

# 1 Introdução

A preocupação da população com questões referentes à qualidade de vida, nutrição, saúde e meio ambiente tem crescido consideravelmente nas últimas décadas. Esse contexto vem gerando a necessidade de um maior controle na determinação da composição química de micronutrientes em produtos alimentícios e farmacêuticos devido: (i) ao interesse pela definição das necessidades nutricionais em associação com a saúde; (ii) ao estabelecimento de padrões nutricionais de ingestão; (iii) à exigência de conformidade a requisitos legislativos dos valores quantitativos dos nutrientes declarados nos rótulos dos alimentos enriquecidos e vitaminados; (iv) à preocupação mundial quanto à confiabilidade na determinação dos valores declarados e a possível toxicidade de alguns destes nutrientes (Paixão, 2004).

Dentre os micronutrientes destaca-se o papel das vitaminas, as quais podem ser definidas como compostos orgânicos, essenciais em pequenas quantidades para dar suporte ao funcionamento fisiológico normal do organismo. As vitaminas são encontradas em pequenas quantidades na maioria dos alimentos, sendo classificadas como hidrossolúveis e lipossolúveis.

A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel que participa na biossíntese de várias proteínas envolvidas na coagulação sanguínea e homeostasia de cálcio (Mahan & Escott-Stump, 2005). Além de estar presente em vegetais de folhas verde-escuras, a vitamina K também pode ser encontrada em diversos outros alimentos, suplementos vitamínicos e formulações farmacêuticas, incluindo cosméticos. Naturalmente, a vitamina K se apresenta sob as formas de filoquinona (K1) e menaquinona (K2); e sua forma sintética é a menadiona (K3), que, no intestino, é convertida em K2.

Estados de deficiência de vitamina K são raros em indivíduos adultos saudáveis, no entanto podem ocorrer devido a: ingestão reduzida da vitamina, especialmente em recém-nascidos; hiperbilirubinemia em recém-nascidos; nutrição parenteral total durante longos períodos; alterações da absorção intestinal; uso de anticoagulantes cumarínicos e ingestão de megadoses de

vitaminas lipossolúveis A e E, os quais atuam como antagonistas da vitamina K, entre outros (Mahan & Escott-Stump, 2005, Shils, 2003).

Considerando o baixo conteúdo de vitamina K no leite materno, no início dos anos 1960 a Academia Americana de Pediatria recomendou sua administração exógena intramuscular no momento do nascimento (Combs Jr., 2008, *American Academy of Pediatrics*, 1961). Esta recomendação também é dada pelo Departamento de Nutrição da Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) (Sociedade Brasileira de Pediatria, 2008).

A hipovitaminose K também tem sido associada à hemorragia retroplacentária observada em abortamentos habituais (Klack & Carvalho, 1998).

A capacidade do organismo de armazenar a vitamina K é reduzida. Embora a definição das necessidades diárias de vitamina K seja adequada para manter a coagulação sanguínea em níveis normais, a mesma pode ser insuficiente para a manutenção do equilíbrio do metabolismo ósseo, entre outras funções exercidas por esta vitamina, caracterizando-se como uma deficiência subclínica (Vermeer & Hamulyak, 1991).

Estudos recentes vêm demonstrando efeitos benéficos da vitamina K na redução da resistência insulínica (Yoshida *et al.*, 2008); e também na elasticidade e clareamento cutâneos, tendo sido incorporada em produtos cosméticos. Por outro lado, a vitamina K pode inibir a ação de medicamentos anticoagulantes, e, portanto, é utilizada como antídoto para drogas cumarínicas (Klack & Carvalho, 2006). Também se emprega a vitamina K no tratamento da hipoprotrombinemia decorrente de disfunção hepática e em doenças cardiovasculares trombo-embólicas (Melchior, 2006; Triplett, 1998; Ferland, 1992; Klack & Carvalho, 2006).

De acordo com Cheng (2007) a administração exógena de vitamina K através do consumo de chá verde, pode inibir o efeito anticoagulante da varfarina. O chá verde é um dos chás mais consumidos nos países orientais, e seu consumo vem aumentando no ocidente devido às suas propriedades funcionais. Os benefícios do chá verde têm sido mostrados em diversos estudos, destacando-se a redução dos níveis de colesterol, os efeitos preventivos contra a arteriosclerose, a atividade antioxidante e a prevenção de doenças crônico-degenerativas, tais como o câncer e doenças cardiovasculares (McKay & Blumberg, 2002; Reto *et al.*, 2007). Como o uso de anticoagulantes é comum em pessoas com doenças cardiovasculares, e como o consumo de chá verde vem sendo associado a uma dieta saudável, a determinação de vitamina K presente

em folhas de chá verde e em suas infusões, se torna de fundamental importância.

Em aplicações terapêuticas se utiliza vitamina K1, administrada por via oral, intramuscular ou intravenosa (Melchior, 2006; Triplett, 1998; Ferland, 1992; Klack & Carvalho, 2006). No entanto, segundo os regulamentos (CE) n° 953 e n° 1170, ambos publicados em 2009 pela Comissão das Comunidades Europeias, tanto a vitamina K1 quanto a K2 (menaquinona-7 e em menor grau a menaquinona-6) podem ser adicionadas a alimentos ou estarem presentes em suplementos alimentares. Apesar da toxicidade, baixa atividade biológica e não ser recomendada por documentos regulatórios, em alguns países a vitamina K3 ainda é comercializada em formulações farmacêuticas, na forma de sais hidrossolúveis (Orsi *et al.*, 2008).

Recentemente, devido a relatos de casos de dermatite de contato alérgico no local de aplicação da vitamina K, a Diretiva 2009/6/EC da Comunidade Europeia incorporou esta vitamina à lista de substâncias que não devem estar presentes na composição de produtos cosméticos. No Brasil, com base na decisão da Comunidade Europeia e em estudos relatando casos de alergia devido ao contato com as vitaminas K1 e K3, a Anvisa emitiu um parecer proibindo o uso da vitamina K, em qualquer de suas formas, em produtos cosméticos (European Commission, 2009; Anvisa, 2010).

As técnicas comumente utilizadas na determinação de vitamina K são baseadas em Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) e Cromatografia gasosa (GC – *Gas Chromatography*) (Booth, *et al.*, 1994; Ahmed, *et al.*, 2007; Reto *et al.*, 2007).

Apesar da boa sensibilidade, possibilidade de separação de misturas complexas e alta resolução, as técnicas de medição por HPLC e GC apresentam como inconvenientes o alto consumo de solventes, o alto custo de consumíveis e a geração de quantidade relativamente grande de resíduos.

Dentro deste contexto e considerando o crescente interesse por métodos analíticos eficientes que atendam aos princípios da química verde para redução do impacto ambiental (Rodrigues *et al.*, 2010), torna-se relevante o desenvolvimento de “métodos limpos” para a determinação de vitamina K, seja em alimentos, seja em produtos farmacêuticos, capazes de reconhecê-la em suas diferentes formas, já que estas possuem distintas bioatividade e biodisponibilidade.

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica analítica cujo uso para quantificação de vitaminas vem crescendo (Cancalon, 2003). A técnica se

caracteriza por apresentar alta eficiência, tempos de análise reduzido e baixo consumo de solventes. A determinação de vitamina K utilizando a EC foi reportada apenas uma vez na literatura, em trabalho realizado por Tjornelund & Hansen (1997). No referido estudo, o método desenvolvido foi utilizado na determinação de vitamina K em formulações farmacêuticas. Um aspecto fundamental é a garantia da confiabilidade e comparabilidade dos resultados das medições obtidas por meio do método analítico, considerando, em particular para quantificação de vitamina K, as possíveis repercussões clínicas relacionadas a diagnósticos e condutas terapêuticas (Costa Monteiro, 2007; Anvisa, 2003a). Desta forma, é essencial utilizar ferramentas da metrologia, realizando procedimentos para a validação dos métodos e estimativa da incerteza de medição (Anvisa, 2003a; Inmetro, 2011a; ABNT, 2005).

**Validação** – Verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido.

Vocabulário Internacional de Metrologia, conceitos fundamentais e gerais e termos associados, 2012.

**Incerteza de Medição** – Parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas.

Vocabulário Internacional de Metrologia, conceitos fundamentais e gerais e termos associados, 2012.

A validação de métodos analíticos é uma das exigências das Boas Práticas de Fabricação por meio da resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) RDC nº 210 de 2003 e, em conjunto com a estimativa da incerteza de medição, é requisito da NBR:ISO/IEC 17025 (2005). A agência publicou em 2003 o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos por meio da Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (Anvisa, 2003a; Anvisa, 2003b, ABNT, 2005).

Na literatura são encontrados vários estudos para validação de métodos para quantificação de vitamina K utilizando HPLC, estes, porém, não apresentam a estimativa da incerteza de medição (Kienen *et al.*, 2007; Pironen *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2004). Nenhuma publicação sobre validação de eletroforese capilar para quantificação de vitamina K foi encontrada, já que o único estudo descrito na literatura, realizado por Tjornelund & Hansen (1997), não foi validado.

## 1.1.

### Objetivos geral e específico

O objetivo geral da dissertação é desenvolver e validar uma metodologia baseada na técnica de eletroforese capilar para a separação dos diferentes tipos de vitamina K, utilizando detecção espectrofotométrica na região do UV-vis, de modo a se ter uma nova ferramenta que atenda não só aos requisitos regulatórios nacionais para o setor de alimentos e produtos farmacêuticos, como também aos princípios da química verde.

Em termos específicos a dissertação busca:

- Identificar e estudar os documentos normativos e regulatórios existentes no Brasil e no mundo relacionados à quantificação de vitamina K em alimentos, medicamentos ou cosméticos e validação de métodos analíticos.
- Avaliar a importância da detecção e quantificação dos diferentes tipos de vitamina K, considerando aspectos regulatórios e clínicos.
- Identificar as principais técnicas analíticas existentes para quantificar vitamina K em alimentos e produtos farmacêuticos.
- Estudar os fundamentos em que se baseiam os processos de separação, pré-concentração e quantificação das vitaminas K, em alimentos e produtos farmacêuticos, utilizando a técnica de eletroforese capilar.
- Desenvolver um método utilizando a técnica de cromatografia eletrocínica capilar micelar (MEKC) para a separação das vitaminas K1 e K3, utilizando como base informações disponíveis na literatura para a separação de substâncias neutras por MEKC, realizando testes preliminares e otimizando os parâmetros críticos de modo a se obter um método com boa sensibilidade e resolução.
- Realizar a validação do método desenvolvido, considerando todos os parâmetros necessários ao atendimento de requisitos legislativos ou considerados adequados para o método.
- Estimar a incerteza da medição com base nas componentes mais relevantes ao processo e propor ações para minimizar as principais fontes de incerteza do método analítico identificadas.
- Aplicar o método desenvolvido em matrizes reais.

## 1.2.

### **Estrutura da dissertação**

Apresenta-se aqui, sucintamente, a estrutura da dissertação. São sete capítulos, compreendendo esta introdução, três capítulos de fundamentação teórica, um capítulo correspondente ao desenvolvimento do método, um capítulo referente aos resultados obtidos e a discussão, e o último capítulo contendo as conclusões da pesquisa.

No Capítulo 2, apresentam-se os principais conceitos referentes à importância e função de vitaminas, mais especificamente da vitamina K. Realiza-se um levantamento dos principais métodos existentes para a determinação desta vitamina, descrevendo-se suas características e aplicações.

No Capítulo 3, busca-se explorar o método proposto no trabalho, descrevendo os principais conceitos relacionados à técnica, bem como suas vantagens e aplicações.

Na sequência, o Capítulo 4 apresenta os principais organismos envolvidos na confiabilidade metrológica, as principais regulamentações relacionadas ao tema do presente trabalho, bem como os principais conceitos associados aos procedimentos de validação de métodos analíticos e estimativa da incerteza de medição.

No Capítulo 5, descreve-se a metodologia utilizada no desenvolvimento do método por cromatografia eletrocinética capilar micelar utilizando detecção espectrofotométrica na região do UV-vis, para quantificação de vitamina K.

Os resultados do trabalho são apresentados e discutidos no Capítulo 6.

No Capítulo 7 são apresentadas as principais conclusões da dissertação e indicadas sugestões para trabalhos futuros.