

5 Instrumentação, materiais, reagentes e métodos

No presente capítulo é descrito os procedimentos para desenvolver o método analítico para determinação das vitaminas K1 e K3 por meio da cromatografia eletrocínética capilar micelar utilizando detecção espectrofotométrica na região do UV-vis.

5.1. Instrumentação

O método para a determinação das vitaminas K1 e K3 foi desenvolvido em um equipamento comercial de eletroforese capilar Hewlett – Packard – Agilent. O instrumento possui um detector espectrofotométrico de absorção do tipo arranjo de diodos (operação na faixa de 190-600 nm); controlador de temperatura do tipo Peltier; um sistema automático de injeção de amostra, além de um programa de aquisição e tratamento de dados desenvolvido pela Agilent Technologies (Califórnia, EUA). Os capilares de sílica fundida utilizados para a realização das análises assim como o kit de detecção de alta sensibilidade (capilares especiais e cela de caminho óptico alongado), os alinhadores e cassetes (compartimento que acopla o capilar ao equipamento) foram adquiridos da Agilent Technologies.

Um cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (HPLC) da marca Agilent Technologies, série 1200 foi usado nos testes de comparação. O equipamento é composto de um degaseificador a vácuo, uma bomba binária SL, um amostrador automático, um compartimento termostaticado para a coluna, um detector de absorção no UV/vis do tipo arranjo de diodos e outro de fluorescência. A coluna utilizada foi uma C18 Zorbax Eclipse XDB (4,6 x 150 mm), com partículas de tamanho médio de 5 µm.

Todas as pesagens foram realizadas em uma balança analítica de marca Shimadzu modelo AUW220D, calibrada pelo laboratório Peso Exato Automação (Rio de Janeiro, Brasil), com a resolução de 1 mg, cujo certificado de calibração se encontra em anexo (Anexo I).

Um banho de ultrassom, modelo USB 124 e potência 40 W (fabricante: CTA do Brasil), foi utilizado para a dissolução de algumas substâncias.

As medições de pH das soluções e o preparo dos tampões acetato (pH = 4,00), fosfato (pH = 6,73; 7,00; 7,43; 7,85) e borato (pH = 8,50) foram realizados em um pHmetro modelo MPA 210, versão 2.3 fornecido pela Tecnocon. O pHmetro é ajustado diariamente através do uso de tampões rastreáveis ao NIST, cujo certificado se encontra no Anexo II (São Paulo, Brasil).

A degaseificação de solventes para o HPLC foi realizada em um banho ultrassônico modelo USC 1800 (Unique, São Paulo, Brasil).

5.2. Materiais e reagentes

Vitaminas K foram adquiridas da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha): filoquinona (vitamina K1), 99% e menadiona (vitamina K3), 97%.

As soluções aquosas foram preparadas com água ultrapurificada (resistividade abaixo de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida de um ultrapurificador de água da marca Millipore (Massachusetts, EUA) modelo Milli-Q A10 Gradiente.

Os surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), a acetonitrila (ACN) grau UV/HPLC, metanol (MeOH) grau UV/HPLC, diclorometano, hidróxido de sódio e ácido bórico adquiridos da Merck (Alemanha).

Para o desenvolvimento e validação da metodologia para a separação das vitaminas K utilizando a cromatografia eletrocínica capilar micelar foram utilizadas amostras de chá verde e suplemento vitamínico adquiridas em supermercados e farmácias locais, respectivamente. O suplemento vitamínico era composto de treze vitaminas entre estas a vitamina K1 e sais minerais. O rótulo do suplemento se encontra no Anexo III.

O nitrogênio comercial (99,96%) utilizado para evaporação do diclorometano na etapa de extração da vitamina K1 das amostras de suplemento vitamínico foi adquirido na AGA (Brasil).

Os balões volumétricos e micropipetas utilizadas foram calibrados em um laboratório integrante da Rede Brasileira de Calibração – RBC (Laboratório de caracterização de fluídos – LCF/PUC-Rio), cujos certificados encontram-se em anexo (Anexos IV, V e VI).

Utilizou-se almofariz de porcelana para maceração das amostras de suplemento vitamínico.

5.3. Métodos

5.3.1. Cuidados ao manipular o analito

Sendo a vitamina K um composto sensível à luz e facilmente oxidada, medidas para garantir a estabilidade das soluções e amostras foram tomadas como: (i) realização de todas as atividades operacionais em condições de luminosidade reduzida, utilizando para isso vidraria de cor âmbar e proteção das soluções com papel alumínio; (ii) injeção das amostras no mesmo dia de preparo, evitando assim exposição prolongada ao ar; e (iii) armazenamento das soluções sob refrigeração.

5.3.2. Preparo das soluções de referência para vitaminas K e do eletrólito de corrida

As soluções utilizadas em eletroforese capilar foram previamente filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoretileno), de porosidade 0,45 μm e diâmetro de 17 mm (National Scientific, Michigan, EUA). Os poros da membrana de PTFE foram previamente abertos com acetonitrila, antes da passagem das soluções aquosas.

As soluções-estoque das vitaminas (K1 e K3) foram preparadas em balões volumétricos de cor âmbar, em acetonitrila (K1: $4,5 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$ e K3: $1,7 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$) e mantidas ao abrigo da luz sob refrigeração de até 4 °C. As soluções de trabalho foram preparadas a cada experimento, por meio da diluição das soluções estoque em solução contendo 10%, em volume, de acetonitrila e 18,2 g.L^{-1} do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).

O preparo do eletrólito de corrida (preparo diário) consistiu na diluição de soluções-estoque aquosas de surfactante CTAB ($182,2 \text{ g.L}^{-1}$) e de ácido bórico ($24,7 \text{ g.L}^{-1}$), com adição do modificador orgânico acetonitrila 20% v/v e ajuste de pH para o valor adequado (pH = 8,5) por meio da adição de solução aquosa de hidróxido de sódio $40,0 \text{ g.L}^{-1}$. Durante o ajuste de pH, a solução foi mantida em constante agitação e o valor de pH monitorado com auxílio de pHmetro.

5.3.3. Extração e preparo das amostras

A extração da vitamina K das amostras de chá verde foi realizada de acordo com o procedimento de preparo descrito por Reto *et al.* (2007). Uma massa de 1,5 g de chá contida em um sachê foi colocada em um bquer e em seguida 0,3 L de água fervente foi adicionada e o chá foi deixado em infusão por cerca de 10 min. O preparo das amostras de chá para a análise envolveu as seguintes etapas: i) um volume de 5 mL de chá foi transferido para balão volumétrico de 10 mL; ii) adicionou-se 1 mL de acetonitrila e $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB iii) ajuste do volume com água ultrapurificada; iv) filtração das amostras utilizando filtros de PTFE.

A fortificação da amostra de chá foi realizada de acordo o seguinte procedimento: i) transferência de um volume de 5 mL de chá para balão volumétrico de 10 mL; ii) adição de 1 mL de acetonitrila e $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB; iii) adição de uma alíquota da solução padrão de vitamina K1 de modo a se obter uma concentração final de $4,1 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$; iv) ajuste do volume com água ultrapurificada; v) filtração das amostras utilizando filtros de PTFE.

Para a extração da vitamina K1 do suplemento vitamínico foi realizado o procedimento a seguir: (i) escolha aleatória de comprimidos do suplemento vitamínico, presentes em cerca de seis cartelas; (ii) maceração dos comprimidos selecionados em um almofariz de porcelana; (iii) medição da massa para obtenção de 550 mg do material pulverizado; (iv) extração da vitamina K1 utilizando-se cerca de 10 mL de diclorometano, o qual foi evaporado em fluxo de N_2 ; (v) dissolução do resíduo com 50 mL de acetonitrila. A solução foi mantida sob refrigeração.

A fortificação das amostras de suplemento vitamínico foi feita de acordo com o seguinte procedimento: i) uma alíquota da solução extraída do suplemento vitamínico correspondente à concentração de $4,1 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ de vitamina K1 foi transferida para balão volumétrico de 10 mL; ii) adicionou-se uma alíquota da solução padrão de vitamina K3 de modo a se obter uma concentração final de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$; iii) adicionou-se 1 mL de acetonitrila e $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB; iv) realizou-se o ajuste do volume com água ultrapurificada; v) filtração das amostras utilizando filtros de PTFE.

Para a determinação da vitamina K1 e K3 foram seguidas as seguintes etapas: (i) acondicionamento das alíquotas das soluções de vitamina K1 em acetonitrila (vitamina K1 extraída do suplemento) e da solução padrão de

vitamina K3 em balão de 10 mL; (ii) evaporação da acetonitrila até restar apenas o resíduo das vitaminas; (iii) adição de 1 mL de acetonitrila e $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB; (iv) ajuste do volume com água ultrapurificada; (v) filtração das amostras utilizando filtros de PTFE.

5.3.4. Limpeza do material

A vidraria utilizada foi primeiramente lavada em água corrente e em seguida imersa em solução aquosa de ácido nítrico 10% v/v por um período mínimo de 24 h. Após esse período, o material foi enxaguado com água destilada e posteriormente com água ultrapurificada, seco e mantido em recipientes fechados.

5.3.5. Medições Eletroforéticas

As determinações foram realizadas utilizando um capilar de sílica fundida de 60 cm de comprimento total (52 cm até o detector) e $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, devidamente adaptado ao alinhador (Figura 8) e ao cassete (Figura 9), o qual tem como função proteger o capilar. A preparação dos capilares envolveu as seguintes etapas: (i) corte do capilar no tamanho ideal e (ii) remoção do revestimento de poliimida, de modo a abrir tanto a janela de detecção como as extremidades do capilar, as quais fecham o circuito do sistema através do contato com as soluções do eletrólito de corrida.

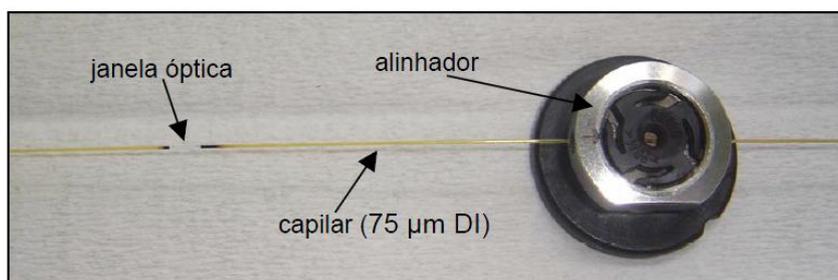


Figura 8: Capilar com janela óptica feita manualmente e alinhador (DI = diâmetro interno).



Figura 9: Cassete com o capilar e seu respectivo alinhador.

O modo de separação eletroforética utilizado nesse trabalho foi o da cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC - *Micellar electrokinetic chromatography*), a qual utiliza fase pseudo-estacionária carregada para a separação e identificação de compostos neutros. Micelas carregadas positivamente foram formadas utilizando-se o surfactante CTAB.

Um procedimento de condicionamento do capilar de sílica, precedente às injeções das soluções dos analitos, consistiu na passagem de acetonitrila (5 min), seguida da passagem de água ultrapurificada (15 min), solução de hidróxido de sódio $40,0 \text{ g.L}^{-1}$ (10 min) e solução de eletrólito de corrida (10 min). Esse condicionamento foi feito pela injeção das soluções com pressão de 5000 Pa (50 mbar). Entre cada uma das corridas, ao longo do dia de trabalho realizou-se um pré-condicionamento mais simples, por meio da passagem de água ultrapurificada (2 min); acetonitrila (2 min); água ultrapurificada (2 min); solução de hidróxido de sódio $40,0 \text{ g.L}^{-1}$ (2 min) e eletrólito de corrida (5 min). Esse segundo pré-condicionamento foi fundamental para garantir a reprodução de resultados.

A limpeza do capilar ao final de cada dia de trabalho foi realizada pela passagem de água ultrapurificada por 8 min, acetonitrila por 5 min, seguida de solução de acetonitrila:água 50:50% v/v por 5 min. O processo de limpeza foi realizado a temperatura de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após cada dia de experimentos, o capilar foi guardado com as pontas imersas dentro de *vials* de polipropileno contendo solução de acetonitrila:água 50:50% v/v.

Os eletroferogramas das vitaminas K1 e K3 foram obtidos utilizando um detector espectrofotométrico do tipo arranjo de diodos, com absorvância em 248 nm, já que as diferentes formas de vitamina K apresentam espectros UV característico das naftoquinonas, com forte absorção entre 240-270 nm (Combs

Jr, 2008). Durante as análises, a temperatura foi mantida constante em 25 °C e com aplicação de diferença de potencial negativa de 30 kV. O modo de injeção utilizado foi hidrodinâmico, com pressão de 50 mbar por 15 s.

De modo a melhorar o limite de detecção do método, foram realizadas medições eletroforéticas com uma cela de caminho óptico alongado com formato em Z. Foi utilizado um kit (Agilent) constituído de uma cela especial, um capilar de sílica fundida dividido em duas partes e conectores para adaptação do capilar à cela (Figura 10), além de nitrogênio (99%) e uma solução de Hellmanex 2% v/v para limpeza dos acessórios.

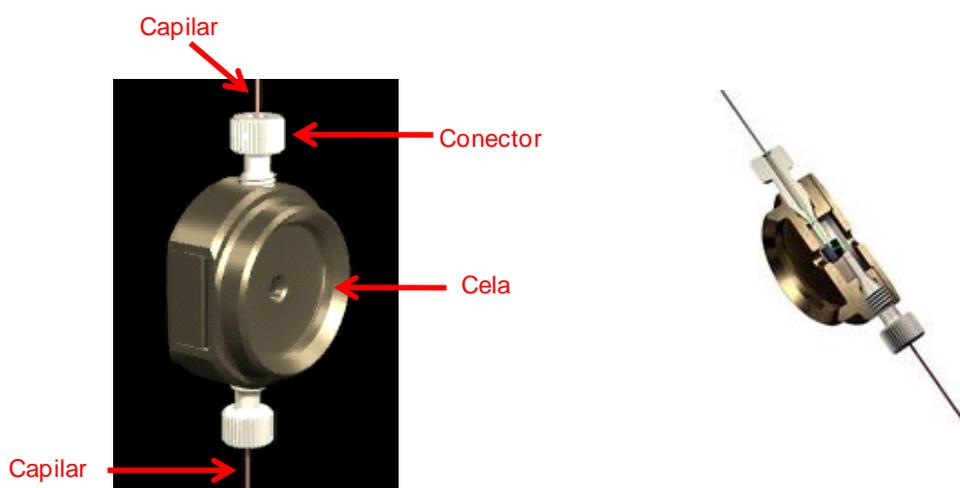


Figura 10: Cela com caminho óptico alongado e os aparatos adaptados.

A solução de limpeza Hellmanex II foi preparada por meio da diluição de 1,0 mL da solução em 25 mL de água ultrapurificada. Tanto os parafusos, quanto a cela foram imersos nessa solução e deixados em banho ultrassônico por 15 min e em seguida por mais 10 min em água ultrapurificada, antes de serem utilizados, para remoção de partículas que pudessem atrapalhar a passagem da solução pela cela de caminho óptico alongado.

Para o uso dessa cela, os procedimentos de condicionamento, pré-condicionamento, posterior limpeza do capilar e de injeção foram realizados da mesma forma como descrito anteriormente.

5.3.6.

Validação do método analítico e estimativa da incerteza de medição

Os parâmetros avaliados para a validação do método baseado na cromatografia eletrocinética capilar micelar para a medição de vitamina K foram: seletividade, linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. A avaliação destes foi realizada segundo os seguintes documentos regulatórios: DOC-CGCRE-008:2011 (documento orientativo sobre validação de métodos analíticos) do Inmetro, RE nº 899, de 29/5/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, publicado pela Anvisa e o Guia para a validação de métodos de análise da IUPAC (IUPAC, 2010). A estimativa da incerteza de medição foi realizada de acordo com o Guia para a expressão da incerteza de medição (JCGM 100:2008), sendo também utilizado como referência trabalho realizado por Cunha (2007).

Para facilitar a compreensão, todo o procedimento, de validação e estimativa da incerteza de medição, são apresentados juntamente com os resultados obtidos e sua avaliação no Capítulo 6.