando comparado com o

resultado médio obtido pelo método B. O tempo decorrido após o início do preparo até a análise cromatográfica foi de 20 a 70 min no método A, enquanto no método B, todas as análises cromatográficas foram realizadas após cerca de 5 min do início do preparo.

Validação das metodologias

Os parâmetros de validação avaliados foram a seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão, e os resultados estão apresentados a seguir:

Seletividade

Os ensaios para avaliação da seletividade mostraram que não há *outlier* entre as replicatas, ou seja, $G_{calc} < 1,887$, e que não há efeito de matriz, pois $t_{calc} < t_{tab}$ e $F_{calc} < F_{tab}$ para todos os analitos, logo a adição de padrão não foi necessária, podendo ser utilizada a curva de calibração preparada sem a matriz.

Como os resultados mostraram que a matriz não interfere na análise, os estudos de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão foram baseados na curva de calibração sem a matriz.

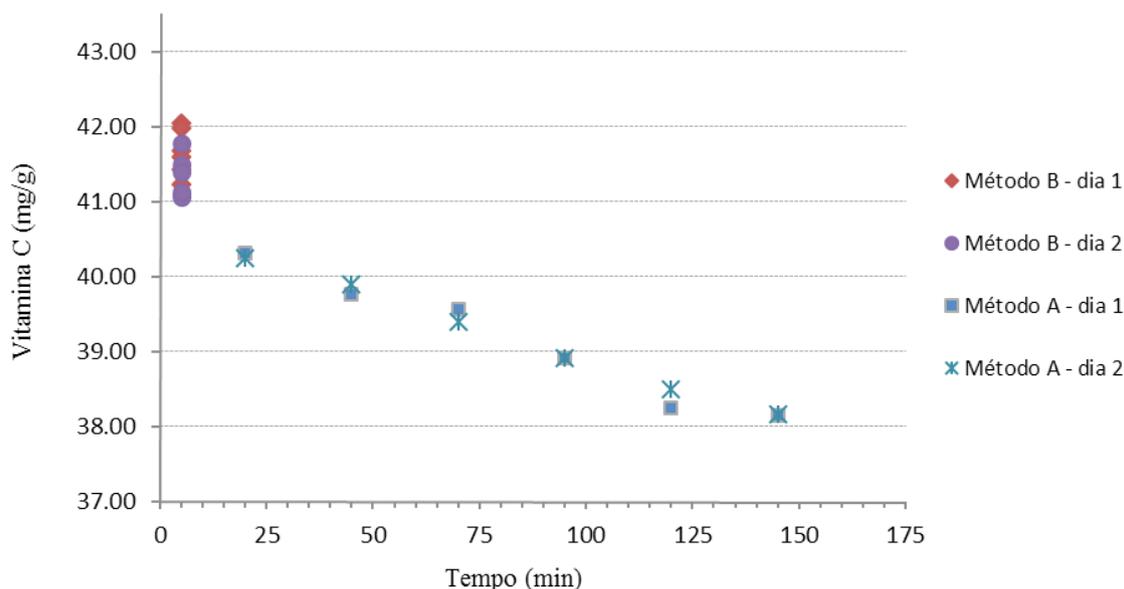


Figura 1. Concentrações de vitamina C determinadas em material de referência certificado SRM 3280 (Valor certificado = $42,2 \pm 3,7$ mg/g), pela extração realizada com centrifugação (Método A) e sem centrifugação com injeção imediata (Método B)

Linearidade e faixa de trabalho

De um modo geral, um coeficiente de correlação quadrado igual ou superior a 0,995 é utilizado para indicar métodos lineares, portanto, adotou-se este critério. Considerando os resultados obtidos, conclui-se que os coeficientes de correlação quadrado apresentaram valores superiores a 0,995, logo, a faixa de trabalho é linear nos intervalos apresentados na **Tabela 1**.

No teste de Cochran, o valor de C_{calc} foi menor que de C_{tab} (**Tabela 1**) para todos os analitos, logo, a curva de calibração apresenta comportamento homocedástico, ou seja, possui variâncias semelhantes ao longo da faixa de trabalho. Além disso, os gráficos de resíduos das curvas analíticas de calibração mostraram uma distribuição aleatória, livre de tendências, mostrando que o modelo matemático utilizado para obtenção da equação de reta é adequado.

LD e LQ

Os valores dos limites de detecção e de quantificação estão apresentados na Tabela 1. Os valores de áreas obtidos para o limite de quantificação possuem precisão e exatidão adequados. O desvio padrão relativo entre as repetições apresentou um valor inferior a 10 %, indicando que as medições das áreas dos padrões no LQ possuem precisão adequadas, ou seja,

são repetitivas. A exatidão foi avaliada pela linearidade da resposta deste padrão com o primeiro ponto da curva de calibração, onde concentração e área aumentam na mesma proporção.

Os limites de detecção e quantificação não são críticos para esta metodologia, pois as concentrações normalmente encontradas destas vitaminas em suplementos permitem a obtenção de extratos relativamente concentrados e as curvas de calibração foram determinadas levando-se em consideração estes níveis.

Exatidão

Os resultados dos ensaios de recuperação dos padrões de vitaminas e β -caroteno adicionados nas matrizes drágeas, comprimidos e cápsulas (pó), cápsulas gelatinosas (matriz oleosa) e nas matrizes líquidas estão listados na **Tabela 2**. De acordo com o guia de validação de métodos químicos da *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, os valores aceitáveis de recuperação para o nível de concentração do acetato de α -tocoferol, ácido pantotênico, nicotinamida, ácido nicotínico e vitamina C situam-se entre 90 e 108 % e para os demais analitos, entre 85 e 110 %¹⁹. A recuperação do padrão de β -caroteno em amostras líquidas apresentou valores entre 80 e 130 %. No entanto, foi verificado que este parâmetro seria desnecessário,

Tabela 1. Valores de r^2 obtidos das curvas de calibração nas faixas de trabalho apresentadas, valores de C_{tab} e C_{calc} obtidos pelo teste de Cochran, LD e LQ dos analitos

Analito	Faixa de trabalho ($\mu\text{g/mL}$)	r^2	C_{tab}/C_{calc}	LD* ($\mu\text{g/mL}$)	LQ* ($\mu\text{g/mL}$)
Acetato de retinol	0,9 a 30,4	0,99999	0,684/0,666	0,1	0,5
Acetato de α -tocoferol	36,7 a 586,8	0,99997	0,684/0,467	3,0	9,9
Palmitato de retinol	2,4 a 76,9	0,99994	0,684/0,571	0,3	1,0
β -caroteno	3,1 a 51,6	0,99808	0,684/0,534	0,3	1,0
Ácido pantotênico	21,4 a 342,8	0,99999	0,684/0,560	4,3	14,0
B1	3,8 a 60,4	0,99998	0,684/0,623	0,9	3,0
Nicotinamida	11,1 a 177,6	0,99999	0,684/0,602	2,5	8,1
Ácido nicotínico	10,4 a 166,2	0,99998	0,684/0,584	2,4	7,9
Vitamina C	29,8 a 476,9	0,99901	0,684/0,560	3,6	12,0
B6	3,7 a 59,3	0,99999	0,684/0,510	0,9	3,0

* (n = 3)

Tabela 2. Resultados dos ensaios de recuperação dos padrões de vitaminas e de β -caroteno adicionados em suplementos vitamínicos após extração e análise por CLAE-DAD

Análito	Pó			Óleosos			Líquidas		
	Adicionada*	Rec (%)**	RSD (%)***	Adicionada*	Rec (%)**	RSD (%)***	Adicionada*	Rec (%)**	RSD (%)***
Acetato de retinol	1,99	99,5 ± 5,6	5,6	2,28	96,5 ± 4,1	4,2	2,28	102,0 ± 4,2	3,7
	6,97	94,6 ± 1,7	1,8	14,26	97,2 ± 3,5	3,6	14,22	102,7 ± 2,3	0,2
	24,88	95,1 ± 0,7	0,8	27,38	97,7 ± 3,4	3,5	27,30	101,6 ± 3,6	1,6
Palmitato de retinol	1,22	94,7 ± 0,8	0,9	2,94	92,0 ± 1,8	1,9	14,40	96,0 ± 4,4	4,5
	19,52	96,3 ± 1,1	1,1	12,85	97,3 ± 3,0	3,1	48,00	100,7 ± 4,1	4,9
	78,08	104,1 ± 1,8	1,7	25,71	97,3 ± 1,1	1,1	96,00	96,1 ± 5,7	5,1
Acetato de α -tocoferol	36,55	98,5 ± 0,8	0,8	41,50	99,8 ± 6,6	6,6	35,63	98,9 ± 3,7	3,3
	73,11	100,2 ± 1,1	1,2	207,49	100,3 ± 5,5	5,5	178,14	101,5 ± 0,6	0,5
	219,32	101,5 ± 1,4	1,4	373,49	99,1 ± 4,4	4,4	356,28	101,1 ± 0,5	0,4
β -caroteno	4,10	100,4 ± 1	9,6	4,42	99,6 ± 8,0	8,0	-	-	-
	15,38	95,0 ± 5,8	9,6	27,63	108,1 ± 3,4	3,1	-	-	-
	36,63	101,9 ± 8,1	6,1	55,26	106,2 ± 5,2	4,9	-	-	-
Ácido pantotênico	25,1	92,9 ± 0,9	1,0	27,8	99,7 ± 4,0	4,0	24,2	103,4 ± 4,7	4,5
	100,3	95,3 ± 0,3	0,3	111,0	97,2 ± 1,7	1,8	96,9	97,2 ± 1,1	1,1
	200,7	94,1 ± 0,8	0,8	222,0	99,4 ± 1,3	1,4	193,8	98,1 ± 0,9	0,9
B1	5,1	105,7 ± 2,7	2,5	6,0	98,5 ± 1,7	1,7	5,1	95,7 ± 1,0	1,1
	20,6	105,7 ± 1,3	1,2	24,2	109,2 ± 3,6	3,3	20,3	103,2 ± 3,7	3,6
	41,1	104,4 ± 2,6	2,5	48,3	105,8 ± 1,0	0,9	40,7	103,2 ± 2,1	2,1
Nicotinamida	14,3	101,0 ± 3,3	3,2	17,3	94,9 ± 3,6	3,7	14,2	103,9 ± 2,7	2,6
	57,1	102,4 ± 0,9	0,8	69,1	105,0 ± 2,5	2,4	56,7	97,5 ± 3,6	3,7
	114,3	102,3 ± 1,2	1,2	138,2	99,1 ± 0,6	0,6	113,3	101,8 ± 0,4	0,4
Ácido nicotínico	14,2	95,8 ± 2,1	2,2	16,2	102,5 ± 1,4	1,4	14,3	93,6 ± 1,6	1,7
	56,7	99,0 ± 0,2	0,2	64,9	103,4 ± 3,0	2,9	57,0	98,4 ± 0,2	0,2
	113,3	97,4 ± 1,2	1,2	129,8	99,8 ± 0,7	0,7	114,1	103,0 ± 0,9	0,8
Vitamina C	44,8	98,7 ± 3,4	3,5	54,4	96,2 ± 4,7	4,8	44,9	97,1 ± 2,2	2,2
	134,3	100,5 ± 4,2	4,2	163,3	103,1 ± 2,0	1,9	134,8	98,5 ± 1,8	1,8
	310,6	99,8 ± 0,5	0,5	326,6	102,9 ± 1,3	1,3	269,6	101,5 ± 3,1	3,0
B6	5,1	100,5 ± 1,6	1,6	5,9	99,6 ± 1,8	1,8	5,1	97,3 ± 0,9	0,9
	20,6	94,4 ± 0,4	0,4	23,4	102,0 ± 2,3	2,3	20,3	96,9 ± 0,3	0,3
	41,1	92,7 ± 0,7	0,8	46,8	96,9 ± 0,5	0,5	40,6	99,8 ± 0,5	0,5

*Concentração do padrão de vitamina ($\mu\text{g/mL}$) adicionado na amostra; **Porcentagem de recuperação; Média \pm Desvio Padrão (n = 3); *** Desvio Padrão Relativo: n=3; (-) Parâmetro não avaliado

já que não foram encontradas amostras líquidas contendo β -caroteno como fonte de vitamina A.

Na análise do material de referência, verificou-se menor recuperação dos analitos quando comparado com a análise em amostras fortificadas, porém, estes resultados também se mostraram satisfatórios, considerando a incerteza dos valores certificados. A exatidão dos resultados das análises no material de referência foi também confirmada pelo cálculo do Z-score, os quais apresentaram valores inferiores a dois, mostrando que a média das replicatas é estatisticamente equivalente ao valor de propriedade certificado (**Tabela 3**).

Os ensaios de recuperação em amostras fortificadas foram importantes para comprovar que não houve degradação significativa das vitaminas e do β -caroteno durante a extração, e as análises no material de referência demonstraram que a extração das vitaminas e do β -caroteno de uma matriz complexa foi efetiva, assegurando que o método apresenta recuperação adequada para todos os analitos.

Precisão

Os desvios padrão relativos variaram entre 0,2 e 9,6 % (**Tabela 2**), concluindo-se que os métodos atendem ao critério de repetitividade estabelecido em toda a faixa de trabalho, apresentando valores de RSD inferiores a 10 %.

Aplicação dos métodos validados em amostras comerciais

Foram analisadas dez amostras de suplementos vitamínicos comerciais, incluindo as matrizes drágeas, comprimidos, cápsulas gelatinosas duras e moles e soluções, de acordo com os métodos analíticos validados. Os picos cromatográficos foram identificados pelo tempo de retenção e confirmados pela comparação dos espectros de absorção das amostras com os dos padrões de cada vitamina (**Figura 2**). Ao comparar as concentrações de vitaminas analisadas em amostras comerciais com os valores declarados na informação nutricional da rotulagem, observaram-se discrepâncias até 64 % superiores e 89 % inferiores (**Tabela 4**). Dentre as vitaminas analisadas, as concentrações de vitamina B6 apresentaram maior nível de conformidade, onde a variação máxima entre os valores analisados e declarados foi de 20 %, tanto inferior quanto superior. As amostras em drágeas apresentaram valores analisados abaixo do declarado em quase todas as vitaminas, enquanto as amostras em comprimidos apresentaram valores próximos ou superiores aos declarados para a maioria das vitaminas. A sobredosagem de micronutrientes é permitida pela legislação para garantir as concentrações declaradas até o prazo final de validade²⁰. Este fato pode justificar os valores acima do declarado em algumas amostras, porém, foram observadas amostras com concentrações abaixo dos valores declarados, principalmente para a vitamina A.

Tabela 3. Valores de referência, incerteza expandida (U), recuperação (%) e Z-score das análises em material de referência SRM 3280

Analito	Valor de Referência	Incerteza do MRC	Valor analisado*	Recuperação*	Z-Score
Retinol ($\mu\text{g/g}$)	446	46	425,6 \pm 12,8	95,9 \pm 2,9	0,7986
α -Tocoferol (mg/g)	21,4	3,5	18,3 \pm 0,5	85,6 \pm 2,3	1,6197
β -caroteno ($\mu\text{g/g}$)	420	100	394,3 \pm 34,1	91,7 \pm 8,1	0,8551
Ácido pantotênico (mg/g)	7,3	0,96	7,9 \pm 0,04	107,7 \pm 0,5	1,8843
B1 (mg/g)	1,06	0,12	1,15 \pm 0,03	108,3 \pm 2,8	1,6728
Nicotinamida (mg/g)	14,1	0,23	14,2 \pm 0,3	100,5 \pm 2,3	0,7865
Vitamina C (mg/g)	42,2	3,7	41,7 \pm 0,3	98,7 \pm 0,7	0,4629
B6 (mg/g)	1,81	0,17	1,94 \pm 0,1	107,0 \pm 3,2	1,3778

*Média \pm Desvio Padrão (n = 6)

Tabela 4. Teores de vitaminas obtidos na análise e declarados em suplementos vitamínicos comerciais

Amostras	Vitaminas *																							
	A	E	C	B1	B6	Ácido pantotênico	Nicotinamida	A	E	C	B1	B6	Ácido pantotênico	Nicotinamida	A	E	C	B1	B6	Ácido pantotênico	Nicotinamida			
A - drágea	va	113,9 ± 0,5	-81	ND	-	39,0 ± 0,3	-13	0,9 ± 0,02	-18	0,5 ± 0,01	0	0,5 ± 0,01	0	2,3 ± 0,01	-54	11,9 ± 0,2	-8							
	vd	600	nd	45	1,1	45	45	1,1	0,5	0,5	5	5	5	5	13									
B - drágea	va	66,2 ± 4,8	-89	ND	-	33,7 ± 0,2	-25	0,8 ± 0,03	-27	0,4 ± 0,01	-20	0,4 ± 0,01	-20	1,6 ± 0,05	-68	11,8 ± 0,1	-9							
	vd	600	nd	45	1,1	45	45	1,1	0,5	0,5	5	5	5	5	13									
C - caps gel dura	va	107,8 ± 11,1	-82	7,8 ± 0,8	-22	42,4 ± 1,8	-6	1,2 ± 0,1	0	1,3 ± 0,01	0	1,3 ± 0,01	0	5,3 ± 0,4	6	15,9 ± 0,3	-1							
	vd	600	10	45	1,2	45	45	1,2	1,3	1,3	5	5	5	5	16									
D - comprimido	va	561,4 ± 11,4	40	9,6 ± 0,2	43	40,2 ± 1,7	-11	1,2 ± 0,04	0	1,4 ± 0,007	8	1,4 ± 0,007	8	6,0 ± 0,1	20	14,0 ± 0,1	-13							
	vd	400	6,7	45	1,2	45	45	1,2	1,3	1,3	5	5	5	5	16									
E - comprimido	va	705,2 ± 39,3	18	16,4 ± 0,7	64	45,7 ± 4,2	2	1,3 ± 0,08	8	1,3 ± 0,1	0	1,3 ± 0,1	0	5,4 ± 0,5	8	14,6 ± 1,4	-9							
	vd	600	10	45	1,2	45	45	1,2	1,3	1,3	5	5	5	5	16									
F - caps gel mole	va	358,8 ± 8,7	-10	9,0 ± 0,3	34	45,9 ± 0,9	2	1,4 ± 0,03	17	1,29 ± 0,01	-1	1,29 ± 0,01	-1	4,9 ± 0,1	-2	6,9 ± 0,1	-57							
	vd	400	6,7	45	1,2	45	45	1,2	1,3	1,3	5	5	5	5	16									
G - caps gel mole	va	109,9 ± 5,5	-82	3,4 ± 0,1	-66	55,4 ± 0,9	23	1,6 ± 0,03	33	1,1 ± 0,08	-15	1,1 ± 0,08	-15	6,6 ± 0,2	32	ND	-							
	vd	600	10	45	1,2	45	45	1,2	1,3	1,3	5	5	5	5	16									
H - caps gel mole	va	579,7 ± 25,7	-3	8,3 ± 0,1	-17	43,2 ± 1,4	-4	ND	-	1,5 ± 0,03	20	1,5 ± 0,03	20	5,4 ± 0,1	8	20,9 ± 0,8	31							
	vd	600	10	45	nd	45	45	nd	nd	1,25	5	1,25	5	5	16									
I - solução	va	206,4 ± 9,8	-8	2,3 ± 0,12	-8	20,5 ± 0,1	-32	0,6 ± 0,04	0	0,5 ± 0,001	-17	0,5 ± 0,001	-17	3,2 ± 0,1	7	8,9 ± 0,02	11							
	vd	225	2,5	30	0,6	30	30	0,6	0,6	0,6	3	0,6	0,6	3	8									
J - solução	va	170,4 ± 7,0	-15	ND	-	34,5 ± 0,8	15	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-							
	vd	200	nd	30	nd	30	30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd							

va: valor obtido na análise (média ± dp, n=3); vd: valor declarado na informação nutricional; ≠ (%): porcentagem de diferença do valor analisado em relação ao valor declarado; ND: não detectado; nd: não declarado; porção: quantidade de suplemento/dia indicado pelo fabricante; *µg RE/porção para vitamina A, mg α-TE/porção para vitamina E e mg/porção para outras vitaminas

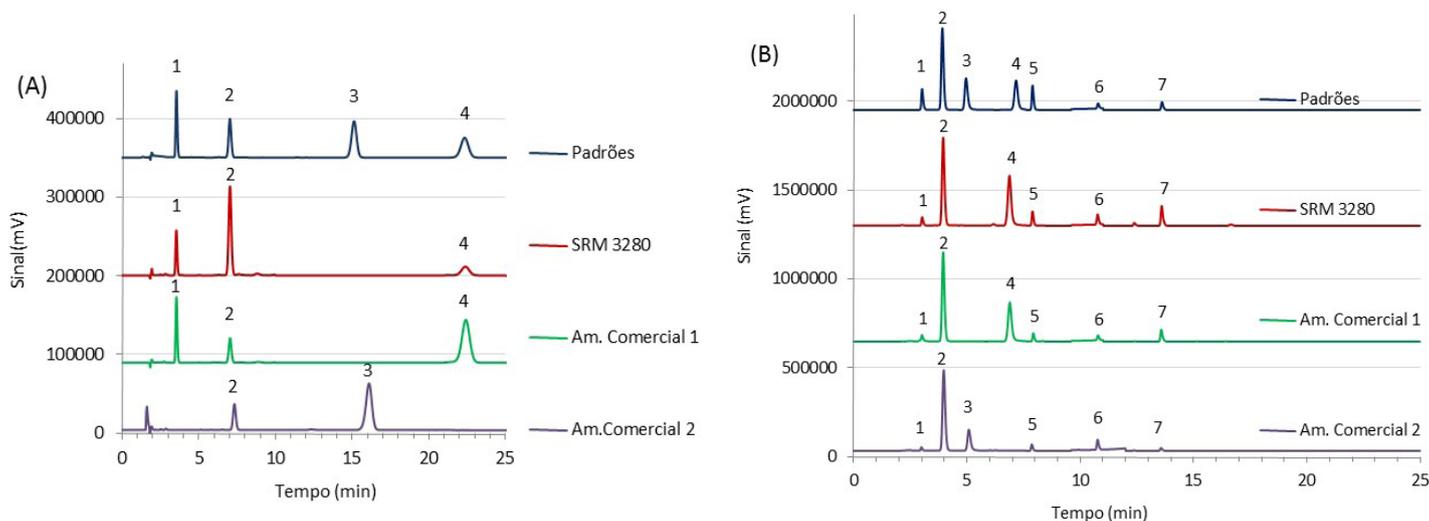


Figura 2. (A) Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos padrões e de extratos de material de referência SRM 3280 e de amostras comerciais em etanol com BHT. Picos cromatográficos: (1) acetato de retinol monitorado a 325 nm, (2) acetato de α -tocoferol monitorado a 284 nm, (3) palmitato de retinol monitorado a 325 nm e (4) β -caroteno monitorado a 450 nm. Condições cromatográficas descritas no item “metodologia”. (B) Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos padrões e de extratos de material de referência SRM 3280 e de amostras comerciais em tampão fosfato 0,05 M pH 3,0. Picos cromatográficos: (1) B1, (2) Vitamina C, (3) Ácido nicotínico, (4) Nicotinamida, monitorados a 254 nm, (5) B6 monitorado a 283 nm, (6) Ácido pantotênico monitorado a 209 nm, (7) B2 monitorado a 268 nm. Condições cromatográficas descritas no item “metodologia”

CONCLUSÃO

A análise simultânea das vitaminas lipossolúveis acetato e palmitato de retinol e de β -caroteno se mostrou vantajosa, já que em muitas amostras de suplementos, o fabricante não declara qual é a fonte de vitamina A.

Foi possível quantificar simultaneamente quatro vitaminas hidrossolúveis normalmente presentes nos suplementos vitamínicos, utilizando uma técnica de extração simples e rápida para a quantificação da vitamina C.

Os métodos propostos se mostraram adequados para análise de vitaminas A, E, B1, C, nicotinamida, B6 e ácido pantotênico em diferentes matrizes de suplementos vitamínicos como comprimidos, drágeas, cápsulas duras, cápsulas gelatinosas moles e soluções.

Com o aumento da comercialização e do consumo de suplementos vitamínicos pela população, a implantação destes métodos será importante para a rotina de análise, tanto em laboratórios privados, para seu controle de qualidade, quanto em órgãos fiscalizadores, para monitoramento destes produtos.

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (Processo nº 2013/23006-4).

REFERÊNCIAS

1. Alves SCR, Navarro F. O uso de suplementos alimentares por frequentadores de academias de Potim/SP. *Rev Bras Nutr Esportiva*. 2010;4(20):139-46.
2. Fayh APT, Silva CV, Jesus FRD, Costa GK. Consumo de suplementos nutricionais por frequentadores de academias da cidade de Porto Alegre. *Rev Bras Ciênc Esporte*. 2013;35(1):27-37. [DOI: 10.1590/S0101-32892013000100004].

3. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 27, de 6 de agosto de 2010. Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 9 ago. 2010.
4. Abe-Matsumoto LT, Sampaio GR, Bastos DHM. Suplementos vitamínicos e/ou minerais: regulamentação, consumo e implicações à saúde. *Cad Saúde Pública*. 2015;31(7):1371-80. [DOI: 10.1590/0102-311X00177814].
5. Blake CJ. Status of methodology for the determination of fat-soluble vitamins in foods, dietary supplements, and vitamin premixes. *J AOAC Int*. 2007;90(4):897-910.
6. Blake CJ. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389:63-76. [DOI: 10.1007/s00216-007-1309-9].
7. Citová I, Havlíková L, Urbánek L, Solichová D, Nováková I, Solich P. Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocoferol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns. *Anal Bioanal Chem*. 2007;388(3):675-81. [DOI: 10.1007/s00216-007-1237-8].
8. Maldaner L, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quím Nova*. 2009;32(1):214-22. [DOI: 10.1590/S0100-40422009000100036].
9. Klimczak I, Gliszczynska-Świgło A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food Chem*. 2015;175:100-5. [DOI:10.1016/j.foodchem.2014.11.104].
10. Pei Chen P, Wolf WR. LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387:2441-8. [DOI: 10.1007/s00216-006-0615-y].
11. Wilson N, Shah N. P. Review Paper: Microencapsulation of Vitamins. *ASEAN Food Journal*. 2007;14(1):1-14.
12. National Institute of Standards and Technology – NIST. Standard Reference Material. [acesso 2015 Out 08]. Disponível em: [https://www-s.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srm=3280].
13. Thomas JB, Sharpless KE, Yen JH, Rimmer CA. Determination of fat-soluble vitamins and carotenoids in standard reference material 3280 multivitamin/multielement tablets by liquid chromatography with absorbance detection. *J AOAC Int*. 2011;94(3):815-22.
14. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Official methods of analysis. 18th ed. Gaithersburg; 2005.
15. The United States Pharmacopeia – USP. 32nd ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2009.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set. 2005.
17. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. DOQ-CGCRE-008-Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev 04. Rio de Janeiro (RJ): Coordenação Geral de Acreditação; 2011.
18. Kand'ár R, Novotná P, Drábková P. Determination of retinol, α -tocopherol, lycopene, and β -carotene in human plasma using HPLC with UV-Vis detection: Application to a clinical study. *J Chem*. 2013; Article ID 460242, 7 p. [DOI: 10.1155/2013/460242].
19. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2002. [acesso 2015 Mar 02]. Disponível em: [http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf].
20. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de suplementos vitamínicos e ou de minerais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 15 jan. 1998.