

## **2**

### **Vitaminas e Métodos de Determinação**

#### **2.1.**

##### **Vitaminas**

O termo vitamina é utilizado para descrever um grupo de micronutrientes essenciais que são encontrados em pequenas quantidades na maioria dos alimentos. As vitaminas são essenciais para o funcionamento fisiológico normal do corpo humano (isto é, manutenção, crescimento, desenvolvimento e reprodução) e as quantidades necessárias variam em função de: sexo, idade, massa, altura, necessidades energéticas, período gestacional e puerperal, atividade física, etc. (Paixão & Stamford, 2004; Silva & Mura, 2007; Mahan & Escott-Stump, 2005).

Os vitâmeros são as múltiplas formas de uma vitamina (todos os isômeros e análogos ativos) e determinam sua atividade biológica.

##### **2.1.1.**

###### **Classificação**

De acordo com suas funções metabólicas, as vitaminas são classificadas em quatro grupos: estabilizadores de membrana, doadores e receptores de hidrogênio e elétrons, hormônios e coenzimas (Mahan & Stump, 2005; Ball, 2004). As vitaminas também podem ser classificadas de acordo com sua solubilidade em dois grupos: lipossolúveis e hidrossolúveis. As hidrossolúveis tendem a ter um ou mais grupos polares ou ionizáveis como carboxila, aminoácido, fosfato, entre outros. Já as lipossolúveis apresentam predominantemente grupamentos aromáticos e alifáticos (Combs Jr, 2008; Paixão & Stamford, 2004; Silva & Mura, 2007; Mahan & Escott-Stump, 2005).

As vitaminas lipossolúveis são solúveis em gordura, sendo encontradas principalmente em alimentos com alto teor de gordura. Entre estas se encontram as vitaminas A, D, E e K. A absorção dessas vitaminas pelo intestino humano ocorre por meio da ação de sais biliares, sendo transportadas via circulação linfática juntamente com os lipídeos de cadeia longa, como triacilgliceróis de cadeia longa, para o fígado, e são geralmente excretadas com as fezes por meio

da circulação enterohepática. As vitaminas A e D são armazenadas principalmente no fígado, e a vitamina E nos tecidos adiposos e órgãos reprodutores. A capacidade de armazenamento de vitamina K é reduzida (Silva & Mura, 2007; Ball, 2004; Paixão & Stamford, 2004).

As vitaminas hidrossolúveis compreendem todas aquelas que são solúveis em água, como a vitamina C e as vitaminas do complexo B, as quais se dividem em: tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), cianocobalamina (B12), biotina, ácido fólico, niacina e ácido pantotênico. Estão presentes tanto em fontes animais quanto vegetais, possuem absorção facilitada, sendo conduzidas via circulação sistêmica e utilizadas quase em sua totalidade no metabolismo energético. Essas vitaminas não são armazenadas no organismo e todo excesso consumido é excretado através das vias urinárias (Silva & Mura, 2007; Ball, 2004).

As vitaminas apresentam uma variabilidade de formas químicas, logo o seu comportamento químico depende da forma química, sendo, portanto importante avaliar a característica e a forma predominante da vitamina (Silva & Mura, 2007).

### **2.1.2. Propriedades**

Por serem compostos orgânicos biologicamente ativos, as vitaminas estão suscetíveis a alterações físico-químicas quando expostas a determinados fatores como: temperatura, pH, umidade, luz, dentre outros. Logo, quando se fala em valor nutricional de um alimento é importante se considerar a estabilidade das vitaminas.

A estabilidade das vitaminas é um dos fatores que influenciam na sua biodisponibilidade, sendo esta a proporção de vitamina ingerida que será absorvida e utilizada pelo organismo (Silva & Mura, 2007; Mourão, 2005).

Na Tabela 1 apresentam-se as características de estabilidade das vitaminas.

Tabela 1: Estabilidade das vitaminas.

Vitaminas	Estabilidade
A	Rapidamente degradada pela luz, pelo oxigênio e por ácidos. Estável ao calor e à temperatura de cocção.
D	Destruída rapidamente pela luz, pelo oxigênio e por ácidos. Compostos cristalizados são relativamente estáveis ao calor.
E	O acetato de $\alpha$ -tocoferol é relativamente estável no ar, à umidade e na presença de alcális ou ácidos fortes. Estável ao calor, mas instável à luz.
K	Sensível à luz e lentamente destruída pelo oxigênio, relativamente estável ao calor, porém decomposta por álcoois.
Ácido Ascórbico	Quando em solução, pode ser facilmente oxidado, especialmente quando exposto à luz e ao calor.
Tiamina (B1)	Destruída em temperatura elevada, a menos que o pH seja inferior a 5. Em pH acima de 7, a tiamina perde sua atividade biológica.
Riboflavina (B2)	Estável ao calor, à oxidação e aos ácidos
Piridoxina (B6)	Estável ao calor em meio ácido, relativamente instável em soluções alcalinas e muito instável em presença de luz.
Cianocobalamina (B12)	Estável ao calor, porém instável à luz, podendo sofrer oxidação.
Biotina	Estável ao calor, solúvel em água e em álcool e suscetível a oxidação.
Ácido Fólico	Pode ser destruída em pH inferior a 4, porém estável em pH superior a 5.
Niacina	Estável ao calor, presença de oxigênio, luz, alcális e ácidos.
Ácido Pantotênico	Facilmente decomposto por ácidos ou bases. Razoavelmente estável durante o cozimento e armazenamento.

Fonte: Silva & Mura, 2007.

### 2.1.3. Vitamina K

A vitamina K foi descoberta em 1929 por Henrik Dam, o qual observou, em estudos realizados com frangos, que os animais alimentados com rações isentas de gordura apresentavam hemorragias sob a pele, nos músculos e em outros tecidos, e que havia um retardo na coagulação do sangue desses

animais. Assim, descobriu-se que o fator anti-hemorrágico era lipossolúvel (Shils, 2003; Ball, 2004).

Em 1939, Dam, Doizy e Karrer isolaram os fatores com atividade anti-hemorrágica, os quais foram denominados em conjunto de vitamina K, por conta da primeira letra de *koagulation*, de origem escandinava e alemã (Dam, 1946; Sadler, 2004).

O termo vitamina K é utilizado para descrever todas as substâncias que têm como núcleo o grupamento 2-metil-1,4-naftoquinona, bem como seus derivados que exibem atividade anti-hemorrágica (Rucker, 2001). As fórmulas estruturais das vitaminas K são apresentadas na Figura 1.

A vitamina K está presente na natureza em duas formas principais: a filoquinona (2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona), também chamada de vitamina K1, sintetizada pelos vegetais verdes, e as menaquinonas, também chamadas de vitamina K2, que são produzidas por muitos microrganismos, incluindo bactérias do trato intestinal de um grande número de espécies. A família das menaquinonas é constituída por uma série de vitaminas designadas MK-n, onde o n representa o número de resíduos isoprenóides na cadeia lateral, podendo variar de MK4 a MK13. Ambas as formas naturais possuem um anel 2-metil-1,4-naftoquinona e cadeias laterais alquiladas (Rucker, 2001; Dores & Paiva, 2011; Mahan & Escott-Stump, 2005).

A menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona), também denominada de vitamina K3, é um composto sintético, duas vezes mais potente biologicamente se comparado às formas naturais de vitaminas K1 e K2. As menadionas não possuem cadeia lateral podendo, porém, ser alquiladas no fígado para produzir menaquinonas, sendo muito utilizadas como fonte de vitamina em rações animais (Silva & Mura, 2007; Dores & Paiva, 2011; Mahan & Escott-Stump, 2005).

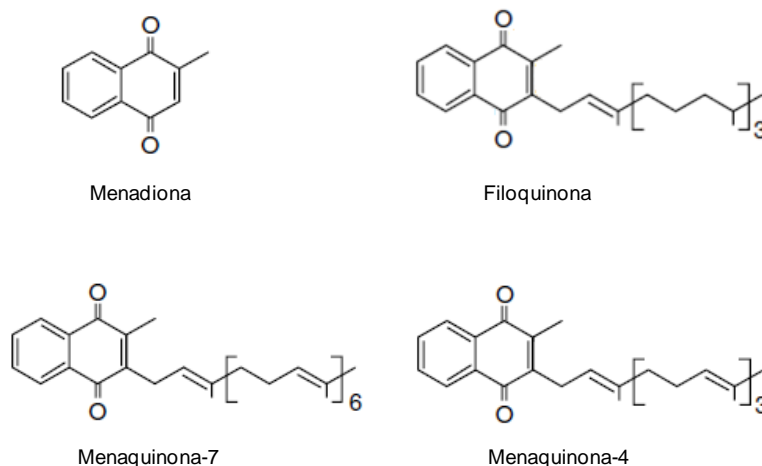


Figura 1: Fórmulas estruturais das vitaminas K (Fonte: Shils, 2003).

A filoquinona se apresenta como um óleo com coloração amarela em temperatura ambiente, já as demais formas se apresentam como cristais amarelos. Sendo vitaminas lipossolúveis, são insolúveis em água e facilmente solúveis em éter, clorofórmio, óleos, e etc. Quando oxidadas levam a formação da forma 2,3- epóxido e sendo naftoquinonas podem ser reduzidas aos grupos hidroquinonas correspondentes (Combs Jr, 2008).

### **2.1.3.1. Ocorrência**

A filoquinona é a principal forma de vitamina K presente em alimentos, sendo encontrada principalmente em vegetais de folhas verde-escuras, como o repolho, nabo, brócolis e alface, os quais contêm em média níveis maiores do que 100 µg/100 g. Os óleos e gorduras também são considerados importantes fontes de filoquinona, apresentando teores que variam de 0,3 a 193 µg por 100 g de alimento. Produtos de laticínio, carnes e ovos têm seu conteúdo de vitamina variando de 1 a 50 µg.g<sup>-1</sup>, já frutas e cereais contém cerca de 15 µg.g<sup>-1</sup> (Shils, 2003).

O leite humano contém menos de 1 a 2 ng.mL<sup>-1</sup> de filoquinona, um pouco menos se comparado ao leite de vaca, sendo considerado uma fonte pobre desta vitamina, não oferecendo portanto o teor de vitamina necessário para lactentes menores de 6 meses de idade (Rucker, 2001; Mahan & Escott-Stump, 2005).

A vitamina K1 (filoquinona), também está presente em quantidades significativas em chás, variando em função de fatores como: estocagem, condições geográficas e processamento. O chá preto tem seu conteúdo variando de 0,02 µg/100 g (chá preto pronto) a 945 µg/100 g (folha de chá preto), e o chá verde de 0,03 µg/100 g (chá verde pronto) a 1654 µg/100 g (folha de chá verde) dependendo da forma utilizada (Klack & Carvalho, 2006).

Em relação à quantidade de vitamina K2 em alimentos, a literatura disponibiliza poucos dados. A principal fonte desta vitamina é o fígado de diversas espécies animais, porém também pode ser encontrada em gemas de ovo, manteiga e produtos fermentados a base de soja (Dores & Paiva, 2001).

A vitamina K também pode ser oferecida em suplementos vitamínicos, os quais são amplamente utilizados em tratamentos nutricionais, e em forma de medicamentos. No entanto, é recomendado que a suplementação seja feita apenas em situações onde não exista a possibilidade de atingir os valores

diários recomendados para esta vitamina através da alimentação e que a utilização desta vitamina na forma de medicamento seja realizada apenas com acompanhamento médico.

A forma de vitamina K mais utilizada em aplicações clínicas é a filoquinona, sendo as vitaminas K recomendadas em tratamentos de doenças como hipoprotrombinemia (baixas quantidades de protrombina), doenças tromboembólicas, cardiovasculares e síndrome antifosfolípide. Ela é administrada na forma de injeções intravenosas e intramusculares, ou usada como suspensão coloidal, emulsão ou suspensão aquosa e como comprimido para utilização oral (Melchior, 2006; Triplett, 1998; Ferland, 1992; Klack & Carvalho, 2006).

Apesar de apresentar problemas de toxicidade e possuir baixa atividade biológica, a vitamina K3 ainda é comercializada em muitos países em formulações farmacêuticas, na forma de sais hidrossolúveis (Orsi *et al.*, 2008).

#### **2.1.3.2.**

#### **Absorção, transporte e metabolismo de vitamina K**

A absorção da filoquinona (K1) ocorre no intestino delgado e é um processo dependente de energia. Já as menaquinonas (K2) e menadionas (K3) são absorvidas no intestino delgado e cólon por um processo de difusão passiva. Sendo vitaminas lipossolúveis, a absorção destas requer a presença de sucos biliar e pancreático para a sua efetividade máxima, bem como uma dieta com um mínimo de gordura, a qual estimula a formação de micelas e secreção biliar (Mahan & Escott-Stump, 2005; Shils, 2003).

A vitamina absorvida é incorporada aos quilomícrons e levada até o fígado via sistema linfático. No fígado parte da vitamina é armazenada, parte é oxidada a produtos finais inativos e parte é incorporada às VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) sendo em seguida distribuídas pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para tecidos periféricos (Mahan & Escott-Stump, 2005; Shils, 2003).

A eficiência de absorção da vitamina K1 pode ser muito variada, dependendo do veículo de administração. Gijsbers (1995) realizou um estudo sobre a influência de diferentes fontes de vitamina K na sua absorção por meio da medição da concentração da vitamina no sangue de voluntários submetidos a três diferentes fontes. Os resultados demonstraram que a filoquinona sintética foi absorvida mais rapidamente quando comparada às duas outras formas de

administração. Estes resultados indicam que a biodisponibilidade da vitamina K é menor do que geralmente se supõe, e apontam para a necessidade de uma revisão da sua ingestão diária recomendada (Gijbers, 1996).

A baixa taxa de absorção da vitamina K pode ser devida a fatores relacionados com a digestão da mesma e com o fato desta vitamina, presente em grandes quantidades em vegetais verde-escuros, se apresentar intimamente ligada à membrana dos tilacóides no cloroplasto, mesmo após o processo de cozimento dos vegetais, o que dificulta sua absorção (Combs Jr, 2008). No entanto, em alimentos processados como óleo, margarina e produtos lácteos a absorção desta vitamina é mais eficiente (Mourão, 2005).

As filoquinonas são reduzidas a hidronaftoquinona, cofator ativo para a carboxilase, ao alcançar o fígado e podem, por ação bacteriana, ser convertidas em menaquinonas por desalquilações e realquilações sucessivas antes da absorção. A metabolização das menadionas é mais rápida se comparada à filoquinona, sendo excretada na urina como um derivado de fosfato, sulfato ou glucuronídeo (Dores & Paiva, 2001; Mahan & Escott-Stump, 2005; Mourão, 2005).

### **2.1.3.3. Função**

A vitamina K tem como função principal promover a síntese dos fatores de coagulação sanguínea, atuando como co-fator para a carboxilação de resíduos específicos de ácido glutâmico para formar o ácido gama carboxiglutâmico (Gla), aminoácido presente nos fatores de coagulação (fatores II, VII, IX e X) e que se apresenta ligado ao cálcio (Klack & Carvalho, 2006; Silva & Mura 2007; Rucker, 2001). Neste processo a vitamina K é oxidada a um epóxido e em seguida retorna a sua forma hidroquinona por meio da ação da enzima epoxidoreductase (Figura 2). Este processo é conhecido como o ciclo da vitamina K. A enzima epoxidoreductase é inibida por agentes anticoagulantes cumarínicos como a varfarina e o dicumarol (Mahan & Escott-Stump, 2005; Shils, 2003). Durante a coagulação ocorre a formação de fibrina insolúvel a partir do fibrinogênio, essa transformação ocorre através da ação da trombina (enzima proteolítica), a qual se origina da protrombina (fator II), através de fatores dependentes da vitamina K: a pró-convertina (fator VII), o fator anti-hemofílico B (fator IX) e o fator Stuart (fator X).

Existem ainda diversos outros grupos de proteínas dependentes da vitamina K que estão ligados à homeostasia de cálcio, como a osteocalcina, uma das mais frequentes proteínas não-colagenosas na matriz extracelular do osso, também conhecida como proteína GLA, por conter o ácido gama carboxiglutâmico. Pesquisas têm apontado a vitamina K como um importante fator no processo de mineralização óssea, sendo essencial tanto no desenvolvimento precoce do esqueleto, quanto na manutenção do osso maduro sadio (Mahan & Escott-Stump, 2005; Shils, 2003).

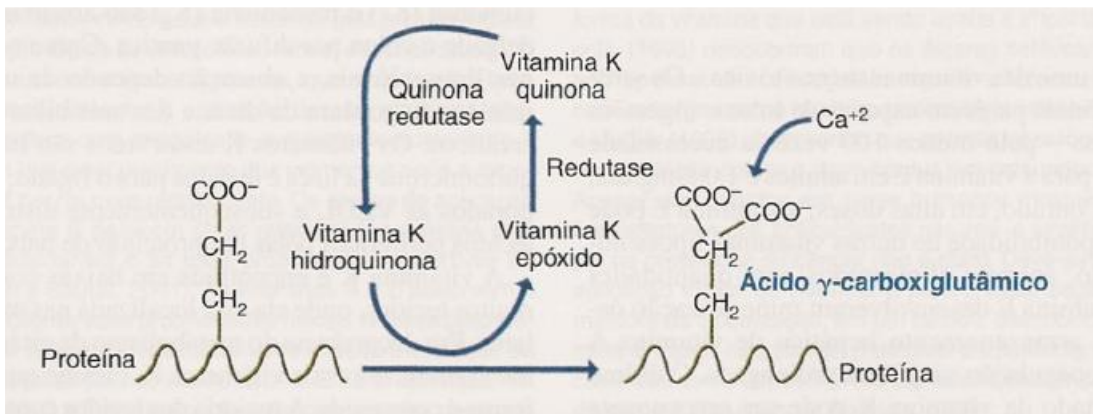


Figura 2: Função e regeneração da vitamina K na produção de ácido  $\gamma$ - carboxiglutâmico (Fonte: Mahan & Escott-Stump, 2005).

Uma dieta rica em vitamina K também tem sido associada à redução da resistência insulínica (Yoshida *et al.*, 2008). Estudo realizado por Joline W.J. Beulens, da Universidade de Utrecht, na Holanda, com cerca de 38.000 pessoas, demonstrou que os participantes que consumiam grandes quantidades de vitamina K através da alimentação apresentaram um risco 20% menor de desenvolver diabetes tipo 2. Apesar do desconhecimento do mecanismo de ação pelo qual a vitamina proporciona esta proteção, os pesquisadores suspeitam que a vitamina K atue reduzindo a inflamação sistêmica, melhorando assim a ação da insulina e consequentemente regulando os níveis de açúcar no sangue (Beulens *et al.*, 2010).

Estudo realizado por Gheduzzi *et al.* (2007) em pacientes que apresentavam pseudoxanthoma elasticum (PXE), uma doença hereditária que causa o enrugamento severo da pele do rosto e do corpo, demonstrou que a vitamina K também está associada à elasticidade cutânea, já que indivíduos incapazes de metabolizar a vitamina K apresentavam sintomas desta doença. Esse estudo também destaca a tendência mundial de “nutricosméticos”, os



chamados alimentos da beleza. A vitamina K vem sendo utilizada em produtos cosméticos para amplas finalidades como: clareamento de pele, atenuação de olheiras, hidratação, tratamento de púrpura traumática e actínica, além de hematomas resultantes de laserterapia (European Commission, 2009).

Estudos realizados com modelos animais e testes realizados em humanos têm demonstrado que a vitamina K também pode agir na redução da carcinogênese (Lamson, 2003). Segundo estes estudos, o efeito varia de acordo com as diferentes formas da vitamina e envolve diferentes mecanismos de ação: estresse oxidativo em células malignas, modulação dos fatores de transcrição e inibição do ciclo celular (Lamson, 2003, Combs Jr, 2008).

#### **2.1.3.4. Deficiência de Vitamina K**

A deficiência de vitaminas pode ser definida como a escassez da oferta de uma vitamina em relação às necessidades de um organismo em particular, podendo ser classificada como primária quando decorrente da ingestão inadequada, ou secundária quando devida a fatores como: má absorção, excreção aumentada, maior exigência nutricional, uso de medicamentos que interferem na absorção da vitamina ou aumento da necessidade em decorrência de doenças, entre outros (Ball, 2004; Combs Jr, 2008).

A hemorragia é o principal sinal de deficiência de vitamina K, que em casos graves pode levar a anemia fatal, sendo as principais causas: inadequação alimentar, doença hemorrágica do recém-nascido, nutrição parenteral total, síndrome de má absorção, doença hepática e terapia medicamentosa (Mahan & Escott-Stump, 2005, Shils, 2003).

Em adultos saudáveis a deficiência primária pode ser considerada rara devido a diversos fatores como: ampla distribuição em tecidos e plantas, conservação por meio do ciclo da vitamina K e síntese de menaquinona pela microflora intestinal. No entanto, pode ocorrer a deficiência em indivíduos que apresentam baixa ingestão da vitamina associada ao uso de determinados medicamentos e em pacientes debilitados tratados ou não com antibióticos após uma cirurgia (Dores, 2001; Shils, 2003).

No entanto, de acordo com Vermeer & Hamulyák (1991) o estado de deficiência de vitamina K é aquele no qual pelo menos uma proteína-Gla encontra-se descarboxilada. Pode-se considerar, portanto, que parte substancial da população é bioquimicamente deficiente em vitamina K (deficiência subclínica

da vitamina), já que a carboxilação completa das proteínas-Gla ósseas requer maiores quantidades de vitamina K.

A doença hemorrágica do recém-nascido (HDN) é uma das principais causas de mortalidade infantil e se caracteriza por tendência a hemorragia intracraniana, na pele, gastrointestinal e nasal, normalmente se manifesta entre 1 a 7 dias após o parto. Diversos fatores contribuem para esta deficiência, entre eles estão: baixo transporte de lipídeos pela placenta; limitada reserva de vitamina K; esterilidade do intestino infantil durante os primeiros dias de vida; baixo conteúdo de vitamina K em leite materno; imaturidade do fígado neonatal para a síntese de protrombina (Shils, 2003; Combs Jr, 2008). Já em crianças entre 1 a 3 meses pode haver o aparecimento da doença hemorrágica tardia (LHD), a qual apresenta as mesmas manifestações clínicas que a HDN e está relacionada à má absorção ou doença hepática (Figueiredo, 1998).

O baixo conteúdo de vitamina K em leite humano ( $1-2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) comparado às necessidades do recém-nascido ( $5 \mu\text{g.d}^{-1}$ ) responde pela tendência de crianças alimentadas exclusivamente com leite materno desenvolverem esta síndrome hemorrágica. Devido a este fator, associado ao fato do leite materno ser estéril, retardando assim a colonização do intestino por bactérias, a OMS recomenda a administração profilática de 1 mg de vitamina K intramuscular a todos os recém-natos (Shils, 2003; Puckett, 2007).

Segundo estudos realizados por Carlin & Walker (1991), indivíduos submetidos à Nutrição Parenteral Total (NPT) durante longos períodos de tempo também podem apresentar deficiência de vitamina K.

Outros fatores como o uso de determinados medicamentos (salicilatos e antibióticos de amplo espectro) e a ingestão excessiva de determinadas vitaminas (megadoses de vitaminas A e E) podem também contribuir para a deficiência de vitamina K, já que estes atuam antagonizando a ação desta vitamina (Shils, 2003; Combs Jr, 2008; Rucker, 2001).

#### **2.1.3.5. Toxicidade**

Algumas vitaminas podem ser tóxicas se ingeridas em excesso, por isso existem recomendações nutricionais que trazem os limites seguros de ingestão baseados em estudos científicos. Estas recomendações devem ser suficientes para prevenir deficiências, evitando a toxicidade (Silva & Mura, 2007; WHO, 2001).

De acordo com a literatura nem as filoquinonas nem as menaquinonas demonstraram qualquer efeito adverso por qualquer das vias de administração (Shils, 2003; Mahan & Stump, 2005). No entanto, considerando a ação da vitamina K na síntese dos fatores de coagulação sanguínea, a administração exógena de vitamina K pode inibir o efeito de medicamentos anticoagulantes (Klack & Carvalho, 2006; Cheng, 2007).

Recentemente, após a ocorrência de casos de dermatite de contato alérgica no local de aplicação de vitamina K e relatos de dermatoses ocupacionais alérgicas relacionadas à vitamina K contida em cremes cosméticos (Sommers, 2002, Romaguera, 1980), a Diretiva 2009/6/EC da Comunidade Européia incorporou em 2009 a vitamina K à lista de substâncias que não devem estar presentes na composição de produtos cosméticos.

Conforme mencionado no sub-item 2.1.3.1., a menadiona e seus derivados hidrossolúveis podem ser tóxicos em doses excessivas, pois ao se combinarem com grupamentos sulfidríla em membranas causam anemia hemolítica, hiperbilirrubinemia e icterícia em crianças. Sendo assim, a menadiona não deve ser utilizada como forma terapêutica da vitamina K (Shils, 2003; Mahan & Stump, 2005).

## **2.2. Métodos de determinação de vitaminas**

Existem diversas técnicas para a determinação de vitaminas. A seguir se resume as técnicas analíticas até então relatadas na literatura para a determinação de vitamina K as quais podem ser divididas em duas categorias principais: bioensaios e métodos físico-químicos.

### **2.2.1. Bioensaios**

Os bioensaios são métodos que avaliam a resposta de um organismo à determinada dieta. A determinação do teor de vitamina K em alimentos foi realizada, por muitos anos, por meio de bioensaios baseados na resposta de frangos deficientes. Neste método uma pequena quantidade do material a ser analisado é adicionado à dieta dos animais e em seguida o nível de protrombina é determinado. Uma comparação com uma curva dose-resposta utilizando a filoquinona como padrão é então realizada (Shils, 2003; Rucker, 2001).

A sensibilidade deste bioensaio é de 0,2  $\mu\text{mol}$  (0,1 mg) de filoquinona por quilograma de alimento, porém o método não identifica a forma de vitamina K presente no material avaliado e tende a superestimar a concentração de filoquinona. Além disso, a existência de diferenças nas taxas de absorção dos nutrientes dos alimentos usados tornam os bioensaios orais métodos pouco confiáveis (Shils, 2003; Rucker, 2001).

### **2.2.2. Métodos físico-químicos**

Os principais métodos físico-químicos para a determinação de vitamina K incluem: métodos fotométricos, cromatografia de camada fina, cromatografia à gás e cromatografia líquida de alta eficiência.

Apesar da determinação da vitamina K poder ser realizada por uma variedade de reações colorimétricas ou outros métodos espectroscópicos, os ensaios colorimétricos carecem de especificidade para a vitamina, já que eles se baseiam na reatividade do núcleo naftoquinona que como outras quinonas reagem basicamente com agentes de derivatização em uma série de ensaios colorimétricos e fluorimétricos. Todas as análises envolvendo extratos de vitamina K devem ser realizadas em condições de luminosidade reduzida de modo a evitar a degradação fotoquímica da mesma. Naftoquinonas como a vitamina K são sensíveis a álcalis, e relativamente estáveis à oxidação e ao calor (Rucker, 2001).

Na cromatografia gasosa (GC) é necessário que a amostra seja suficientemente volátil, a fim de que possa passar através da coluna na forma de vapor, e estável termicamente, para não se decompor nas condições de separação. Os métodos de detecção utilizados em GC são mais rápidos e sensíveis. No entanto, esta técnica não é apropriada para a determinação de vitaminas lipossolúveis, já que estas possuem baixa volatilidade (Giacomi, 2006).

A cromatografia de camada fina (TLC) é um procedimento simples e econômico quando se pretende realizar uma separação rápida. Tradicionalmente, a TLC é um método de análise qualitativa, mas pode ser utilizada como um método quantitativo utilizando-se a detecção da fluorescência da mancha específica para o analito de interesse (Skoog & Leary, 1992).

Estudo realizado por Van Koestveld *et al.* (1950) desenvolveu um método colorimétrico para a determinação de vitamina K3 em forragens fortificadas,

utilizadas como suplementos em rações animais. O percentual de recuperação obtido foi de 97% com um limite de detecção de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$ .

Reto *et al.* (2007) desenvolveram um método para determinação de vitamina K utilizando um procedimento baseado na microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID). Este método foi aplicado na análise de vitamina K1 e K2 presente em chá verde, os limites de detecção obtidos para as vitaminas foram de  $0,16 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,07 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente, já os limites de quantificação foram de  $0,54 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,23 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente. A repetitividade do método expressa como desvio padrão relativo (RSD) foi de 8,4% e 4,7% para as vitaminas K1 e K2, respectivamente. Em todas as infusões de chá analisadas a concentração de vitamina K se apresentou inferior ao limite de detecção do método.

Em relação à determinação de vitamina K por eletroforese capilar, encontrou-se na literatura apenas o trabalho realizado por Tjornelund & Hansen (1997), o qual consistiu no desenvolvimento de um método por eletroforese capilar não aquoso para a separação de substâncias hidrofóbicas. O método desenvolvido foi utilizado na determinação de vitamina K e os conservantes metilparabem e propilparabem, presentes em formulações farmacêuticas.

Na Tabela 2 são resumidas algumas condições e características dos métodos para a determinação de vitamina K por espectrofotometria de absorção, de fluorescência, por cromatografia a gás e de camada fina e por eletroforese capilar não aquosa.

Tabela 2: Métodos físico-químicos para determinação de vitamina K.

Vitamina K	Método	Sistema de Quantificação	Condições	Limite de detecção	Aplicação	Fonte
Filoquinona	Cromatografia de camada fina	Cromatografia gasosa e densitometria	Solventes: Cloreto de metileno:metanol 7:3 v/v	-	Fígado bovino	Madden <i>et al.</i> , 1993
Menaquinona	Cromatografia em papel	Absorção UV 248 nm	Solventes: etanol:ácido acético glacial:água 8,5:0,25:1,25 v/v/v	-	Cultura de microrganismos	Jacobsen <i>et al.</i> , 1960
Filoquinona e compostos derivados	Cromatografia em papel	Fluorescência	Solvente: álcool isopropílico	0,5 ug	-	Green <i>et al.</i> , 1954
Menaquinona	Espectrofotométrico	Absorção UV	Solvente: n-hexano Purificação: coluna cromatográfica	-	Cultura de microrganismos	Gale <i>et al.</i> , 1962
Filoquinona e Menaquinona	Cromatografia à Gás	Detector por ionização em chama	Gás arraste: hélio 1 ml/min Temperatura: 90° - 300°C, taxa 10°/min e 13 min a 300°C	K1: $1,6 \times 10^{-4}$ g.L <sup>-1</sup> K2: $0,7 \times 10^{-4}$ g.L <sup>-1</sup>	Chá verde	Reto <i>et al.</i> , 2007
Menadiona	Método colorimétrico	Formação de Hidrazona	Solvente: benzeno:etanol 2:3 v/v Purificação: coluna cromatográfica	$5 \times 10^{-4}$ g.L <sup>-1</sup>	Forragem fortificada	Van Koestveid <i>et al.</i> , 1950
Filoquinona	Eletroforese capilar não aquosa	UV 254 nm	Eletrolito de corrida: 20 mM de brometo de tetradecilamonio em propileno carbonato, injeção por pressão (3,5 kPa) por 3 s, V = 25kV, T = 25°C e detecção em 254 nm	-	Solução farmacêutica	Tjornelund <i>et al.</i> , 1997.

Dentre os métodos físico-químicos utilizados na determinação de vitaminas lipossolúveis os baseados na cromatografia líquida de alta eficiência são os mais empregados, sendo, portanto, melhores detalhados a seguir.

A cromatografia líquida é um processo de separação de substâncias, baseado nos diferentes graus de retenção das substâncias presentes na fase móvel líquida que ocorre quando essas substâncias interagem com a fase estacionária sólida (Skoog & Leary, 1992).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC - *High-Performance liquid chromatography*), onde o sistema opera em alta pressão, é uma técnica versátil e muito utilizada na determinação de vitaminas lipossolúveis em uma variedade de matrizes, tais como alimentos, fluídos biológicos e suplementos farmacêuticos (Degani, 1998).

Na determinação de vitaminas por HPLC utilizam-se dois tipos de colunas analíticas: as de fase normal e as de fase reversa, cujas diferenças se devem à natureza dos grupos funcionais da fase estacionária. As colunas de fase normal possuem grupos funcionais polares, como sílica. Já as de fase reversa são revestidas em grau variável com polímeros apolares, como o octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18). A cromatografia em fase reversa é a técnica mais comumente citada na literatura na determinação de vitamina K (Lebre, 2000; Paixão & Stamford, 2004).

Na Tabela 3 são resumidas algumas condições e características dos métodos para a determinação de vitamina K por HPLC.

Tabela 3: Métodos físico-químicos para determinação de vitamina K (HPLC).

Vitamina K	Sistema de detecção	Tipo de coluna	Fase móvel	Limite de detecção	Aplicação	Fonte
Filoquinona Menaquinona (MK-4) Menaquinona (MK-7)	Fluorescência 254 nm	Develosil ODS UG-5	Imidazol-HNO <sub>3</sub> tampão (600 mM, pH 9.0) + acetonitrila (5:95, v/v)	K1: 3,2 nM MK-4: 3,8 nM MK-7: 8,5 nM	Plasma humano	Ainmed <i>et al.</i> , 2007
Filoquinona	Fluorescência 244- 420 nm	Coluna de fase reversa (Luna C18; 250 x 4.6 mm) Coluna de guarda (34 mm)	Metanol:Etanol (80:20, v/v)	0,08 nmol.L <sup>-1</sup>	Plasma humano	Azharuddin <i>et al.</i> , 2007
Filoquinona (dihidrovitamina K1)	Fluorescência 244/418 nm Redução com zinco (reator 50 x 2.0 mm)	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Diclorometano-metanol (20:80, v/v) + 10 mM ZnCl <sub>2</sub> , 5 mM CH <sub>3</sub> COOH e 5 mM NaAc	-	Vários Alimentos	Both <i>et al.</i> , 1994
Filoquinona	Fluorescência 243/430 nm Redução com zinco (reator 20 x 4.0 mm)	YMC C30 (250 x 4.6 mm, 3 µm)	Diclorometano-metanol (10:90, v/v) + 10 mM ZnCl <sub>2</sub> , 5 mM CH <sub>3</sub> COOH e 5 mM NaAc	-	Margarina	Cook <i>et al.</i> , 1999
Filoquinona (dihidrovitamina K1)	Fluorescência 248 / 418 nm Redução com zinco (reator 20 x 3.9 mm)	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Diclorometano-metanol (20:80, v/v) + 10 mM ZnCl <sub>2</sub> , 5 mM CH <sub>3</sub> COOH e 5 mM NaAc	-	Óleos e vegetais	Ferland <i>et al.</i> , 1992
Filoquinona	Fluorescência 243, 272 e 330 nm	C18 fase reversa	Diclorometano-metanol + ZnCl <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> COOH e NaAc	0,04 µg.L <sup>-1</sup> (plasma)	Alimentos, tecidos e sangue	Alakob <i>et al.</i> , 1999
Filoquinona	Fluorescência 244 / 430 nm Redução com zinco (reator 20 x 3.9 mm)	Hypersil BDS-C18 (3.2 x 150 mm)	Componente A: 994,5 ml Metanol, 5.5 ml de solução aquosa (2 M Cloreto de Zinco + 1M ácido acético + 1 M acetato de sódio) Componente B: 100% de diclorometano	4,4 x 10 <sup>-8</sup> g.L <sup>-1</sup>	Plasma humano e amostras de sangue	Wang <i>et al.</i> , 2004
Filoquinona	Deteção eletroquímica (EC) - 1,1V/+0V	Vydac 201 TP54 column	96% Metanol 0.05 M Tampão NaAc (pH 3)	-	Vegetais e frutas	Koivu <i>et al.</i> , 1997



Filoquinona	UV 230 nm	C-18 (250 x 4.6mm)	3% v/v SDS + 15% v/v álcool butílico + 20 mM tampão fosfato (pH 7,0)	0,83 mg.L <sup>-1</sup>	Alimentos e suplemento farmacêutico	Kienen <i>et al.</i> , 2007
Filoquinona Menaquinona Menadiona	UV 245 nm	C18 fase reversa	Metanol-Etanol (85:15, v/v) + 0.1% Trietilamina	K1: 2.5 x 10 <sup>-4</sup> g.L <sup>-1</sup> K2: 2.0 x 10 <sup>-4</sup> g.L <sup>-1</sup> K3: 2.0 x 10 <sup>-5</sup> g.L <sup>-1</sup>	Plasma humano	Man Po <i>et al.</i> , 1996
Filoquinona	UV 248 nm	C18 µ-Bondapak (10 µm, 300 x 3.9 mm; Millipore Corp., Milford, MA, USA)	Acetonitrila/Diclorometano/metanol (60:20:20, v/v/v)	-	Azeite, azeite e plasma humano	Ottes <i>et al.</i> , 2007
Filoquinona	Fluorescência (244-430 nm) Redução com zinco	Spherisorb Ultrasphere ODS Beckman (Palo Alto, CA, USA)	95% Eluente A (994.5 mL de Metanol + 5.5 mL de solução 2 M de ZnCl <sub>2</sub> , 1 M CH <sub>3</sub> COONa, 1 M CH <sub>3</sub> COOH) e 5% eluente B (etanol).	1,8 x 10 <sup>-7</sup> g.L <sup>-1</sup>	Plasma humano	Paroni <i>et al.</i> , 2008
Filoquinona	UV 254 nm	LiChroCart® Si-60 Lichrosphere	0.025% n-amil álcool em n-hexano	5 x 10 <sup>-3</sup> g.L <sup>-1</sup>	Compostos granulados	Petriz <i>et al.</i> , 2005
Filoquinona Menaquinona	Fluorescência 243/430 nm Redução com zinco (reator 20 x 4.0 mm)	C18 (100 x 8 mm id)	Diclorometano-metanol (10:90 v/v) + 10 mM ZnCl <sub>2</sub> , 5 mM CH <sub>3</sub> COOH e 5 mM NaAc	1,5 ug.L <sup>-1</sup>	Leite e fórmulas infantis	Indyk <i>et al.</i> , 1997
Filoquinona	EC -1.2 V / +1.5 V	OD-224, RP18 (220 x 4.6 mm, 5 µm)	Metanol:água (99:1 v/v) +2.5 mM CH <sub>3</sub> COOH / NaAc	6,2 x 10 <sup>-7</sup> g.L <sup>-1</sup>	Leite humano	Zamarreno <i>et al.</i> , 1995
Filoquinona Menaquinona (MK-4)	Eletroquímico	Waters Guard-Pak (Millipore, Milford, MA, USA)	1% de dietil éter em n-hexano	K1: 1.6 x 10 <sup>-7</sup> g.L <sup>-1</sup> MK-4: 6.7 x 10 <sup>-8</sup> g.L <sup>-1</sup>	Óleo, margarina e manteiga	Piironen <i>et al.</i> , 1996
Filoquinona Menadiona	UV 333 nm	Zorbax Eclipse XDB C18	Acetonitrila/Metanol (75:25%)	K1: 5.0 x 10 <sup>-3</sup> g.L <sup>-1</sup> K3: 1.0 x 10 <sup>-3</sup> g.L <sup>-1</sup>	Cosméticos	Orsi <i>et al.</i> , 2008

Devido à grande variedade de métodos para a determinação de vitamina K por HPLC, são apresentados apenas os métodos desenvolvidos mais recentemente, os quais utilizam as mesmas substâncias do presente trabalho.

Em 1997, Man Po *et al.* propuseram um método para a separação de oito vitaminas lipossolúveis, utilizando HPLC e detecção por fotometria de absorção no UV. O método foi aplicado a amostras de plasma enriquecido com vitamina padrão. O percentual de recuperação para as vitaminas K1, K2 e K3 variou de acordo com o solvente utilizado na extração das mesmas. Para as vitaminas K1 e K2 o melhor percentual de recuperação (37,3 e 45,8% respectivamente) foi obtido quando da utilização de clorofórmio, já para a vitamina K3, o diclorometano foi o solvente que propiciou o melhor percentual de recuperação (60,8%). Os limites de detecção do método proposto foram  $2,5 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$ ,  $2,0 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$  e  $2,0 \times 10^{-5} \text{ g.L}^{-1}$  para as vitaminas K1, K2 e K3 respectivamente.

Petritz *et al.* (2005) desenvolveram uma tecnologia de extrusão especial de modo a preservar a vitamina K1 e D3 de fatores causadores da decomposição das mesmas. De modo a proteger estas vitaminas durante a realização de análise quantitativa, utilizaram um método de análise modificado baseado em HPLC da Farmacopéia dos Estados Unidos. As condições de análise incluíram: a utilização de coluna de sílica como fase estacionária, uma mistura de n-hexano e álcool amílico como fase móvel e detecção por fotometria de absorção no UV-vis em 254 nm. O método utilizado permitiu a obtenção de coeficientes de recuperação para a filoquinona na faixa de 93 a 116% e limite de detecção de  $2,0 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$ .

Estudo realizado por Ahmed *et al.* (2007) desenvolveu um método (HPLC) para a determinação de homólogos da vitamina K, incluindo a filoquinona, menaquinona-4 e menaquinona-7, em plasma sanguíneo utilizando detecção por quimioluminescência. O limite de detecção obtido foi da ordem de  $10^{-6} \text{ g.L}^{-1}$  e o percentual de recuperação ficou na faixa de 82 a 93,5%. O RSD inter e intra ensaio ficou na faixa de 1,9 a 5,4%.

Em 2008, Orsi *et al.* desenvolveram um método para a determinação de vitaminas K1 e K3 em produtos cosméticos por HPLC. O método foi realizado utilizando uma coluna C18 e detecção por fotometria de absorção em 333 nm. Para análise da eficiência da extração foram preparados dois tipos de formulações cosméticas uma emulsão óleo/água e a outra emulsão água/óleo com composição semelhante às formulações comerciais. Estas foram então fortificadas com vitaminas K1 e K3, nas concentrações de 5% e 0,5% (m/m), em seguida extraídas e submetidas à análise. O percentual de recuperação foi de

98,4 e 97,6% para as vitaminas K1 e K3 respectivamente, quando da análise da emulsão óleo/água. Já para a emulsão água/óleo o percentual de recuperação foi de 98,9% (K1) e 99,6% (K3). Os limites de detecção do método proposto foram  $5,0 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$  para as vitaminas K1 e K3 respectivamente.

A cromatografia líquida de alta eficiência apresenta como vantagens a possibilidade de separação de misturas complexas em poucos minutos com o auxílio de uma coluna de alta resolução e uma bomba de alta pressão, apresenta alta resolução, boa detectabilidade e automação. No entanto apresenta como desvantagens o alto custo do equipamento e manutenção do mesmo, experiência do operador, alto consumo de solventes, alto custo de consumíveis e geração de quantidade relativamente grande de resíduos.