



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**Validação de um método de cromatografia líquida de
alta resolução (HPLC) para doseamento da vitamina D
em géneros alimentícios. Aplicação do método em
diferentes matrizes alimentares.**

DIANA ISABEL SILVA PARREIRA
(Licenciada)

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

Orientadores:

Doutora Maria da Graça Serras Leitão Dias
Doutora Maria Celeste Serra

Júri:

Doutora Isabel Maria da Silva João
Doutor Amin Karmali
Mestre Mariana Ramos Coelho Santos

DEZEMBRO DE 2013



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**Validação de um método de cromatografia líquida de
alta resolução (HPLC) para doseamento da vitamina D
em géneros alimentícios. Aplicação do método em
diferentes matrizes alimentares.**

DIANA ISABEL SILVA PARREIRA
(Licenciada)

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

Orientadores:

Doutora Maria da Graça Serras Leitão Dias
Doutora Maria Celeste Serra

Júri:

Doutora Isabel Maria da Silva João
Doutor Amin Karmali
Mestre Mariana Ramos Coelho Santos

DEZEMBRO DE 2013

Resumo

O objetivo deste trabalho foi o de realizar os ensaios de validação necessários à acreditação de um método analítico para determinação da vitamina D em matrizes alimentares. Após validação, o método foi aplicado a matrizes que incluíram papas infantis, iogurtes, cereais, leite, ovos e massas infantis.

De forma a atingir este fim, foram otimizados procedimentos de tratamento das amostras e validado um método analítico baseado na norma europeia, EN 12821, o qual permitiu a determinação do teor em vitamina D através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) pelo método do padrão interno.

De forma a quantificar a vitamina D na matriz alimentar, as amostras sofreram um processo de saponificação seguido de extração líquido-líquido, e por fim isolamento e concentração através de cromatografia de HPLC semi-preparativa em fase normal e, quantificação através de HPLC analítica em fase reversa a um comprimento de onda de 265 nm.

De forma a validar o método de HPLC foram determinados os parâmetros de validação: precisão (repetibilidade e precisão intermédia), limite de deteção e de quantificação, recuperação e exatidão.

Utilizando os resultados da validação, precisão intermédia e exatidão, foi determinada a incerteza do resultado da medição. A avaliação da incerteza total conduziu ao valor de 26%, para o nível de confiança de 95%.

O teor em vitamina D nas amostras analisadas variou entre 0,28 µg/100 g e 22 µg/100 g. Os resultados da análise das amostras mostraram que 14% destas apresentavam valores superiores aos indicados nos respetivos rótulos e 43% valores inferiores aos rotulados. Tendo em considerações as porções definidas na rotulagem das amostras analisadas duas amostras ultrapassaram a dose diária recomendada (5 µg) se for consumida apenas uma porção (30 g).

Os resultados obtidos permitiram concluir que o método validado é adequado para a determinação da vitamina D nas diversas matrizes analisadas.

Palavras-chave: Vitamina D, géneros alimentícios, validação, incerteza, HPLC.

Abstract

The objective of this study was to perform the required validation tests for accreditation of an analytical method for determination of vitamin D in food matrices. After validation, the method was applied to matrices that included infant porridge, yogurts, cereals, milk, eggs and infant pasta.

In order to achieve this end, the procedures for processing samples were optimized and was validated an analytical method based on the European standard, EN 12821, which allowed the determination of vitamin D content using high performance liquid chromatography (HPLC) by the method of internal standard.

In order to quantify the vitamin D in the food matrix, the samples were subjected to a process of saponification followed by liquid-liquid extraction and finally concentration and isolation by a normal phase HPLC semi-preparative and quantified by reverse phase HPLC analytical on a wavelength of 265 nm.

In order to validate the HPLC method were determined the validation parameters: precision (repeatability and inter-run precision), limit of detection and quantification, recovery and accuracy.

Using the results of the validation, inter-run precision and accuracy, the uncertainty of the measurement result was determined. The assessment of total uncertainty led to a value of 26% for the confidence level of 95%.

The vitamin D content in the samples ranged from 0.28 µg/100 g and 22 µg/100 g. The results of the samples analysis showed that 14% of these were higher than the values indicated by the label and 43% lower than labeled values. Taking into consideration the portions size defined in the samples lable, two samples exceeded the recommended daily dose (5 µg) if consumed only a portion (30 g).

The results showed that the validated method is suitable for the determination of vitamin D in different matrices analyzed.

Keywords: Vitamin D, foodstuffs, validation, HPLC, uncertainty.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP, pela oportunidade de estágio e financiamento do projeto.

Ao projeto *TDS EXPOSURE*, o qual este trabalho está inserido e sem o qual não seria possível a sua realização.

Ao Departamento de Alimentação e Nutrição e um agradecimento especial, à Doutora Antónia Calhau, por me receber com amabilidade e possibilitar a realização deste trabalho durante os meses de trabalho.

Às minhas orientadoras, Doutora Maria Celeste Serra e Doutora Maria da Graça Dias, pela orientação ao longo dos meses de trabalho principalmente na fase final, pela permanente disponibilidade, amizade e apoio incondicional demonstrados em todas as etapas, o meu muito obrigada.

Ao meu colega e melhor amigo, Bruno Sargaço, pelo apoio nos momentos mais difíceis, sempre com palavras de motivação e orientação e pela parceria não só durante a realização do estágio mas durante todo o nosso percurso académico.

Aos meus pais, Jerónimo Parreira e Vitorina Parreira, e irmã, Sara Parreira, por todo o apoio e presença em todas as etapas importantes na minha vida.

Índice Geral

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos.....	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas	viii
1. Enquadramento do Tema	1
2. Introdução.....	3
2.1. Vitaminas.....	3
2.2. Vitamina D.....	3
2.2.1. História e Descoberta da Vitamina D	3
2.2.2. Síntese da Vitamina D	4
2.2.3. Ocorrência Natural da Vitamina D	7
2.2.4. Caracterização Físico-Química da Vitamina D	7
2.2.5. Funções da Vitamina D	9
2.2.6. Deficiência em Vitamina D.....	10
2.2.6.1. Fatores de Risco	11
2.2.6.2. Deficiência em Vitamina D na Europa	12
2.2.6.3. Sintomas de Deficiência em Vitamina D	13
2.2.7. Optimização dos Níveis de Vitamina D no Soro.....	14
2.3. Suplementação da Vitamina D.....	14
2.4. Dose Diária Recomendada.....	15
2.5. Toxicidade da vitamina D.....	17
2.6. Hipersensibilidade à vitamina D.....	18
3. Métodos Analíticos para a Determinação de Vitamina D	18
3.1. Princípios de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	21
4. Validação de um Método Analítico.....	24
5. Objetivos.....	34
6. Materiais e Métodos	35
6.1. Reagentes e Padrões	35
6.2. Equipamento	36
6.3. Preparação de Soluções.....	38
6.3.1. Soluções Padrão	38
6.4. Amostras	41

6.4.1. Preparação das amostras.....	43
6.4.2. Procedimento Experimental.....	45
6.4.3. Quantificação do Teor de Vitamina D	47
7. Resultados e Discussão	48
7.1. Estudos de Otimização dos Métodos de Tratamento das amostras.....	48
7.2. Validação do Método de Análise.....	52
7.3. Teor de vitamina D nas amostras	64
8. Conclusão.....	69
9. Propostas de Trabalho Futuro	70
10. Referências Bibliográficas.....	71
ANEXOS.....	80
Anexo 1	81
Anexo 2	87
Anexo 3	88
Anexo 4	89
Anexo 5	90
Anexo 6	95
Anexo 7	96
Anexo 8	99

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura molecular do 1,25-di-hidroxi-ergocalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$) e do 1,25-di-hidroxicolecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ou calcitriol [14]	5
Figura 2 – Esquema do processo sofrido pela vitamina D até à sua ativação [16]	6
Figura 3 – Estrutura molecular da vitamina D_2 (ergocalciferol) e da vitamina D_3 (colecalciferol) [14]	8
Figura 4 - Componentes de um cromatografo de HPLC [113]	22
Figura 5 – Equipamento de HPLC analítico	36
Figura 6 - Equipamento de HPLC semi-preparativo	37
Figura 7 – Reta de calibração para a análise da vitamina D_3	53
Figura 8 – Incerteza padrão combinada relativa para as amostras de papa infantil	62
Figura 9 – Cromatograma dos padrões de vitamina D_3 e D_2 , 1 – Vitamina D_2 (TR: 20,423 minutos) e 2 – Vitamina D_3 (TR: 21,673 minutos)	63
Figura 10 – Cromatograma da amostra de papa A, 1 – Vitamina D_2 (TR: 20,517 minutos) e 2 – Vitamina D_3 (TR: 21,730 minutos)	63
Figura 11 – Teores em vitamina D determinados para as amostras analisadas	66

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Recomendações da ingestão diária de vitamina D segundo o IOM [79]	16
Tabela 2 – Amostras em estudo neste trabalho	42
Tabela 3 – Teores de vitamina D ₃ em amostras de papa infantil C sujeitas a saponificação com diferentes volumes de solução de KOH a 60%	49
Tabela 4 – Teores de vitamina D ₃ determinados na papa infantil C para os dois tempos de saponificação	50
Tabela 5 – Teores de vitamina D ₃ em amostras de papa infantil C sujeitas a extração com diferentes solventes	51
Tabela 6 – Teores de vitamina D e volumes de solução mãe (10 µg/mL) para construir as curvas	53
Tabela 7 – Teor de vitamina D ₃ na amostra papa A	54
Tabela 8 – Razão sinal/ruído para os teores de 0,1, 0,15 e 0,5 µg/mL em vitamina D 55	
Tabela 9 – Recuperação no LQ e presença do pico no LD para a vitamina D ₂ e D ₃ ...	56
Tabela 10 – Coeficiente de variação da repetibilidade	57
Tabela 11 – Coeficiente de variação da precisão intermédia	57
Tabela 12 – Recuperação de vitamina D ₂ em papas infantis	58
Tabela 13 – Efeito do tempo de armazenamento nas áreas dos picos de vitamina D ₂ e de vitamina D ₃ de 0,5 µg/mL	60
Tabela 14 – Repetibilidade do injetor	61
Tabela 15 – Vitamina D nas amostras analisadas (rotulado e determinado)	65

Lista de Abreviaturas

1,25(OH) ₂ D	1,25-di-hidroxivitamina D
25OHD	25-hidroxivitamina D
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
CEN	Comité Europeu de Normalização
CV	Coeficiente de Variação
DAN	Departamento de Alimentação e Nutrição
DAD	Detetor com Rede de Díodos
DBP	Proteína transportadora de vitamina D <i>D Binding Protein</i>
DDR	Dose Diária Recomendada
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	Ionização por eletrospray <i>Electrospray ionization</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HR	Humidade Relativa
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP
IOM	Institute of Medicine
KOH	Hidróxido de Potássio
LD	Limite de Deteção
LQ	Limite de Quantificação
MEOH	Metanol
MRC	Material de Referência Certificado
MS	Espetrometria de Massa
MS/MS	Espetrometria de Massa sequencial <i>Tandem MS/MS</i>
NIST	<i>National Institute of Standards Technology</i>
NP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase normal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Padrão Interno
PTH	Hormona Paratiróide
RIA	Radioimunoensaio <i>Radioimmunoassay</i>
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase reversa
SPE	Extração de fase sólida

TR	Tempo de Retenção
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UI	Unidades Internacionais
UV	Ultravioleta

1. Enquadramento do Tema

Ao longo dos séculos, a vitamina D tem sido alvo de grande interesse e estudo devido à sua ação sobre a saúde óssea. Nos dias de hoje, ainda é motivo de investigação, sendo o seu consumo associado à prevenção de várias doenças, tais como raquitismo e osteomalacia.

Em muitos países desenvolvidos tem-se verificado um crescimento da suplementação em vitamina D em vários produtos alimentares. Este facto está relacionado com a crescente deficiência desta vitamina, devido a inúmeros fatores: alterações dos hábitos alimentares; estilo de vida com cada vez menos exposição solar; utilização de vestuário que cobre uma grande percentagem de pele; cor de pele (quantidade de melanina), e também a idade [1].

A deficiência em vitamina D pode originar inúmeros malefícios para a saúde humana, nomeadamente deformações na estrutura óssea e hiperparatiroidismo secundário. Deste modo, em populações em que a ingestão de vitamina D através da alimentação não é suficiente existe a necessidade de suplementação preventiva para que os indivíduos ingiram uma quantidade próxima da dose diária necessária. A dose diária recomendada (DDR) em Portugal apresenta um valor de 5 µg/dia [2].

Considerando o facto de os alimentos conterem teores relativamente baixos de vitamina D e o facto de que a sua ingestão em quantidades elevadas pode conduzir a toxicidade, esta vitamina constitui um desafio em termos analíticos no que se refere ao limite de quantificação.

2. Introdução

2.1. Vitaminas

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o normal funcionamento do corpo humano, apresentando um papel importante em muitas das suas funções biológicas, pertencendo por isso ao grupo dos micronutrientes. O corpo humano não consegue produzir a maioria das vitaminas, sendo estas obtidas através da alimentação e de suplementos vitamínicos.

As vitaminas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com a sua solubilidade, as hidrossolúveis e as lipossolúveis.

As vitaminas solúveis em água, vitaminas do complexo B e a vitamina C, não são armazenadas nos tecidos corporais em elevadas quantidades e os excessos são geralmente excretados na urina.

Pelo contrário, as vitaminas solúveis em lípidos estão ligadas ao metabolismo lípidico e são geralmente insolúveis ou pouco solúveis em água, incluindo-se neste grupo as vitaminas A, D, E e K, e os carotenóides (alguns dos quais precursores da vitamina A). Estas vitaminas são armazenadas nos tecidos do corpo humano, no tecido adiposo, podendo a toma excessiva deste tipo de vitaminas, em alguns casos, originar efeitos tóxicos nomeadamente lesões no fígado (vitamina A) [3,4].

2.2. Vitamina D

2.2.1. História e Descoberta da Vitamina D

O efeito benéfico da luz solar na cura do raquitismo em crianças foi conhecido no início de 1800, mas apenas um século depois foi descoberta a causa desse efeito.

Em 1921, Sir Edward Mellanby, foi o primeiro a demonstrar que o raquitismo se tratava de uma doença nutricional e que o óleo de fígado de bacalhau apresentava um fator que a prevenia. Em 1922, McCollum e os seus colaboradores realizaram estudos com o óleo de fígado de bacalhau, no qual foi injetado oxigénio. Neste processo, os investigadores conseguiram identificar a presença de um fator A posteriormente denominado de vitamina A e de um outro fator, a vitamina D. Ainda em 1922, foi descoberto que a vitamina D estava presente na fração insaponificável do óleo de fígado de bacalhau, tendo sido sugerido que esta apresentava uma estrutura semelhante ao colesterol.

Em 1924, dois investigadores (Steenbock e Black) descobriram que ao irradiarem rações para ratos com luz ultravioleta (UV), estas apresentavam os mesmos

benefícios que a irradiação nos próprios ratos raquíticos. Pouco depois desta descoberta, os investigadores Hess e Weinstock conseguiram com sucesso aumentar a concentração de vitamina D em alimentos expostos à luz UV [5].

Em 1927, o ergosterol foi identificado como o precursor do ergocalciferol (vitamina D₂) e o 7-des-hidrocolesterol como precursor do colecalciferol (vitamina D₃) em 1934 [6]. Em 1928, o prémio nobel de química foi atribuído a Adolf Windaus devido aos seus estudos acerca da constituição dos esteróis e da sua relação com as vitaminas [7], sendo este o primeiro prémio atribuído a um estudo com enfoque nas vitaminas. A vitamina em estudo neste trabalho tratava-se da vitamina D.

2.2.2. Síntese da Vitamina D

Depois da descoberta da vitamina D por Sir Mellanby em 1921, foram realizadas diversas pesquisas com o objetivo de obter uma melhor compreensão das suas propriedades fisiológicas. Este nutriente foi primeiramente classificado como uma “vitamina” essencial para o desenvolvimento normal do esqueleto e a manutenção do equilíbrio em cálcio no corpo humano. Contudo, foi revelado que a vitamina D pode ser classificada como uma hormona devido ao facto de ser sintetizada como resultado da exposição a raios UVB (280 a 320 nm), mas atualmente continua a ser referida como uma vitamina.

Esta vitamina apresenta-se sob a forma de vitamina D₂ (ergocalciferol) existente naturalmente em plantas e fungos e vitamina D₃ (colecalciferol) existente em animais, sendo ambas denominadas vitamina D [8].

A vitamina D₂ é sintetizada pela irradiação dos raios UV do ergosterol, esterol presente na membrana de fungos [9].

A síntese de vitamina D₃ é realizada pela ação dos raios UV no substrato 7-des-hidrocolesterol presente na pele dos animais. A radiação é absorvida pelo 7-des-hidrocolesterol, convertendo-o em pré-vitamina D₃. Com a temperatura corporal, a pré-vitamina D₃ é convertida em vitamina D₃, mas este processo é bastante moroso, podendo demorar várias horas. A contínua irradiação converte a pré-vitamina D₃ ou a vitamina D₃ em vários produtos denominados por “produtos sobreirradiados” [10].

Uma vez produzida na pele ou absorvida por ingestão, a vitamina D é transportada na corrente sanguínea por uma proteína transportadora de vitamina D (formando um complexo proteína-vitamina D (DBP - *D Binding Protein*)) até ao fígado onde é submetida a uma hidroxilação pela enzima 25-hidroxilase no carbono 25 formando assim a 25-hidroxivitamina D (25OHD), o metabolito circulante maioritário de vitamina

D. Outros tecidos, como a pele, a glândula supra-renal, os pulmões, rins e ossos, também apresentam a capacidade de produção deste metabolito [11].

A absorção de vitamina D é largamente refletida na concentração de 25OHD na corrente sanguínea [12], e essa concentração é utilizada como avaliação da concentração da vitamina D no sangue [9,13].

O metabolito 25OHD não apresenta a atividade biológica necessária para as funções biológicas realizadas pela vitamina D, sendo necessária nova hidroxilação. Esta hidrólise dá origem ao metabolito 1,25-di-hidroxivitamina D, a forma ativa da vitamina D.

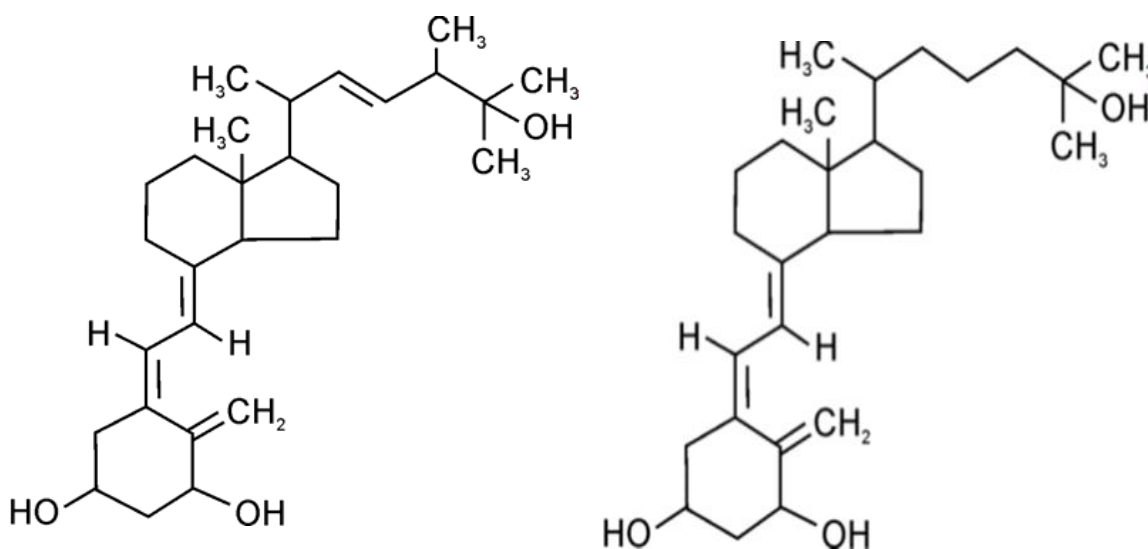


Figura 1 – Estrutura molecular do 1,25-di-hidroxi-ergocalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$) e do 1,25-di-hidroxi-cholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ou calcitriol [14]

A hormona ativa 1,25-di-hidroxivitamina D, figura 1, também denominada de calcitriol, é produzida nos rins e é exportada para a corrente sanguínea [9,13]. A enzima responsável pela produção do calcitriol é a 1α -hidroxilase. Esta enzima é sintetizada em vários tecidos como os do cólon, próstata, pulmão, tecido mamário, em macrófagos e células paratiróides [15], mas o calcitriol produzido em tecidos não renais apenas apresenta efeito local [9].

Na figura 2 é apresentado um esquema síntese da produção da hormona ativa $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

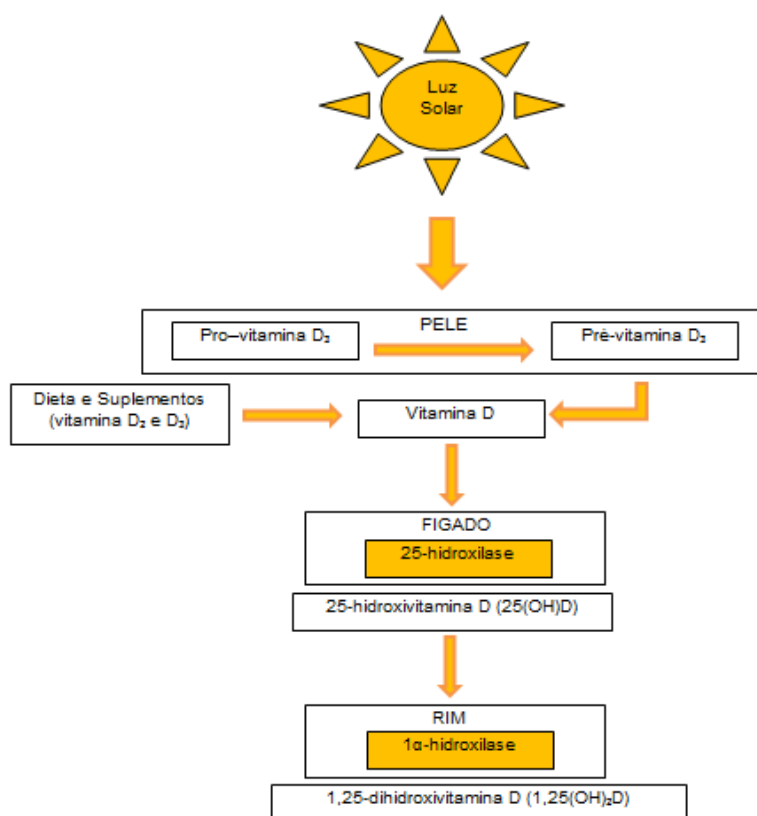


Figura 2 – Esquema do processo sofrido pela vitamina D até à sua ativação [16]

Tanto o calcitriol como o 25OHD sofrem processos catabólicos. O calcitriol é catabolizado na maioria das células pela 24-hidroxilase, sendo a produção desta enzima induzida pelo próprio calcitriol, quando se encontra em níveis anormalmente elevados no organismo, e forma a 1,24,25-tri-hidroxitamina D. A 25OHD também é catabolizada por essa enzima e é convertida em metabolitos altamente polares e excretados pela bÍlis, tais como ácido calcitróico, que são solúveis em água [17,18].

É conhecido que o metabolismo de inativação da 25OHD através desta via é acelerado com a ingestão de pouco cálcio ou a presença de níveis elevados de hormona paratiróide e calcitriol no organismo [19].

A vitamina D pode também ser obtida a partir de várias fontes de alimentação, como por exemplo a ingestão de peixes gordos [8].

2.2.3. Ocorrência Natural da Vitamina D

A maioria dos produtos naturais apresenta-se como uma fonte pobre em vitamina D, contribuindo com menos de 10% para a dose diária recomendada [9].

As fontes naturais mais ricas em vitamina D₃ são os óleos de fígado de peixe, especialmente óleo de fígado de bacalhau, sendo que possuem igualmente uma grande quantidade de vitamina A, a qual interfere com a atividade da vitamina D de onde podem resultar efeitos adversos para os ossos [20].

Pequenas quantidades da vitamina D₃ podem ser também encontradas em partes comestíveis de peixes com uma elevada percentagem de gordura, fígado de mamíferos, ovos e produtos láteos. A concentração de vitamina D₃ no leite apresenta uma variação sazonal, que pode estar relacionada com a quantidade de luz solar disponível para a conversão da 7-des-hidrocolesterol da pele do animal em colecalciferol.

A vitamina D₂ pode ser encontrada em cogumelos selvagens ou cogumelos que sofreram um processo de radiação com raios UV, podendo apresentar um teor entre 30 a 100 µg de vitamina D₂ por 100 g de cogumelos [9].

Os cereais, vegetais e fruta não apresentam vitamina D, enquanto a carne, aves e peixes brancos apresentam uma quantidade insignificante de vitamina D₃ [3,5].

Como as fontes dietéticas naturais de vitamina D são escassas, tem sido necessário a sua suplementação em alguns dos produtos mais consumidos com o objetivo do consumidor ingerir a dose diária recomendada. Estes produtos alimentares enriquecidos, como os produtos láteos (leite e iogurtes), cereais e pão que estão disponíveis no mercado em algumas áreas geográficas, como por exemplo, nos Estados Unidos da América e no norte da Europa, fazem parte de uma política de prevenção da saúde [21,22].

2.2.4. Caracterização Físico-Química da Vitamina D

A vitamina D₃ e a vitamina D₂, classificadas quimicamente como seco-esteróis (um dos quatro anéis que as constituem apresenta-se quebrado), são estruturalmente semelhantes sendo a sua origem atribuída a irradiação UV dos esteróis das provitaminas respetivas [4].

Estruturalmente, a vitamina D₂ e D₃ diferem apenas no carbono 17 da cadeia lateral, onde a vitamina D₂ apresenta uma ligação dupla e um grupo metil adicional, como pode ser observado na figura 3 [5].

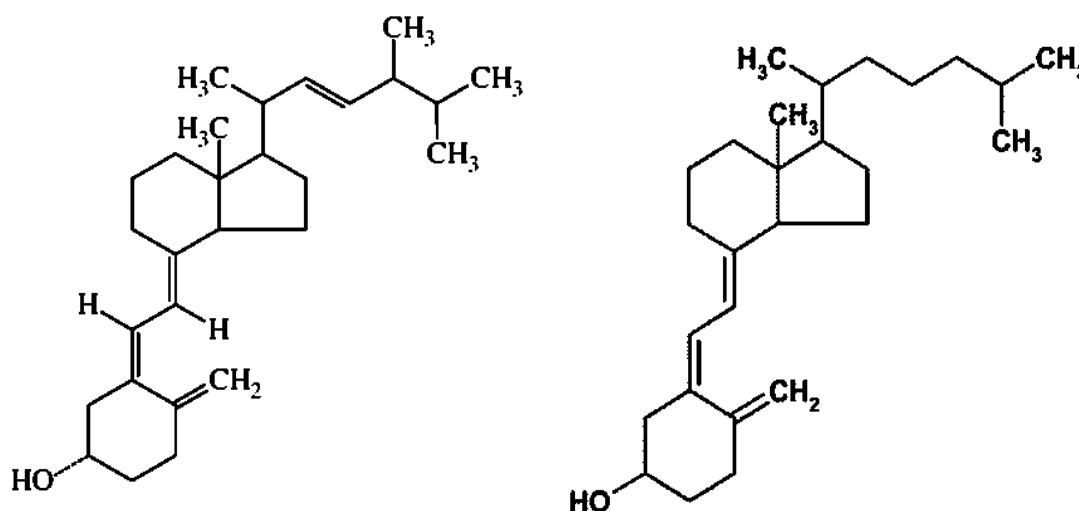


Figura 3 – Estrutura molecular da vitamina D₂ (ergocalciferol) e da vitamina D₃ (colecalciferol) [14]

As vitaminas D₂ e D₃ quando puras apresentam-se sob a forma de pequenos cristais brancos amarelados que não possuem odor [5].

As formas comercialmente disponíveis incluem cristais solúveis em lípidos para o uso em alimentos com grande percentagem de gordura e versões encapsuladas e estabilizadas para o uso em produtos secos que são posteriormente re-hidratados ou em produtos à base de água [3].

As vitaminas D₂ e D₃ são insolúveis em água, solúveis em etanol a 95%, acetona, várias gorduras e óleos e também em benzeno, clorofórmio e éter [5].

O estudo do efeito da temperatura (25 e 40°C) e da humidade relativa (HR) (ar seco a 45% HR e ar muito húmido a 85% HR) na estabilidade da vitamina D sob a forma de pó e na ausência de luz foi realizado pelos investigadores Grady e Thakker em 1980. Estes investigadores observaram que depois de 21 dias, as amostras de vitamina D₂ armazenadas em ar seco a 25°C apresentavam apenas 66% de ergocalciferol, enquanto as amostras armazenadas sob ar muito húmido apresentavam teores acima de 95%. A vitamina D₃ apresentou-se mais estável, e em ambos os cenários apresentaram uma percentagem superior a 99%. No entanto, ambos os compostos são menos estáveis a temperaturas mais elevadas. As amostras de vitamina D₂ armazenadas a 40°C e 85% HR apresentavam 87% de vitamina D₂ e as armazenadas a 40°C e 45% HR apenas apresentava 20%. Sob as mesmas condições, as amostras de vitamina D₃, armazenadas durante 7 dias a 40°C e 85% HR continham apenas 15% de vitamina D₃ restante, as armazenadas a 40°C e a 45% HR continham cerca de 65% [23].

Em soluções oleosas a 0°C, a vitamina D perde cerca de 50% da sua atividade biológica entre 3 a 5 anos, enquanto em emulsões esta perda demora apenas três semanas [24]. A vitamina D também é instável em soluções ácidas ou sob condições moderadamente acídicas, que provocam a isomerização das suas moléculas em dois isómeros, o isómero 5,6-trans e o isómero isotaquisterol [25].

Em solução, as vitaminas D₂ e D₃ exibem uma isomerização termicamente reversível originando as suas pré-vitaminas correspondentes, formando um equilíbrio na mistura. As taxas de isomerização da vitamina D₂ e D₃ são aproximadamente iguais e não são afetadas pelo solvente, luz ou catálise [26,27].

Contudo no estado sólido, a vitamina D não isomeriza. Além da isomerização térmica, as soluções de vitamina D em solventes orgânicos são bastante estáveis, sendo que não deve existir contacto entre estas e oxigénio, luz ou ácidos [5].

Deste modo, quando libertada da matriz alimentar, a vitamina D é suscetível à decomposição na presença do oxigénio, luz, ácidos e água, o que pode ser comprovado através da diminuição de absorvância a 265 nm (UV). As principais condições que promovem a destruição da vitamina D incluem a exposição a correntes de ar (especialmente com correntes quentes) e condições ácidas. Contudo, os produtos resultantes da sua decomposição, que podem ser diferentes em cada caso, são separáveis da vitamina D através de cromatografia [25,28].

A vitamina D resiste ao processo de fumagem do peixe, ao processo de pasteurização e esterilização do leite, e à secagem por pulverização de ovos. Quando utilizada para enriquecimento de leites infantis, é comum ocorrer destruição de 25 a 35% da vitamina D adicionada durante o processo de secagem [29].

Todos os compostos de vitamina D, quando numa solução etanólica, possuem um amplo espectro de absorção na região ultravioleta que atinge um máximo a 265 nm [30].

2.2.5. Funções da Vitamina D

A função mais conhecida e estudada do composto ativo da vitamina D, o calcitriol, está relacionada com a regulação do metabolismo de cálcio e do fósforo. O composto maximiza a absorção de cálcio nos intestinos e contribui para uma melhor mineralização óssea, reduzindo o risco de fraturação [8,9,10]. Como a maioria dos alimentos não contribui com um grande aporte de cálcio e a sua absorção não é

particularmente eficiente, uma absorção ativa é bastante importante para compensar as perdas inevitáveis de cálcio que ocorrem na sua maioria através da urina [31,32].

Os compostos de vitamina D apresentam também um papel importante no funcionamento muscular e mais recentemente, tem sido especulado que uma concentração adequada de vitamina D pode proteger contra inúmeras doenças, entre as quais, a diabetes, infeções e até alguns tipos de cancro [33].

A síntese de vitamina D e o seu metabolismo na pele podem contribuir para uma fotoproteção endógena. A síntese dos análogos de vitamina D com menos efeitos secundários cálcemicos está a resultar no desenvolvimento de uma nova classe de agentes anticancerígenos. Além disso, dados epidemiológicos salientam também a importância da concentração da vitamina D no sangue na proteção contra o cancro [8].

2.2.6. Deficiência em Vitamina D

A deficiência em vitamina D apresenta-se como uma das situações mais comuns e não diagnosticada um pouco por todo o mundo. Alguns estudos recentes comprovam que esta deficiência pode tornar-se pandémica [34,35]. Não existe uma concordância científica sobre a quantidade de 25OHD necessária no soro para um nível de vitamina D adequado. A maioria dos investigadores concorda que a concentração de 25OHD no soro (combinação de D₂ e D₃) deve ser superior a 50 nmol/L, mas outros afirmam que dever ser superior a 75 ou 100 nmol/L [36].

Em geral, considera-se que há deficiência em vitamina D quando os níveis totais de 25OHD são inferiores a 50 nmol/L. Por outro lado a insuficiência é definida para valores de 25OHD no soro compreendidos entre 50 a 74 nmol/L [37,38].

Uma deficiência em vitamina D severa (<12,5 nmol/L) resulta numa absorção muito reduzida de cálcio pelo intestino, visto que existe substrato 25OHD insuficiente para a produção adequada de calcitriol. A reabsorção óssea também é reduzida, pois é necessária alguma vitamina D para permitir que a hormona paratiróide (PTH) promova esta reabsorção [35]. Mas um aumento elevado da secreção da PTH, origina um hiperparatiróidismo secundário, que provoca falhas renais [39].

A deficiência em vitamina D prejudica os sistemas reprodutores e a capacidade de combater infeções, tais como, tuberculose e infeções virais [40], pode causar ou piorar doenças autoimunes e aumentar a mortalidade por doenças cardíacas como por exemplo ataque cardíaco derivado de hipertensão [41], doença do intestino inflamado [42], fraqueza muscular e quedas, fraturas [43] e cancros da mama, do cólon e da próstata [20]. Em crianças, a deficiência severa em vitamina D pode causar raquitismo

e deformações na estrutura óssea. Em adultos, pode originar a osteomalacia, fraqueza muscular [44], osteoporose e fraturas [45].

As duas formas de vitamina D, vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colecalciferol), estão disponíveis como suplementos e estão presentes em alimentos fortificados. Embora ambas as formas possam aumentar os níveis de vitamina D no sangue, a vitamina D₃ aparenta, em alguns casos produzir quantidades mais elevadas de vitamina D circulante durante o seu tempo de retenção no corpo [1].

O nível de vitamina D é influenciado pela exposição à luz solar, pigmentação da pele, vestuário, utilização de protetor solar, nutrição e administração de suplementos. Contudo apenas uma pequena percentagem da concentração de 25OHD resulta da dieta, sendo a ingestão de vitamina D tanto mais importante quanto menor for a exposição solar [46]. A concentração da 25OHD circulante varia consoante a geografia (latitude), cultura, e legislação (leis sobre a fortificação de alimentos) dos locais onde as pessoas habitam.

As metodologias utilizadas para a medição da 25OHD no soro incluem na sua grande maioria imunoensaios, tais como ensaios radioimunológicos (RIA), ensaios imunoenzimáticos, como o teste ELISA, e imunoensaios por quimioluminescência [47]. Contudo, a determinação dos compostos de vitamina D é realizada através de métodos físico-químicos, tais com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [48,49].

2.2.6.1. Fatores de Risco

O desenvolvimento de deficiência em vitamina D está associado a inúmeros fatores:

- pigmentação da pele - indivíduos com um maior teor em melanina na pele necessitam de um período de tempo superior para a síntese da mesma quantidade de vitamina D quando comparados com indivíduos de pele mais clara [46];
- uso de protetor solar que bloqueie os raios UVB [46];
- uma dieta reduzida em peixes e produtos láteos [46];
- a ausência ou reduzida exposição solar ou uma grande superfície da pele coberta por vestuário [46,50];
- não sair de casa ou estar num estado não ambulatorio;
- reduzido grau de conversão do precursor da vitamina D em pele envelhecida, tal como em idosos e indivíduos de pele escura [51];

- existência de cicatrizes de queimadura e de zonas de pele normal adjacente às queimaduras que apresentam menor capacidade de transformar o 7-des-hidrocolesterol em pré-vitamina D [52];
- a utilização a longo prazo de alguns medicamentos tais como, anticonvulsivos, glucocortisóides ou qualquer medicamento que aumente o catabolismo da vitamina D ou diminua a sua absorção [53,54].

Como referido nos pontos acima, a exposição solar reduzida ou penetração reduzida dos raios UV devido à absorção pelo elevado teor em melanina ou pela roupa aumentam o risco de deficiência em vitamina D [55].

É possível admitir a existência de grupos de risco nas populações com elevado teor de melanina na pele, tais como indivíduos de origem asiática e africana que imigram para a Europa ou para a América do Norte. Estes apresentam baixos níveis de 25OHD no soro e uma maior incidência de raquitismo e osteomalacia do que caucasianos [56,57]. O maior grupo de risco de deficiência em vitamina D é o constituído por indivíduos de pele escura [55,58]. Contudo, indivíduos de pele clara podem também apresentar deficiência em vitamina D devido à fraca exposição a luz solar. Para muitos grupos, o aumento da exposição solar não é apropriado ou prático, sendo que nestes casos a suplementação é o mais indicado [59].

Os indivíduos idosos apresentam-se, também, como um grupo com grande incidência de deficiência em vitamina D devido em parte à redução da exposição solar, possível redução da capacidade de síntese de vitamina D na pele e à ingestão baixa de cálcio associada à falta de apetite [60].

2.2.6.2. Deficiência em Vitamina D na Europa

É conhecido que a exposição casual à luz solar pode providenciar a maioria da quantidade de vitamina D necessária à população humana [61]. Contudo a síntese cutânea de vitamina D pode não ser suficiente, devido ao facto do continente europeu estar localizado a uma elevada latitude o que torna muito difícil ou quase impossível a síntese cutânea de vitamina D nos meses de Inverno (Novembro a Março), nos países nórdicos.

De facto, alguns estudos realizados em vários países europeus demonstram que a concentração de vitamina D exhibe uma variação sazonal, ou seja, a concentração da

25OHD apresenta-se bastante elevada nos meses de Verão e diminui nos meses de Inverno [62,63].

O nível de vitamina D na população da Europa, varia de acordo com a latitude, estação do ano, pigmentação da pele da população, alimentação e políticas de fortificação de alimentos implementadas por alguns países. A concentração em 25OHD é mais elevada no norte europeu do que no sul e também é mais elevado no oeste europeu do que no leste, devido ao consumo de uma maior quantidade de alimentos fortificados e suplementos vitamínicos. Os valores elevados na Noruega e na Suécia são, provavelmente, devidos a uma maior ingestão de peixes com uma elevada composição em gordura e de óleo de fígado de bacalhau. A baixa concentração em 25OHD em Espanha, Itália e Grécia pode ser devida a uma maior pigmentação da pele e a um comportamento de evitar a exposição solar ou quando existe exposição serem utilizados protetores solares com índices de proteção elevados. Em Portugal não são conhecidos os valores da concentração em 25OHD, mas não é de esperar que sejam diferentes dos outros países do sul europeu [46,64].

2.2.6.3. Sintomas de Deficiência em Vitamina D

Hoje em dia, existe uma grande variedade de efeitos na saúde associados a uma baixa concentração em vitamina D. Mas dada a natureza não específica dos sinais clínicos e dos sintomas desta deficiência, torna-se um pouco difícil o seu diagnóstico. Os níveis no soro devem-se manter muito reduzidos durante um longo período de tempo para que o paciente exiba os sinais clássicos e sintomas associados à deficiência em vitamina D, tais como raquitismo em crianças ou osteomalacia em adultos [10]. Outros sinais e sintomas de deficiência em vitamina D incluem letargia, aumento de incidência de infeções, irritação ou o agravamento de doenças crónicas tais como, artrite reumatoide, dores generalizadas, dor na região lombar, dores musculares e dores nos ossos [65]. A deficiência em vitamina D está a ser cada vez mais identificada em pacientes com doenças renais crónicas e naqueles que frequentemente sofrem quedas e estão fisicamente debilitados [50,66]. Outras doenças, de carácter autoimune e que estão relacionadas com a baixa concentração em vitamina D, incluem a esclerose múltipla, doença dos intestinos irritáveis, asma e artrite reumatoide [67]. A deficiência em vitamina D também tem sido associada à hipertensão e ao aumento da mortalidade por doença cardiovascular [68].

2.2.7. Optimização dos Níveis de Vitamina D no Soro

Muitos indivíduos em climas temperados e frios não passam o tempo suficiente no exterior para uma adequada exposição à luz solar ou podem não ingerir vitamina D suficiente através da sua dieta para a proteção da sua saúde óssea. De facto, para a produção de vitamina D suficiente em indivíduos de pele clara, é necessário uma exposição corporal de 15% - mãos, cara e braços ou uma área equivalente – à luz solar durante 10 a 15 minutos, quatro a seis vezes por semana, dependendo um pouco da quantidade do seu precursor, 7-des-hidrocolesterol, presente na pele [69,70]. Em indivíduos de pele clara com uma exposição ótima à luz solar e com uma irritação mínima, a pele deve gerar aproximadamente 10000 UI de vitamina D₃ em 24 horas de exposição. Normalmente, o aumento do nível de vitamina D demora entre 7 a 14 dias após exposição solar.

Deste modo, uma exposição solar, uma dieta adequada e eventualmente alguma suplementação em vitamina D pode prevenir a deficiência nesta vitamina D uma vez que a maioria dos adultos necessitam de 600 a 2000 UI de vitamina D por para manter os níveis fisiológicos da vitamina no soro [1].

Quanto aos níveis de 25OHD no soro, idealmente, devem situar-se entre 50 – 60 nmol/L, no final do Inverno e por isso, no final do Verão a sua concentração deve ser mais elevada de forma a permitir o decréscimo que ocorre no Inverno [71].

Considerando os factos disponíveis, a introdução de uma política nacional de fornecimento de uma rotina de suplementação de vitamina D a populações vulneráveis, como as residentes em lares, iria auxiliar na redução de quedas e fraturas [1].

2.3. Suplementação da Vitamina D

Atualmente, a preocupação com a ingestão de vitamina D tem-se tornado importante devido ao crescente reconhecimento de que a sua síntese através da exposição solar pode não ser suficiente conforme referido anteriormente. Devido a vários fatores, tais como tipo de roupa, cor da pele e latitude do local, que podem dificultar a síntese cutânea da vitamina D, pode ser necessário recorrer a fontes alimentares para satisfazer as necessidades de vitamina D [72].

Ao contrário de muitos suplementos, a adição de vitamina D tem, normalmente por objetivo corrigir uma deficiência ambiental existente (menor exposição à radiação ultravioleta) e não de corrigir a sua falta devido a razões nutricionais [73].

Nos Estados Unidos, os produtores há já alguns anos que adicionam vitamina D a determinados alimentos, tais como leite, sumo de laranja fortificado com cálcio, margarina e manteiga, e cereais de pequeno-almoço. Além disto, a vitamina D é por vezes adicionada a produtos láteos para além do leite, tais como iogurte e queijo fatiado americano, e também em massas [73,74].

Em Portugal, existem no mercado vários suplementos vitamínicos contendo a vitamina D, a maioria em associação com outros elementos. Nestes suplementos, a vitamina D é disponibilizada sob a forma de vitamina D₂ ou D₃. Tal como nos Estados Unidos e em outros países europeus, em Portugal existem no mercado alimentos fortificados tais como iogurtes, leite, cereais de pequeno-almoço, fórmulas infantis entre outros, embora no caso português não corresponda a qualquer política de saúde que constitua uma obrigação por parte dos fabricantes [64].

2.4. Dose Diária Recomendada

Existe alguma variação nas recomendações dietéticas para a vitamina D nos países europeus. A dificuldade em estabelecer doses diárias recomendadas para a vitamina D resulta da dupla natureza do fornecimento desta vitamina [75]. Na maioria dos países, a DDR apresenta-se entre 5 a 10 µg/dia, normalmente superior para os idosos e crianças com menos produção de vitamina D cutânea. Antes de 1997, a DDR de vitamina D para bebés e crianças era cerca de 10 µg (400 IU) nos Estados Unidos da América [76]. Este valor teve como base o facto de corresponder, aproximadamente, à quantidade existente numa colher de chá (5 mL) de óleo de fígado de bacalhau, que há muito tempo foi considerado seguro e eficaz na prevenção do raquitismo [77].

Em Novembro de 2010, o *Institute of Medicine* (IOM) emitiu um breve relatório sobre a ingestão de cálcio e vitamina D e sobre as doses diárias recomendadas para cada faixa etária (tabela 1) [78].

As quantidades de vitamina D são apresentadas normalmente em µg, sendo que 1 µg é equivalente a 40 UI ou 2,6 nmol de vitamina D₃ [73].

Tabela 1 – Recomendações da ingestão diária de vitamina D segundo o IOM [78]

Faixa etária	Necessidade média (estimada) (UI/dia)	DDR (UI/dia)	Máximo admitido (UI/dia)
0 a 6 meses	400	400	1000
6 a 12 meses	400	400	1500
1 a 3 anos	400	600	2500
4 a 8 anos	400	600	3000
9 a 13 anos	400	600	4000
14 a 18 anos	400	600	4000
19 a 30 anos	400	600	4000
31 a 50 anos	400	600	4000
51 a 70 anos	400	600	4000
> 70 anos	400	800	4000
14 a 18 anos, grávidas / amamentando	400	600	4000
19 a 50 anos, grávidas / amamentando	400	600	4000

Apesar da nova DDR para a vitamina D nos EUA apresentar o valor de 15 µg (600 UI) /dia [79], para a maioria dos adultos, vários estudos referem que a quantidade benéfica mais adequada seria entre 20-25 µg (800-1000 UI)/dia, com base na medição da densidade óssea e na prevenção de fratura em idosos [80,81]. Por este motivo nos EUA, a DDR foi aumentada para 800 UI/dia para indivíduos com idades superiores a 70 anos. O aumento da DDR vai permitir diminuir a probabilidade do aparecimento de hiperparatireoidismo secundário induzido pela deficiência de vitamina D e originar concentrações séricas de 25OHD mais próximas às necessárias para outros benefícios para a saúde.

As recomendações recém-publicadas do IOM conduzem a um aumento significativo dos valores anteriormente publicados, nomeadamente, referem a triplicação das doses recomendadas de vitamina D para crianças e o aumento de 1,5 a 3 vezes para adultos até a idade de 70 anos, em consequência do progresso científico no campo da vitamina D.

A Organização Mundial de Saúde, OMS, recomenda a ingestão diária de vitamina D de 5 µg (200 UI) para crianças e adultos até 50 anos (inclusive mulheres grávidas e a amamentar), 10 µg (400 UI) a partir de 51 - 65 anos e 15 µg (600 UI) para pessoas com mais de 65 anos [82]. Nos países da Europa as recomendações para a ingestão

de vitamina D variam e tendem a ser mais elevadas do que os valores propostos pela OMS [83]. Em Portugal, a DDR atual é de 5 µg/ dia para qualquer faixa etária [2].

Se o objetivo da suplementação de vitamina D é simplesmente evitar uma osteomalacia severa, então um requisito mínimo de 2,5 µg (100 UI/dia) pode ser adequado em alguns casos. Quando a suplementação apresenta o valor de 10 µg (400 UI) vitamina D/dia, o nível de 25OHD aumenta para aproximadamente 45 nmol/L [84,85]. Contudo, a ingestão de vitamina D diária de 5 µg (200 UI) pode ser adequada para manter as concentrações médias de 25OHD no soro a 25 nmol/L, embora não exista informação suficiente para esta conclusão.

Existe uma visão predominante de que a exposição ocasional do rosto e das mãos à luz solar será "suficiente" para um nível de vitamina D adequado. Na verdade, esta exposição pode fornecer 5-10 µg (200-400 UI) de vitamina D durante os meses de maior luminosidade.

No entanto, uma exposição de 5% da pele produz uma concentração média de 25OHD de apenas 35 nmol/L, o que deixaria mais de metade da população com deficiência em vitamina D [86].

Outra forma de aumentar a ingestão de vitamina D tem sido a administração de uma única dose com concentração elevada de vitamina D, quer oralmente quer por injeção. Devido ao tempo de meia vida da vitamina D ser superior a 1 ou 2 meses, esta metodologia pode fornecer níveis de vitamina suficientes para uma grande parte do ano [73].

2.5. Toxicidade da vitamina D

A vitamina D é tóxica quando ingerida em elevadas quantidades. Em adultos, tomas diárias de vitamina D acima de 50000 UI produzem sintomas de toxicidade, tais como, anorexia, desidratação, fraqueza muscular, enxaqueca, náusea, vômitos, poliúria (produção excessiva de urina) e polidipsia (beber frequentemente devido a uma sede extrema). Os níveis de cálcio no soro aumentam como consequência da desmineralização óssea e o cálcio é depositado nos rins causando hipertensão, insuficiência renal, insuficiência cardíaca e anemia. A hipervitaminose D resulta de sobressuplementação com produtos farmacêuticos e não do consumo de géneros alimentícios usuais. A hipervitaminose D também não é gerada por uma exposição solar ilimitada, uma vez que o bronzamento da pele cria um filtro para a luz UV que

previne a conversão do 7-des-hidrocolesterol em colecalciferol. A toxicidade da ingestão excessiva de vitamina D está relacionada com os efeitos farmacêuticos do 25OHD em elevada concentração, mas mesmo assim a concentração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ não aumenta abruptamente em pacientes intoxicados com vitamina D [87,88].

Contudo, a ocorrência de toxicidade não se verifica, normalmente, com doses de vitamina D até 5000 UI/dia mesmo com um tratamento a longo prazo [89,90].

2.6. Hipersensibilidade à vitamina D

O hiperparatireoidismo primário é provavelmente o exemplo mais comum de hipersensibilidade à vitamina D, promovendo a reabsorção óssea e a absorção intestinal do cálcio [91]. Em indivíduos com hiperparatireoidismo, a vitamina D aumenta a hipercalcemia, níveis elevados de cálcio no sangue, devido à ligação entre a ingestão de vitamina D e a produção $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

A hipercalcemia pode ser observada em indivíduos que sofrem de sarcoidose, tuberculose ou linfoma devido ao aumento da toma de vitamina D, podendo nestes casos específicos ser prudente reduzir ou evitar quaisquer fontes dietéticas ou ambientais de vitamina D [92].

3. Métodos Analíticos para a Determinação de Vitamina D

Durante muitos anos, a determinação da vitamina D em alimentos foi realizada através de métodos bioquímicos. Estas técnicas, embora específicas para a vitamina D, eram demoradas e com grande incerteza associada, não distinguindo os diferentes componentes bioativos da vitamina D [93].

Os métodos mais específicos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), surgiram há três décadas atrás, e foram aplicados inicialmente à determinação da vitamina D_3 em leite e em pescado [94]. Este método consistia numa saponificação lipídica, extração líquido-líquido, a purificação por HPLC semi-preparativa e quantificação por HPLC com padrões externos e deteção de UV.

Desde o método de *Thompson* publicado em 1982 [94], muitas modificações e melhorias para a análise de vitamina D em produtos alimentares têm sido publicadas. No mesmo ano, *Sivell* e *Jackson* relataram a utilização de vitamina D_2 como um padrão interno (PI) na determinação da vitamina D_3 em ovos [95,96].

Para a determinação da vitamina D₃ em gema de ovo por *Mattila* em 1992, foi relatada a introdução de uma extração em fase sólida (SPE), antes do passo de purificação em fase normal e a deteção com um detetor com uma rede de díodos (DAD) [97].

O mesmo autor referiu a determinação da 25OHD₃ na mesma matriz alimentar com um princípio semelhante, utilizando a 25OHD₂, como padrão interno [98]. Posteriormente, estes investigadores relataram a análise de ambos os compostos utilizando um método único para produtos láteos, carne crua e fígado [99].

Existem inúmeros métodos para a determinação da vitamina D, conforme referido no anexo 1, porém a grande maioria destes métodos são baseados em métodos oficiais publicados por organizações como *Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)*, *Comité Européu de Normalização (CEN)*, *International Dairy Federation*, *EUA Pharmacopeia* e *International Organization for Standardization (ISO)*.

Existem inúmeros métodos publicados pela AOAC International, a organização responsável por estabelecer métodos oficiais. Destes métodos, sete métodos químicos são referentes à vitamina D:

- Método 992.26 - vitamina D₃ em fórmulas infantis à base de leite utilizando cromatografia líquida (1992 – 1995);
- Método 995.05 - vitamina D nas fórmulas infantis utilizando HPLC (1995);
- Método 2002.05 – vitamina D₃ em alimentos selecionados (leite e queijo) utilizando HPLC de fase reversa, RP-HPLC-DAD/UV (2002);
- Método 2011.11 – Vitamina D em fórmulas infantis e suplementos nutricionais para adultos/pediátricos utilizando cromatografia líquida de ultra performance com deteção por espectrometria de massa sequencial, UHPLC – MS/MS (2011);
- Método 2011.12 – Vitamina D₂ e D₃ em fórmulas infantis e suplementos nutricionais para adultos/pediátricos utilizando UHPLC – MS/MS (2011);
- Método 2011.13 – Vitamina D₂ e D₃ em fórmulas infantis e suplementos nutricionais para adultos/pediátricos utilizando HPLC – MS/MS (2011);
- Método 2012.11 – Vitamina D₂ e D₃ em fórmulas infantis e suplementos nutricionais para adultos/pediátricos utilizando HPLC com espectrometria de massa sequencial com fonte de ionização, ESI LC – MS/MS (2012).

A metodologia de determinação da vitamina D foi constantemente desenvolvida e aperfeiçoada, incluindo o uso de um PI de vitamina D₂, resultando no método da norma europeia EN 12821 [100], seguida neste trabalho.

Existem quatro métodos oficiais que utilizam a quantificação por PI na determinação da vitamina D, o AOAC 995.05, o AOAC 2002.05, o AOAC 2011.12 e a EN 12821.

Os padrões internos devem ser adicionados à amostra o mais cedo possível, geralmente imediatamente após a preparação das alíquotas de amostras. Além disso, as suas propriedades químicas e físicas devem ser o mais semelhantes possível às dos analito. A utilização do PI na determinação da vitamina D corrige as variações de concentração ocorridas durante o procedimento experimental, ou seja, a transformação da vitamina D em pré-vitamina D durante a saponificação [102]. A determinação de vitamina D₃ pode ser efetuada utilizando a vitamina D₂ como padrão interno, e a vitamina D₃ como padrão interno quando necessário a determinação da vitamina D₂ nas amostras, pois as duas formas não se apresentam normalmente juntas em produtos alimentares fortificados [101].

A quantificação por padrão interno é realizada através de rácios de resposta do analito/padrão interno, sendo as alterações sofridas por ambos durante o procedimento corrigidas. O fator de resposta define-se como a razão entre a área do pico do analito e a área do pico padrão interno, no cromatograma obtido. Como o padrão interno adicionado à amostra apresenta as mesmas propriedades que o analito, as alterações sofridas por este irão ser proporcionais às sofridas pelo analito [102,103].

Têm sido publicados na literatura muitos estudos em que se recorre à análise de HPLC de fase normal (NP-HPLC), na determinação da vitamina D no leite e nas fórmulas infantis [104,105]. Uma vantagem de NP-HPLC reside no facto dos triglicéridos e de outros compostos serem facilmente eluidos da coluna. Assim, uma injeção direta no sistema de HPLC da amostra é, portanto, possível, evitando a necessidade de um tratamento prévio. Na NP-HPLC, a vitamina D₃ e D₂ são isocráticamente separadas dos respetivos isómeros de pré-vitamina, mas não é possível a resolução entre as vitaminas D₂ e D₃ [106].

Por sua vez também têm sido usados métodos com base em HPLC de fase reversa (RP-HPLC) para determinar a vitamina D no leite e fórmulas infantis [107,108]. Com esta metodologia foi possível separar a vitamina D₂ da vitamina D₃. Este facto permite que a vitamina D₂ possa ser usada como um padrão interno para quantificar a forma de vitamina D₃, e torna possível corrigir as perdas potenciais de vitamina D durante o longo processo de tratamento da amostra. Uma desvantagem de RP-HPLC é a impossibilidade de uma injeção direta de extrato uma vez que os compostos solúveis em gordura (interferentes) podem afetar a eficiência da coluna, a forma do pico e reprodutibilidade dos ensaios [106].

Nos últimos 10 anos, foram publicados métodos de HPLC com sistemas de deteção bastante distintos, tais como espetrometria de massa (MS) e espetrometria de massa

sequencial (MS/MS), em complemento aos DAD-UV, utilizados exclusivamente até então.

Com o aparecimento das técnicas de HPLC-MS e HPLC-MS/MS, estas também foram aplicadas à determinação da vitamina D. Apesar da alta seletividade e sensibilidade da técnica de HPLC-MS/MS, os analistas ainda enfrentam dificuldades analíticas como demoradas etapas de pré-purificação, saponificação, ou extração da fase sólida (SPE), devido à natureza complexa do analito e da matriz, que dificulta análises de rotina [109].

Os diferentes métodos utilizados para a determinação da vitamina D são bastante semelhantes no que se refere aos passos de preparação da amostra até ser injetada nos sistemas de HPLC. As amostras são saponificadas de forma a hidrolisar os lípidos e extrair as vitaminas D₂ e D₃. Estas vitaminas são recolhidas em seguida como um único pico usando NP-HPLC e são posteriormente separadas utilizando cromatografia analítica de fase reversa com deteção UV utilizando uma rede de díodos e em alguns casos espectrometria de massa. Existem variações a este método devido ao uso de diferentes temperaturas e tempos de saponificação, de diferentes solventes de extração (hexano ou éter/éter de petróleo) e na utilização de PI [110].

Existem dois problemas com os métodos normalizados para alimentos enriquecidos. Em primeiro lugar, os métodos apresentam-se bastante longos e detalhados, sendo necessária uma atenção redobrada, exigindo um analista qualificado para a diminuição do potencial erro e má precisão.

Em segundo lugar, os métodos só foram validados para vitamina D em produtos láteos enriquecidos, e não para outros tipos de alimentos. Alargar a aplicabilidade dos métodos é obrigatório para que os dados sobre a composição de alimentos sejam confiáveis. Atualmente, isto é especialmente crítico uma vez que muitos dos novos alimentos enriquecidos (por exemplo, sumo de laranja nos EUA e cereais) têm características diferentes, o que pode afetar a extração e separação de vitamina D₃ [110].

3.1. Princípios de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O equipamento de HPLC apresenta vários componentes, tais como, reservatórios para a fase móvel, bomba, injetor, coluna de separação, onde se encontra a fase estacionária, um detetor e um sistema de aquisição de dados. Muitos modelos permitem a regulação da temperatura da coluna o que indiretamente regula a

temperatura da fase móvel, e das amostras através de sistemas de arrefecimento/aquecimento [4].

Num procedimento usual, a amostra é injetada através do injetor automático e arrastada pela fase móvel que se encontra sob pressão, através da coluna que contém a fase estacionária. Os componentes da amostra são separados através de interações com a fase móvel e com a fase estacionária. Estes analitos, ao saírem da coluna, passam por um detetor que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de analito que está a passar na célula do detetor [111].

O equipamento encontra-se ligado a um computador onde se registam e processam os dados necessários de forma a gerar o cromatograma, o qual é utilizado para identificar e quantificar os componentes da mistura. Cada constituinte tem um tempo de retenção característico, que permite a sua análise qualitativa. A análise quantitativa é realizada comparando a resposta do analito presente na mistura com a resposta (área do pico) de soluções padrão cuja concentração é exatamente conhecida [111].

Os diferentes componentes de um sistema de HPLC são apresentados no diagrama na figura 4.

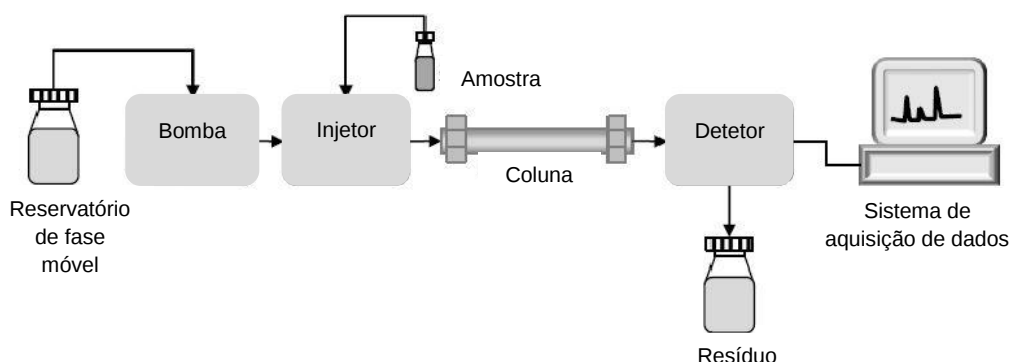


Figura 4 - Componentes de um cromatografo de HPLC [112]

Por vezes, é necessário isolar e purificar o composto desejado presente numa mistura, antes da sua identificação e quantificação, utilizando uma HPLC preparativa. Esta técnica cromatográfica permite a recolha da fração da amostra contendo o composto desejado. Com o composto purificado, procede-se à sua identificação e quantificação através de uma HPLC analítica. A diferença entre estes dois tipos de HPLC reside no tamanho da partícula que atravessa a coluna e por consequente o diâmetro da coluna utilizado [113].

Existem dois modos de eluição em HPLC: eluição isocrática em que, a composição da fase móvel é constante ao longo do tempo, quer se trate de um solvente puro ou uma

mistura de solventes [4]. A eluição gradiente, é ao contrário do modo anterior, quando ocorrem mudanças de composição da fase móvel durante a separação. A eluição em modo gradiente é útil para amostras que contêm compostos com uma vasta gama de polaridade. À medida que os rendimentos de separação diminuem, a força de eluição da fase móvel aumenta, de forma a eluir os componentes da amostra mais fortemente retidos na fase estacionária [4].

Os modos de separação em HPLC podem seguir vários mecanismos. Em análise alimentar é frequente a utilização de HPLC em fase normal e em fase reversa.

Em fase normal, a fase estacionária é polar e a fase móvel apolar, pelo que aquela retém durante mais tempo os compostos polares. Tipicamente a fase estacionária deste tipo de separação é constituída por sílica e a fase móvel é constituída por compostos orgânicos, não sendo utilizada água na fase móvel neste tipo de separação [4,114].

Hoje em dia, porque é mais reproduzível e tem maior gama de aplicabilidade, a cromatografia de fase reversa, é a utilizada com maior frequência. A maioria dos protocolos utiliza como fase móvel uma solução aquosa de um solvente orgânico polar, tal como acetonitrilo ou metanol. Esta mistura permite uma boa interação entre os analitos e a superfície das partículas não-polares, hidrofóbicas da fase estacionária [114,115]. Em fase reversa, oposto ao de fase normal, a fase móvel é polar e a fase estacionária é apolar, sendo por isso os compostos menos polares, os mais retidos na coluna.

O enchimento da coluna é realizado com sílica modificada quimicamente de forma a torná-la não polar, recorrendo à ligação de cadeias de hidrocarbonetos na sua superfície, usualmente com 8 ou 18 átomos de carbono, denominando-se colunas C₈ ou C₁₈, respetivamente. A retenção em fase reversa é baseada na interação da parte hidrofóbica do analito e as zonas hidrofóbicas da fase estacionária [4,115]. O solvente polar e as moléculas polares presentes na amostra a analisar vão interatuar fortemente entre si à medida que estas atravessam a coluna, não sendo significativa a sua interação com as cadeias de carbono ligadas à sílica (apolares). Sendo assim estas moléculas irão eluir rapidamente da coluna [114]. Os compostos não polares na mistura são atraídos pelos grupos de hidrocarbonetos ligados à sílica da fase estacionária devido a forças de dispersão de *van der Waals*. Assim, as moléculas não polares irão atravessar a coluna mais lentamente do que as polares [116].

4. Validação de um Método Analítico

A norma ISO/IEC 17025 - Requerimentos gerais para Laboratórios de Ensaio e Calibração, define validação de um método analítico como a “comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido” [117].

O principal objetivo da validação de um método é o de demonstrar a fiabilidade deste para a determinação do teor de um analito numa determinada matriz analítica [118].

O processo de validação de um método deve estar descrito num procedimento laboratorial, e as determinações dos parâmetros de validação devem ser realizadas em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados [119].

Os parâmetros de validação de um método analítico incluem: gama de trabalho/linearidade; limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação); sensibilidade; precisão; exatidão; recuperação.

➤ Gama de Trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma gama de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. Dentro desta gama pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com a concentração de analito. A gama linear de trabalho de um método de ensaio representa o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio [119].

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias. É recomendado seguir a norma ISO 8466-1 para modelos lineares e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau. De acordo com a Norma 8466-1, analisam-se 10 réplicas independentes dos padrões de concentrações mais baixa e mais elevada e calculam-se as respetivas variâncias.

Teste de homogeneidade de variâncias

Determinam-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão (S_1^2 e S_{10}^2) de acordo com a equação 1.

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (1)$$

sendo $\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$, em que y_i é o valor do sinal (área) no ponto i e $\bar{y}_i$ a média dos valores

de y_i , para $i=1$ e $i=10$,

i - o número do padrão (neste caso i vai de 1 a 10)

j - o número de repetição efetuadas para cada padrão

As variâncias são testadas para examinar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho, efectuando o cálculo do valor teste PG:

$$a) \text{ PG} = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \text{ quando } S_{10}^2 > S_1^2 \quad (2)$$

$$b) \text{ PG} = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \text{ quando } S_1^2 > S_{10}^2 \quad (3)$$

Compara-se este valor de PG com o valor F tabelado da distribuição de Snedecor/Fisher, para $n-1$ graus de liberdade:

- Se $\text{PG} \leq F$, as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.
- Se $\text{PG} > F$, as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao 1º e último padrão permitam obter $\text{PG} \leq F$ [120].

➤ Linearidade/ Curva de Calibração

A linearidade relaciona-se com a capacidade de um método analítico para produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, numa dada gama de concentração. Assim, a quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito, que no caso de uma reta corresponde a conhecer o declive e a interseção na ordenada da origem.

A calibração através de uma reta pode ser obtida utilizando padrões externos e formulada como uma expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + bx$$

em que,

y - resposta medida (altura ou área do pico em cromatografia);

x - concentração;

b - declive da curva de calibração;

a - interseção com o eixo y.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração sendo a equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

Para avaliar se a correlação linear é adequada como modelo matemático é usado o coeficiente de correlação o qual deverá ser igual ou superior a 0,995 [119].

O modelo de ajuste linear pode ser avaliado através de um modelo estatístico, referido na norma ISO 8466-1. A partir do conjunto dos pontos da gama de trabalho, e de forma a verificar se o modelo linear é adequado compara-se este com um modelo de ajuste polinomial utilizando os respetivos desvios-padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y^2} .

A diferença das variâncias (DS^2) é calculada pela equação 4:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2 \quad (4)$$

em que N é o número de padrões de calibração.

Calcula-se o valor teste, PG:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (5)$$

Compara-se este valor de PG com o valor F tabelado da distribuição de Snedecor/Fisher:

- Se $PG \leq F$, a função de calibração é linear, o ajuste polinomial não é significativamente melhor que o linear;
- Se $PG > F$, a função de calibração é não linear, ou seja, o ajuste polinomial é significativamente melhor que o linear [120].

➤ Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da variação da concentração do analito. No caso de métodos em que a calibração é feita através de uma reta a sensibilidade pode ser expressa pelo declive da reta de regressão de calibração, conforme a equação 6.

$$S = \frac{dy}{dc} \quad (6)$$

em que,

S - sensibilidade;

dy - variação da resposta do aparelho;

dc - variação da concentração [119,120].

➤ Limiares analíticos

Existem diversas formas de calcular os limiares analíticos, limite de deteção e limite de quantificação. As abordagens mais utilizadas no cálculo destes limites são apresentadas em seguida [120].

- Limite de deteção (LD)

O limite de deteção (LD) é definido como o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exato, e os métodos mais utilizados para a sua determinação são a partir da razão sinal/ruído e a partir da curva de calibração.

Em termos qualitativos, o conceito de limite de deteção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco [120].

O método da razão sinal/ruído consiste na comparação entre a medição dos sinais do composto de interesse na matriz em concentrações conhecidas e baixas do composto de interesse e um branco destas amostras. A razão sinal/ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceites como estimativas do limite de deteção, dependendo dos autores [121].

Se o LD, for determinado a partir da curva de calibração, neste caso ter-se-à:

$$LD = \frac{[3,3 \cdot S_{y/x}]}{b} \quad (7)$$

em que:

$S_{y/x}$ - desvio padrão residual da curva de calibração

b - declive da mesma [119].

- Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão.

Na maioria dos casos corresponde ao padrão de calibração de menor concentração. Este limite, após ter sido determinado, deve ser confirmado com matrizes contendo a concentração do analito próxima do limite de quantificação para averiguar se a precisão é satisfatória [119,120].

Tal como o LD, o LQ pode ser determinado a partir da razão sinal/ruído (em geral, 10:1) e ou através da curva de calibração, apresentada na equação 8, [121]:

$$LQ = \frac{[10 \cdot S_{y/x}]}{b} \quad (8)$$

em que:

$S_{y/x}$ - desvio padrão residual da curva de calibração

b - declive da curva de calibração [119].

- Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade e da precisão intermédia, sendo usualmente expressas através do desvio-padrão [118].

O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV (%)), equação 9, pode ser mais útil neste caso, pois é normalizado com base na concentração e deste modo é praticamente constante ao longo da faixa de interesse, não devendo ultrapassar os 15% [118].

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (9)$$

em que:

s - desvio padrão;

$\bar{x}$ - concentração média determinada

- Repetibilidade

A repetibilidade representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento utilizado sob mesmas condições, mesmo local, sendo que as repetições devem ser realizadas num curto espaço de tempo, normalmente no mesmo dia de análise [120]. Para avaliar a repetibilidade de um método, efectuam-se uma série de medições sobre uma mesma matriz, nas condições de repetibilidade referidas anteriormente. A estimativa da variação, variância (S^2_r) de um método de análise pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w séries de análises realizadas nas condições de repetibilidade. Tendo em conta que a repetibilidade pode variar com o teor do elemento a dosear, esta última condição assegura, em princípio, a igualdade estatística das variações de w séries de análises. Assim, a variância associada à repetibilidade (S^2_{ri}) do método de ensaio, para cada nível i de concentração é dada por:

$$S^2_{ri} = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi}-1)S^2_{wi}]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi}-1)} \quad (10)$$

em que,

S^2_{ri} - variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

S^2_{wi} - variância associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

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

p - número de laboratórios participantes [120].

- Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra ou amostras idênticas, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, variando as

condições de análise, de forma a reproduzir as variações normalmente observadas no laboratório, tais como, diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e para a sua determinação efetuam-se uma série de medições sobre a amostra, nas condições pré-definidas. Quando aplicável, este procedimento pode ser repetido sobre outras amostras, abrangendo outros níveis de concentração, já que pode variar com a concentração e a matriz.

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia, existem vários métodos para determinação e controlo deste parâmetro de qualidade, tais como, por meio da equação:

$$S_{i(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (11)$$

em que:

$S_{i(j,k)}$ - desvio padrão de precisão intermediária (onde os símbolos relativos às condições intermediárias de precisão podem aparecer entre parêntesis, ex: S_i (T.O.) significa tempo e operadores diferentes)

t – total de amostras ensaiadas;

n – total de ensaios efetuados por amostra;

j – nº da amostra, $j = 1, t$

k – nº do ensaio da amostra j , $k = 1, n$

y_{jk} – valor do resultado k para a amostra j

y_i - representa a média aritmética dos resultados da amostra j [119,120].

➤ Exatidão

A exatidão de um método analítico é definida como a aproximação entre o resultado da medição e o valor verdadeiro da amostra (normalmente desconhecido), podendo ser determinado de variadas formas:

- através da participação em ensaios interlaboratoriais;
- pelo estudo de materiais de referência certificados;
- por comparação com resultados obtidos através de métodos de referência, em que se assume o valor do método de referência como o valor verdadeiro.

Sempre que possível, os materiais de referência certificados (MRC) devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um MRC possui um valor certificado por um organismo competente para o teor de um determinado analito na amostra e uma incerteza associada. É muito importante, portanto, que o fornecimento desses MRC seja realizado por organismos reconhecidos e confiáveis (como por exemplo: *National Institute of Standards and Technology* (NIST), *LGC Standards*).

Na avaliação da exatidão utilizando um material de referência certificado, os valores obtidos pelo laboratório, média e o desvio padrão de uma série de ensaios em duplicado, devem ser comparados com os valores certificados do material de referência. Para esta comparação podem ser utilizados diversos critérios de decisão, entre os quais o erro relativo, teste de hipóteses, índice z (z-score), erro normalizado [119,120].

No caso de se recorrer ao índice z, que também se utiliza para avaliar o desempenho de um laboratório num ensaio interlaboratorial, tem-se de acordo com a equação 12:

$$z = \frac{X_{lab} - X_v}{s} \quad (12)$$

em que,

X_{lab} - valor obtido pelo laboratório;

X_v - valor aceite como verdadeiro (valor certificado do MRC ou valor aceite como verdadeiro num ensaio interlaboratorial);

s - desvio-padrão dos ensaios realizados (em todos os laboratórios, no caso de ensaios interlaboratoriais).

A avaliação é feita de acordo com o seguinte critério de decisão:

$|z| \leq 2 \Rightarrow$ resultado satisfatório;

$2 < |z| \leq 3 \Rightarrow$ resultado questionável;

$|z| > 3 \Rightarrow$ resultado insatisfatório.

➤ Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas desse mesmo analito. Às amostras pode ser adicionado o analito em pelo menos três concentrações diferentes, por exemplo, próximo do limite de deteção, próximo da concentração máxima permitida e uma concentração próxima da média da gama de trabalho do método.

Em geral, os valores de recuperação devem estar compreendidos entre 80 e 120% [122], e calculam-se através da equação 13:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (13)$$

em que,

C_1 - concentração determinada na amostra adicionada,

C_2 - concentração determinada na amostra não adicionada,

C_3 - concentração adicionada [119].

➤ Estimativa da incerteza dos resultados

A determinação de um parâmetro está sempre associada a uma incerteza de medição. O Guia ISO/IEC 99:2008, caracteriza a incerteza de um resultado como “parâmetro não-negativo que caracteriza a dispersão dos valores de uma grandeza que são atribuídos à mensuranda a partir das informações usadas” [123].

O cálculo das incertezas dos resultados pode ser realizado com base no “Guia para a Quantificação da Incerteza em Ensaios Químicos” [124]. Este guia refere várias abordagens de determinação da incerteza de medição: abordagem “passo a passo”; abordagem baseada em dados interlaboratoriais e abordagem baseada nos dados de validação.

A abordagem baseada nos dados obtidos ao longo da validação envolve a utilização dos resultados obtidos na avaliação da precisão intermédia e da exatidão.

- Quantificação da incerteza associada à precisão

Na avaliação da incerteza associada à precisão devem ser apenas utilizados os valores de precisão intermédia em vez dos valores de repetibilidade pois os valores de precisão intermédia refletem variações do método que usualmente são constantes no mesmo dia de trabalho [124]. Assim, a incerteza relativa associada à precisão ($u_{r,\text{precisão}}$), é obtida através da equação 14:

$$u_{r,\text{precisão}} = \frac{S_{i(j,k)}}{\bar{x}} \quad (14)$$

em que:

$S_{i(j,k)}$ – desvio padrão da precisão intermédia obtido a partir da equação 11

$\bar{x}$ – média da concentração determinada

- Quantificação da incerteza associada à exatidão

A determinação da incerteza associada à exatidão do método está relacionada com o erro sistemático que ocorre em todas as análises. Quando no método se avalia um MRC, estima-se a recuperação média do método ($\overline{Rm} = \frac{\bar{c}_{obs}}{c_{MRC}}$) e os valores obtidos são utilizados na avaliação da incerteza relativa associada à exatidão, $u_r(\overline{Rm})$, equação 15 [125].

$$u_r(\overline{Rm}) = \sqrt{\frac{s_{obs}^2}{n \times \bar{c}_{obs}^2} + \left(\frac{u(c_{MRC})}{c_{MRC}} \right)^2} \quad (15)$$

em que,

$\bar{c}_{obs}$ – concentração média de uma série de análises do MRC,

c_{MRC} – valor certificado do MRC,

s_{obs} – desvio padrão da série de análises do MRC,

n – número de análises do MRC,

$u(c_{MRC})$ – incerteza padrão associada ao teor certificado do MRC (referenciada no certificado de autenticidade do MRC)

Os valores das incertezas associadas à precisão intermédia e à exatidão calculados combinam-se e determina-se a incerteza expandida combinada. O cálculo desta é realizado segundo a expressão 16.

$$U_r(y) = y \times \sqrt{u_{r,precisão}^2 + (u_r(\overline{Rm}))^2} \quad (16)$$

em que, $U_r(y)$ – incerteza combinada expandida relativa; y – fator de expansão igual a 2, para um intervalo de confiança de 95%. Quando a precisão intermédia ou a exatidão são estimadas com base num número reduzido de ensaios, inferior a 6, é utilizado um fator de expansão retirado de uma tabela de *t-student* bilateral, para um nível de confiança de 95% e um número de graus de liberdade igual ao menor número de ensaios [124].

5. Objetivos

O presente trabalho visou a otimização e validação de um método analítico para a determinação da vitamina D em diversos géneros alimentícios com vista nomeadamente, à sua acreditação pela ISO 17025.

Os principais objetivos deste estudo foram os seguintes:

- Otimizar procedimentos de tratamento das amostras e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de vitamina D, baseado na norma EN 12821;
- Determinar o teor de vitamina D em vários produtos alimentares.

6. Materiais e Métodos

O procedimento para a determinação da vitamina D baseou-se na norma EN 12821 “*Foodstuffs – Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography – Measurement of cholecalciferol (D_3) and ergocalciferol (D_2)*” que apresenta um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação dos teores de vitamina D_3 ou vitamina D_2 em matrizes alimentares [100].

Os compostos de vitamina D presentes nas várias amostras são primeiramente extraídos da matriz recorrendo a saponificação, extração líquido-líquido e concentração e em seguida isolados através de um método de HPLC semi-preparativa de fase normal para posterior separação e quantificação através de um método de HPLC analítico de fase reversa, com deteção a um comprimento de onda de 265 nm e recorrendo ao método do padrão interno.

6.1. Reagentes e Padrões

Os reagentes utilizados foram os seguintes:

- Ácido Ascórbico, $C_6H_8O_6$, 99,7%, Merck;
- Etanol absoluto, C_2H_5OH , p.a., $\geq 99,9\%$, Merck
- Éter Etílico, $C_4H_{10}O$, 100%, CAS 60-29-7, Prolabo VWR
- Éter de Petróleo, p.a., ponto ebulição 40-60 °C, CAS 64749-49-0, Prolabo VWR
- Fenoltaleína, $C_{20}H_{14}O_4$, indicator ACS, 98%-102%, Número CAS 77-09-8
- Hidróxido de Potássio, KOH, 85,9%, CAS 1310-58-3, Probalo VWR
- Metanol para HPLC, CH_4O , 99,9%, CAS 67-56-1, Prolabo VWR
- 2-Propanol para HPLC, C_3H_8O , $>99,8\%$, CAS 67-63-0, Prolabo VWR
- n-heptano para HPLC, C_7H_{16} , $>99\%$, Prolabo VWR
- Sulfato de Sódio Anidro, Na_2SO_4 , p.a., $\geq 99,0\%$, Merck
- Água de grau 1 (condutividade 0,1 $\mu S/cm$) e água de grau 2 (condutividade 1 $\mu S/cm$)

Os padrões utilizados foram os seguintes:

- Vitamina D_3 (Colecalciferol), $>98\%$, $C_{27}H_{44}O$, Sigma
- Vitamina D_2 (Ergocalciferol), $>98\%$, $C_{26}H_{44}O$, Sigma

6.2. Equipamento

Durante a execução deste trabalho, utilizou-se o seguinte equipamento:

- Equipamento de HPLC utilizada para a parte analítica, marca Waters, modelo 2695 (*separation module*) com uma coluna Kromasil 100 C₁₈ com 5 µm de porosidade e 25 cm de comprimento por 4 mm de diâmetro da marca Teknokroma, e com um detetor com uma rede de díodos (DAD) da marca Waters, modelo 2996. O equipamento de HPLC analítico é constituído por um reservatório de fase móvel, forno de coluna, injetor automático, sistema de arrefecimento das amostras, bomba e um sistema de aquisição de dados como é possível verificar na figura 5;

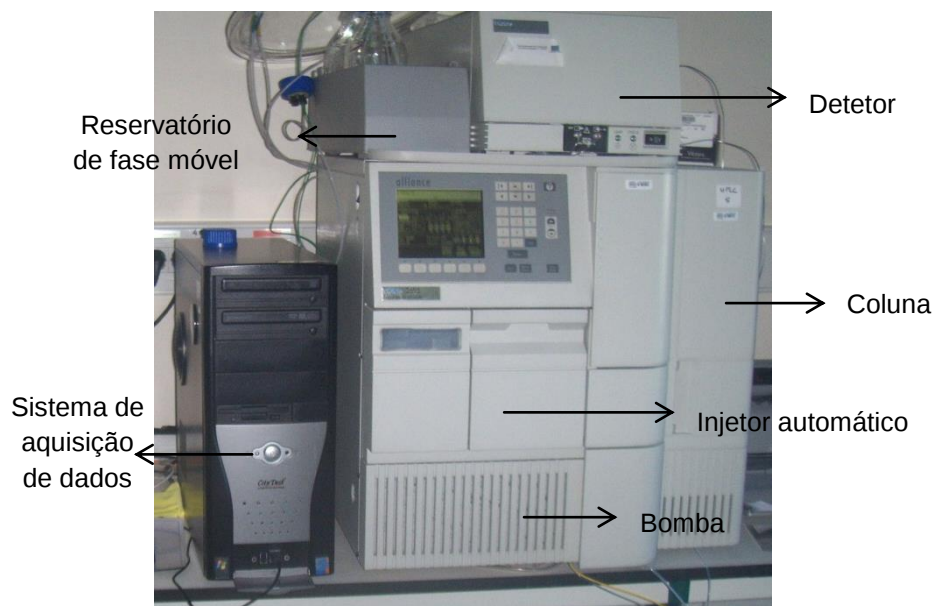


Figura 5 – Equipamento de HPLC analítico

- Equipamento de HPLC utilizado na parte semi-preparativa, marca Waters, modelo 2695 com uma coluna LiChrosorb Si 60 com 5 µm de porosidade e 25 cm de comprimento por 4 mm de diâmetro da marca Merck, e com um detetor de arranjo de díodos (DAD), marca Waters, modelo 2996. O equipamento de HPLC utilizado na parte semi-preparativa é constituído por um reservatório de fase móvel, forno de coluna, injetor automático, bomba, sistema de arrefecimento das amostras e um sistema de aquisição de dados (figura 6). Ambos os equipamentos de HPLC são sujeitos a manutenção preventiva anual;

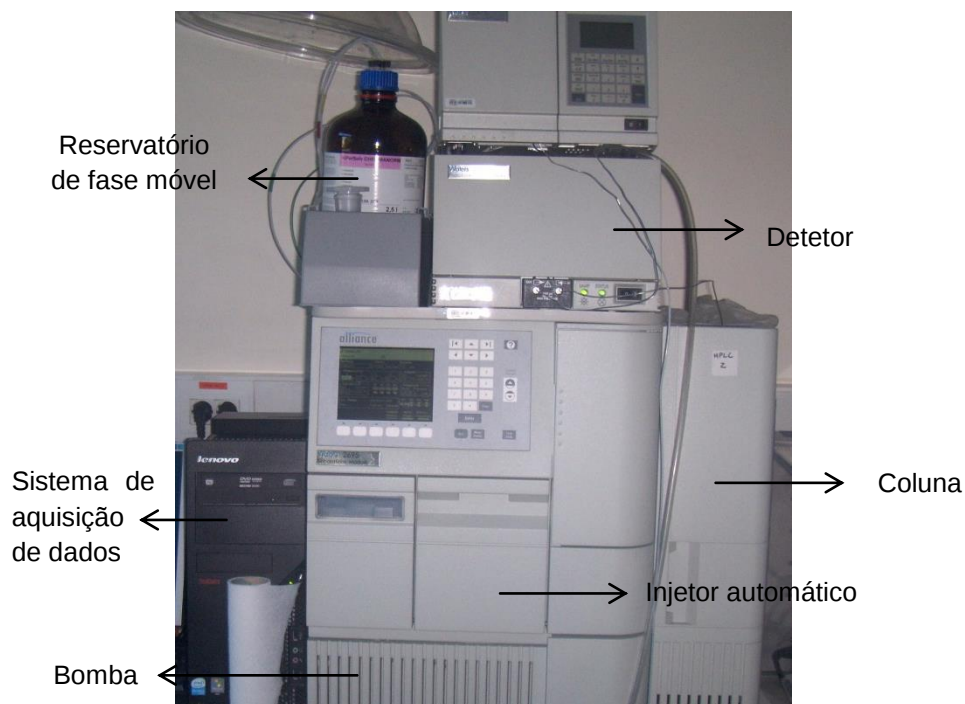


Figura 6 - Equipamento de HPLC semi-preparativo

- Balança analítica, marca Mettler Toledo, modelo XP 205, com precisão de 0,0001 g, devidamente calibrada de acordo com o exigido no âmbito da norma ISO 17025. A balança é calibrada anualmente por entidades externas ao INSA e é realizado um controlo interno mensal;
- Banho de água termostaticado, com regulador de temperatura até 100 °C com sistema de condensação incorporado, marca Trade Raypa;
- Evaporador rotativo com banho de água (*heating bath B-491*) com regulador de temperatura, devidamente calibrado de acordo com o exigido no âmbito da norma ISO 17025 e unidade de vácuo (*vacuum controler V-850*), marca Büchi, modelo R-210, fabricado na Suíça;
- Homogeneizador, marca Retsch Grindomix, modelo GM 200, fabricado na Alemanha;
- Banho de ultrassons, marca Branson (*ultrasonic cleaner*), modelo Branson 3510 com controlo de tempo e de temperatura;
- Espetofotómetro, marca Thermo Scientific, modelo Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer equipado com o *software* VISIOpro®, com verificação periódica da calibração de acordo com o exigido no âmbito da norma ISO 17025. Este equipamento é sujeito a calibrações anuais por entidades externas e uma verificação interna trimestral;
- Sistema de ultrapurificação de água, modelo Milli-Q, marca Millipore;

- Arca Congeladora ≥ -70 °C, *Legaci Refrigeration System*, marca Copeland, periodicamente ensaiada de acordo com o exigido no âmbito da norma ISO 17025;
- Frigorífico a 5 ± 3 °C, *Frigoriferi Scientifici*, marca Fiocchetti, periodicamente ensaiado de acordo com o exigido no âmbito da norma ISO 17025;
- Embalador a vácuo, Multivac, marca Geprüfte Sicherheit, modelo BG-PrüFZ.

6.3. Preparação de Soluções

6.3.1. Soluções Padrão

- Solução padrão mãe de vitamina D₂

Pesou-se aproximadamente 100 mg de padrão de vitamina D₂ até ao miligrama, numa balança analítica e dissolveu-se em etanol absoluto num balão volumétrico de vidro de 100 mL, completando-se o volume até à marca com etanol. A solução mãe contendo aproximadamente 1 mg/mL de vitamina D₂, foi armazenada a uma temperatura inferior ou igual a 4 °C, devidamente etiquetada e protegida da luz.

- Solução padrão mãe de vitamina D₃

Pesou-se aproximadamente 100 mg de padrão de vitamina D₃ até ao miligrama, numa balança analítica e dissolveu-se em etanol absoluto num balão volumétrico de vidro de 100 mL, completando-se o volume até à marca com etanol. A solução mãe contendo aproximadamente 1 mg/mL de vitamina D₃, foi armazenada a uma temperatura inferior ou igual a 4 °C, devidamente etiquetada e protegida da luz.

- Solução padrão de trabalho de vitamina D₂

Para a preparação desta solução, pipetou-se 1 mL da solução de padrão mãe de vitamina D₂ para um balão com certificado de calibração por lote de 100 mL. Perfez-se o balão com etanol absoluto.

De forma a quantificar o teor em vitamina desta solução, mediu-se a absorvância (A_{265}) numa célula de quartzo no espectrofótopmetro a um comprimento de onda de 265 nm, utilizando como branco etanol absoluto. A concentração da solução (CPD₂), µg/mL, foi obtida a partir da equação 17 [100]:

$$CPD_2 = \frac{A_{265} \times 10^4}{475} \quad (17)$$

em que:

- A_{265} corresponde ao valor da absorvância da solução padrão de trabalho de vitamina D_2 a 265 nm
- 475 corresponde ao valor do coeficiente de extinção mássico ($100 \text{ mL g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$, em solução etanólica de vitamina D_2

➤ Solução padrão de trabalho de vitamina D_3

Para a preparação desta solução, pipetou-se 1 mL da solução de padrão mãe de vitamina D_3 para um balão com certificado de calibração por lote de 100 mL. Perfez-se o balão com etanol absoluto.

De igual modo, quantificou-se o teor em vitamina desta solução (CPD_3), $\mu\text{g/mL}$, a partir da medida de absorvância a 265 nm e aplicando a equação 18 [100]:

$$CPD_3 = \frac{A_{265} \times 10^4}{480} \quad (18)$$

em que:

- A_{265} representa o valor da absorvância da solução padrão de trabalho de vitamina D_3 a 265 nm
- 480 corresponde ao valor de $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$, $100 \text{ mL g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em solução etanólica de vitamina D_3

Ambas as soluções padrão de trabalho devem ser guardadas a uma temperatura igual ou inferior a 4 °C. A medição da absorvância destas soluções tem a validade de 48 horas e deve ser repetida sempre que se volte a utilizar após este período.

➤ Soluções padrão de trabalho utilizadas nos ensaios cromatográficos

As soluções foram preparadas a partir das soluções padrão de trabalho referidas no ponto anterior. O solvente (etanol) foi evaporado num evaporador rotativo à temperatura de 40 °C e à pressão de 30 mbar. O resíduo obtido foi reconstituído no solvente adequado.

Solução de padrão de vitamina D₂ e de vitamina D₃ para a HPLC semi-preparativa

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

Solução de padrão de vitamina D₂ e de vitamina D₃ para a HPLC analítica

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

Solução de padrão de vitamina D₂ para a HPLC analítica

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

Solução de padrão de vitamina D₃ para a HPLC analítica

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

➤ Soluções de Trabalho

Solução de hidróxido de potássio, a 60%

Pesou-se 600 g de hidróxido de potássio e num balão volumétrico de 1000 mL adicionou-se um pouco de água ultrapurificada, de grau 1 com uma condutividade inferior a 0,1 µS/cm, e pouco a pouco adicionou-se o hidróxido de potássio pois a reação é exotérmica. Após todo o hidróxido de potássio estar dissolvido, perfez-se o balão com água do mesmo tipo e colocou-se a solução num recipiente apropriado e devidamente identificado.

Solução alcoólica de fenolftaleína a 1%

Dissolveu-se, num balão volumétrico de 100 mL, 1 g de fenolftaleína com etanol e completou-se o restante volume com o mesmo solvente. Esta solução, devidamente identificada, foi armazenada num frigorífico a 4 °C.

Solventes de extração

Num recipiente apropriado, preparou-se um solução de éter de petróleo e éter dietílico 80:20 (v/v); para isso adicionou-se 1600 mL de éter de petróleo e 400 mL de éter dietílico. Esta mistura foi preparada na *hotte* devido à elevada volatibilidade de ambos os solventes.

➤ Soluções de Fase Móvel

Solução de fase móvel para a HPLC semi-preparativa

Para a cromatografia semi-preparativa, foi utilizada uma fase móvel constituída por n-heptano (qualidade HPLC) e isopropanol (qualidade HPLC) numa proporção de 97:3, respetivamente. Estes dois reagentes foram colocados em frascos de fase móvel separados e desgaseificados durante cerca de 15 minutos num banho de ultrassons. A proporção desejada foi introduzida no equipamento de HPLC.

Solução de fase móvel para a HPLC analítica

Para o HPLC analítico, foi utilizada uma fase móvel constituída por metanol (qualidade HPLC) e água ultra purificada numa proporção de 95:5, respetivamente. Quando o metanol provinha de um frasco anteriormente aberto, foi filtrado sob vácuo com filtros de membrana (PALL GH Polypro 47 mm 0,45 µm) e colocado num frasco de fase móvel; a água foi colocada num frasco de fase móvel e desgaseificada durante cerca 15 minutos num banho de ultrassons. A proporção da mistura foi definida no sistema de HPLC.

6.4. Amostras

Neste trabalho foram utilizadas como amostras, alimentos disponíveis no mercado português em que a vitamina D é adicionada pelos fabricantes (amostras fortificadas) e amostras em que a vitamina D ocorre naturalmente. As amostras em estudo correspondem a matrizes disponíveis no mercado no ano de 2013, foram adquiridas em hipermercados da região de Lisboa e estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Amostras em estudo neste trabalho

Tipo de Matriz	Amostras analisadas	Caraterísticas distintas das amostras	Vitamina D especificada no rótulo	Teor em vitamina D no rótulo
Leite	Leite A	Leite de vaca meio-gordo	D ₃	0,75 µg/100 mL
	Leite B	Leite de soja de vários sabores	D ₂	0,75 µg/100 mL
	Leite C	Leite achocolatado	D ₃	0,8 µg/100 mL
Cereais	Cereal A	Cereais com sabor a chocolate	D ₃	3 µg/100 g
	Cereal B	Cereais com sabor a chocolate e caramelo	D ₃	4,3 µg/100 g
Massa	Massa Infantil	Massa contendo vegetais	D ₃	4,2 µg/100 g
Iogurte	Iogurte A	Iogurte líquido de vários sabores	D ₃	0,83 µg/100 g
	Iogurte B	Iogurte em formato de queijinho de vários sabores	D ₃	1,3 µg/100 g
	Iogurte C	Iogurte em formato de pote de vários sabores	D ₃	1,05 µg/100 g
	Iogurte D	Iogurte líquido de variados sabores	D ₃	0,75 µg/100 g
	Iogurte E	Iogurte líquido de morango	D ₃	0,75 µg/100 g
Papas Infantis	Papa A	Farinha não látea com oito cereais e mel	D ₃	16 µg/100 g
	Papa B	Farinha não látea	D ₃	13 µg/100 g
	Papa C	Leite em pó de transição	D ₃	7,5 µg/100 g
Ovos	Biológicos	Galinhas criadas por agricultura biológica	D ₃	-
	Ar Livre	Galinha criadas ao ar livre	D ₃	-
	Gaiolas	Galinhas criadas em gaiolas	D ₃	-

6.4.1. Preparação das amostras

Cada amostra analisada foi composta a partir de três lotes diferentes do produto, em quantidades iguais, exceto as papas infantis que já se encontravam disponíveis no INSA em sacos próprios e selados a vácuo.

Relativamente às amostras de leite:

- Para o leite A, leite de vaca meio gordo, adquiriu-se uma embalagem de 1 L de cada marca (três no total), retiraram-se 200 mL de cada embalagem, os quais foram colocados num recipiente e agitados formando-se assim a amostra composta homogénea. Desta amostra foram retiradas duas tomas de 100 g para dois erlenmeyers, de forma a analisar em duplicado. Em seguida, colocou-se o restante da amostra composta em tubos de plástico roscados, devidamente selados com parafilme, identificados e armazenou-se a na câmara de congelação a -70 °C.
- Foram compradas três embalagens dos leites B, leite de soja, com um sabor distinto, frutos vermelhos, chocolate e chocolate *light*, e de um lote distinto. Para o leite C, leite achocolatado, foi adquirida 1 embalagem para cada lote (3 no total). O conteúdo de cada embalagem, contendo 250 mL, foi colocado num recipiente e agitado de forma a obter-se uma amostra composta homogénea para cada um dos leites, B e C. Retirou-se duas tomas de 100 g da amostra composta de leite B para 2 erlenmeyers e procedeu-se da mesma forma para o leite C. O restante das duas amostras compostas foi colocado em tubos de plástico devidamente selados com parafilme e identificados e armazenou-se na câmara de congelação a -70 °C.

Para as amostras de cereais:

- Foram compradas três embalagens dos cereais A e três embalagens dos cereais B, todas de diferentes lotes. De cada embalagem foi pesado 50 g para um recipiente, perfazendo um total de 150 g, para cada tipo de cereal. Para os cereais A, as 150 g foram moidas num moinho durante 20 segundos e a uma velocidade de 4500 rpm e para os cereais B, por se apresentarem mais duros, as 150 g foram moidas num moinho durante 40 segundos e a uma velocidade semelhante. Após este tempo, as amostras trituradas foram colocadas em sacos adequados e estes selados a vácuo.

Para a amostra de massa infantil:

- Foram compradas 3 embalagens de lotes diferentes. De cada embalagem foi pesado 50 g para um recipiente, perfazendo um total de 150 g. Em seguida procedeu-se à moagem num moinho durante 30 segundos, a uma velocidade de 6500 rpm durante 20 segundos e 10 segundos a uma velocidade de 10000 rpm. Após este tempo, a amostra triturada foi colocada num saco adequado e este foi selado a vácuo.

Para as amostras de iogurtes:

- Para cada marca, foi utilizada uma embalagem de cada lote, no total foram utilizadas três embalagens. Cada conjunto de três embalagens foi colocado em recipientes apropriados e procedeu-se à sua homogeneização. As amostras homogeneizadas foram colocadas em tubos de plástico apropriados e devidamente identificados, dois tubos para cada marca perfazendo um total de 10 tubos. Estes tubos foram selados com parafilme e armazenados na câmara de congelação a -70 °C. Apenas uma das marcas de iogurte não apresentava 3 lotes diferentes, o iogurte E, do qual foram compradas as 3 embalagens do mesmo lote, por indisponibilidade no mercado de diferentes lotes, mas o processamento das amostras foi idêntico ao explicado anteriormente.

Por fim, para as amostras de ovos:

- Para cada tipo de ovo (biológico, ar livre e gaiolas) foram adquiridos três lotes diferentes e constituíram-se amostras compostas por tipo de produção. Tendo em consideração que apenas a gema contém vitamina D₃ a determinação da vitamina foi feita apenas nas gemas. As amostras de gemas de ovos foram armazenadas no frigorífico a 4 °C até ao dia seguinte, em que se fez a sua análise.

6.4.2. Procedimento Experimental

O processo de determinação da vitamina D envolve várias etapas fundamentais, a saponificação, a extração líquido-líquido, a concentração, a purificação/concentração através cromatografia líquida semi-preparativa e por fim a sua quantificação através de cromatografia líquida analítica.

1. Saponificação

Com as amostras homogeneizadas e tendo em consideração o limite de quantificação e o teor de vitamina D nas amostras, para cada matriz foram pesadas diferentes quantidades. Utilizou-se 50 g de iogurte, massas, cereais, ovos, 100 g de leite, 2 g de papas infantis e 5 g de leite em pó. As amostras foram sempre analisadas em duplicado.

De acordo com os resultados da optimização do processo de saponificação, descrita no ponto 7.1 no próximo capítulo, adicionou-se 100 mL de etanol absoluto, 1 g de ácido ascórbico e 7,5 mL da solução de hidróxido de potássio a 60% a cada uma das amostras.

Tendo em consideração que a vitamina D foi determinada por método do padrão interno, procedeu-se à adição de uma quantidade conhecida de padrão às amostras. Quando a amostra continha vitamina D₃ adicionou-se 0,2 mL de solução de padrão de trabalho de vitamina D₂ e quando a amostra continha vitamina D₂ adicionou-se 0,2 mL de solução de padrão de trabalho de vitamina D₃.

As amostras foram colocadas num banho de água termostaticado previamente regulado para 100 °C e sofreram um processo de saponificação durante 45 minutos.

Em seguida, os erlenmeyers foram colocados num recipiente com gelo de forma a arrefecer mais rapidamente.

2. Extração

Às soluções resultantes da saponificação, à temperatura ambiente, adicionou-se 100 mL de água purificada de forma a prevenir a formação de emulsões. As soluções foram transferidas para uma ampola de decantação de 500 mL. A extração da vitamina D das amostras foi realizada com uma solução de éter de petróleo e éter dietílico (80:20), utilizando um volume total de 75 mL (3 x 25 mL) (previamente otimizado). As fases etéreas (fase superiores) são recolhidas em ampolas de

decantação de 1000 mL. Estas fases foram lavadas com água purificada de grau 2 até a sua reação com a solução alcóolica de fenolftaleína ser neutra.

Seguidamente, as fases foram filtradas com um filtro de papel de 185 mm de qualidade 2, contendo sulfato de sódio anidro, para balões do evaporador rotativo em forma de pêra de 250 mL, de forma a evaporar o solvente, a uma temperatura de 40 °C, sob pressão de 300 mbar a qual foi, posteriormente reduzida para 20 mbar quando a quantidade de solvente era muito reduzida.

Após a evaporação dos solventes, os resíduos foram reconstituídos em 0,8 mL de n-heptano (qualidade HPLC). As soluções foram filtradas através de filtros de PVDF de 0,45 µm com o auxílio de seringas de 5 mL.

As soluções filtradas foram colocadas em frasquinhos (*vials*) adequados para o sistema de HPLC assim como a solução padrão com as mistura das vitaminas D₂ e D₃.

3. HPLC semi-preparativa

As condições para esta cromatografia foram as seguintes:

- Fluxo: 1 mL/min
- Fase móvel: n-heptano/isopropanol (97:3), modo isocrático
- Fase estacionária: LiChrosorb Si 60 com 5 µm de porosidade e 25 cm de comprimento por 4 mm de diâmetro
- Volume de injeção: 200 µL
- Temperatura da amostra: 15 °C
- Temperatura da coluna: 37 °C
- Tempo de corrida: 10 minutos

A solução padrão da mistura de vitaminas D₂ e D₃ foi injetada em primeiro lugar de forma a permitir a identificação do intervalo de tempo para a recolha da fração contendo a vitamina D nos extratos das amostras.

Os extratos das amostras foram injetados no sistema de HPLC duas vezes e as frações de interesse recolhidas para o mesmo balão de evaporador rotativo. Estes balões foram colocados no frigorífico a 4 °C de forma a prosseguir com o procedimento no dia seguinte.

No dia seguinte, o solvente foi evaporado no evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C e a uma pressão de 70 mbar. Os resíduos foram reconstituídos com 0,5 mL de metanol de qualidade HPLC e colocados em frasquinhos (*vials*), assim como as três soluções padrão de trabalho preparadas para a cromatografia líquida analítica.

4. HPLC analítica

As condições para esta cromatografia foram as seguintes:

- Fluxo: 0,8 mL/min
- Fase móvel: metanol/água (95:5)
- Fase estacionária: Kromasil 100 C₁₈ com 5 µm de porosidade e 25 cm de comprimento por 4 mm de diâmetro
- Volume de injeção: 100 µL
- Temperatura da amostra: 15 °C
- Temperatura da coluna: 37 °C
- Tempo de corrida: 25 minutos ou 60 minutos dependendo da matriz da amostra a analisar

A identificação e quantificação das vitaminas D₂ e D₃ nos extratos das amostras foi realizada recorrendo à comparação com os tempos de retenção dos padrões e das equações presentes no ponto 6.4.3.

6.4.3. Quantificação do Teor de Vitamina D

Os cromatogramas das amostras e padrões foram tratados através do *software* EMPOWER® instalado no sistema de HPLC, com vista à identificação e quantificação das vitaminas D₂ e D₃. A identificação foi realizada por comparação de tempos de retenção. A quantificação com base na área dos picos foi efetuada recorrendo ao método do padrão interno.

Para a quantificação da vitamina, foi assim necessário calcular o fator de resposta (FR) da vitamina D₃ quando utilizada a vitamina D₂ como padrão interno e vice-versa. Para esse propósito foram utilizados os valores das áreas dos picos das soluções de padrão, das duas formas de vitamina. O FR foi calculado de acordo com a equação 19 ou pelo seu inverso no caso da vitamina D₃ ser o padrão interno [100].

$$FR = \frac{A_{P,D3} \times C_{PD2}}{A_{P,D2} \times C_{PD3}} \quad (19)$$

em que:

A_{P,D3} - área do pico do padrão de vitamina D₃

A_{P,D2} - área do pico do padrão de vitamina D₂

C_{PD2} – teor de vitamina D_2 na solução padrão de trabalho, em $\mu\text{g/mL}$, obtido recorrendo à absorvância da solução padrão medida no espetofotómetro a um comprimento de onda de 265 nm.

C_{PD3} – teor de vitamina D_3 na solução padrão de trabalho, em $\mu\text{g/mL}$, obtido recorrendo à absorvância da solução padrão medida no espetofotómetro a um comprimento de onda de 265 nm.

Conhecido o valor de FR e com base nas equações 20 e 21 foi possível determinar teor em vitamina D_2 ou D_3 nas amostras analisadas [100].

$$C_{D2} = \frac{A_{D2} \times V_{PI,D3} \times C_{i,D3} \times 100}{A_{i,D3} \times (1/FR) \times M_i} \quad (\mu\text{g}/100 \text{ g de amostra}) \quad (20)$$

$$C_{D3} = \frac{A_{D3} \times V_{PI,D2} \times C_{i,D2} \times 100}{A_{i,D2} \times FR \times M_i} \quad (\mu\text{g}/100 \text{ g de amostra}) \quad (21)$$

em que,

$C_{i,D2}$ - teor de padrão interno de vitamina D_2 , em $\mu\text{g/mL}$

$C_{i,D3}$ - teor de padrão interno de vitamina D_3 , em $\mu\text{g/mL}$

$V_{PI,D2}$ - volume de padrão interno de vitamina D_2 , em mL

$V_{PI,D3}$ - volume de padrão interno de vitamina D_3 , em mL

M_i - massa da amostra, em g

FR - fator de resposta calculado com as soluções de padrão de vitamina D_2 e D_3

A_{D3} - área do pico de vitamina D_3 da solução de amostra

A_{D2} - área do pico de vitamina D_2 da solução de amostra

7. Resultados e Discussão

7.1. Estudos de Otimização dos Métodos de Tratamento das amostras

De forma a otimizar a quantidade de reagentes utilizados no tratamento das amostras e a diminuir o tempo de realização da análise das amostras, procedeu-se ao estudo dos diferentes passos envolvidos. Estes estudos foram realizados com a papa infantil C por ser aquela que apresentava um maior teor em gordura, 22,7 g de lípidos em 100 g de produto e um teor em vitamina D_3 de 7,5 μg por 100 g.

Otimização de Processo de Saponificação

No passo de saponificação foi otimizado o volume de solução de KOH a 60% a adicionar e testados dois períodos de tempo de saponificação das amostras.

A norma seguida neste trabalho, EN 12821, apresenta exemplos de condições para o processo de saponificação consoante o teor de gordura presente nas amostras (tabela 1, anexo 2)

O procedimento anteriormente utilizado no INSA, preconizava um tempo de saponificação de 1 h, à temperatura de 100 °C, utilizando 6 mL de uma solução de KOH a 60% (0,034 g/mL solução de saponificação). Tendo como ponto de partida estas condições e tendo em consideração os diferentes exemplos referidos na norma efetuou-se a optimização do volume de solução de KOH adicionada.

Procedeu-se a vários ensaios de saponificação com diferentes volumes de solução de KOH a 60% durante 1 hora. O volume da solução de KOH adicionado e o teor de vitamina D₃ obtido para cada um dos ensaios realizados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Teores de vitamina D₃ em amostras de papa infantil C sujeitas a saponificação com diferentes volumes de solução de KOH a 60%

Volume de KOH adicionado (mL)	Quantidade de KOH no volume adicionado (g)	Teor de KOH na amostra (g/mL)	Teor médio de D₃ (µg/100 g de produto)
5	3	0,029	5,5
6	3,6	0,034	6,5
7	4,2	0,039	7,3
7,5	4,5	0,042	7,5
10	6	0,055	7,2
15	9	0,078	6,7
20	12	0,10	7,4
25	15	0,12	6,3

Os valores vitamina D₃ correspondem à média dos resultados obtidos em ensaios realizados em duplicado para cada volume de KOH.

Analisando os resultados obtidos e tendo em conta que a amostra utilizada apresentava um teor em vitamina D₃ de 7,5 µg/100 g de produto, volumes de solução de KOH a 60% entre 7 e 10 mL conduziram aos melhores resultados, tendo-se

selecionado o volume de 7,5 mL de solução de KOH a 60%, minimizando-se assim o consumo de reagente.

O uso de volumes superiores não conduz a uma diferença significativa no teor de vitamina D₃ pelo que não se justifica o eventual desperdício de reagente.

Para além da otimização do volume de KOH adicionado, foi também estudado o efeito nos teores de vitamina D₃ em amostras saponificadas durante dois periodos de tempo diferentes com o objetivo de diminuir esse mesmo tempo.

No protocolo existente no INSA, a saponificação era realizada durante 60 minutos. O efeito do tempo de saponificação nas amostras de papa infantil C foi estudado para 60 e 45 minutos. Os resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Teores de vitamina D₃ determinados na papa infantil C para os dois tempos de saponificação

Teor médio de vitamina D ₃ (µg/100 g de produto)	Tempo de Saponificação (min)
6,3	60
6,8	45

Os valores de vitamina D₃ determinados correspondem à média de resultados de ensaios em duplicado para cada tempo de saponificação.

Com base nos teores de vitamina D₃ que foram encontrados, optou-se por diminuir o tempo de saponificação para 45 minutos. A redução do tempo de saponificação não conduziu a uma diminuição do teor em vitamina D₃, e conseguiu-se reduzir 15 minutos no tempo de execução.

Otimização do Processo de Extração

De forma a também otimizar a quantidade de reagentes utilizados, no processo de extração procedeu-se a estudos sobre o efeito da natureza do solvente de extração e do volume e número de extrações no teor em vitamina D₃ de papa infantil C.

A norma seguida neste trabalho, EN 12821, apresenta exemplos de condições para o processo de extração (tabela 2, anexo 2).

O procedimento anteriormente utilizado no INSA utilizava 400 mL (4 x 100 mL) de solução de extração, constituída por éter de petróleo e éter dietílico numa proporção de 80:20 (v/v).

Como referido no procedimento experimental, após as fases orgânicas contendo a vitamina D estarem reunidas, estas são evaporadas e redissolvidas no solvente

maioritário da fase móvel. Este procedimento gera um grande desperdício de solventes de extração e é bastante demorado pelo que se tentou reduzir a quantidade de solvente utilizada.

As amostras de papa infantil C foram previamente saponificadas de acordo com as condições selecionadas no ponto anterior.

Em seguida foram usadas misturas de éter de petróleo e éter dietílico com duas composições diferentes, (8:2 e 1:1) e também, éter dietílico puro. Para a mistura de composição 8:2 foi testada a adição de diferentes volumes.

Os resultados do teor de vitamina D₃ que foram obtidos nestas condições são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Teores de vitamina D₃ em amostras de papa infantil C sujeitas a extração com diferentes solventes

Solução de extração	Volume de Extração (mL)	Teor médio de D ₃ (µg/100 g)
éter de petróleo: éter dietílico (8:2)	400	7,5
	300	8,4
	200	6,2
	100	6,9
	75	6,9
	50	6,3
éter de petróleo: éter dietílico (1:1)	400	7,0
éter dietílico	400	5,1

Os teores de vitamina D₃ são resultado da média de valores de amostras em duplicado.

A tabela mostra que as extrações são mais eficientes quando se realizam com misturas de éter de petróleo e de éter dietílico.

Na extração utilizando apenas éter dietílico formaram-se 3 fases em vez das típicas 2 fases, o que dificultou o processo e provavelmente, tornou-o menos eficaz como é possível observar pelo valor obtido em vitamina D₃.

Tendo em conta que a amostra utilizada apresenta um teor de vitamina D₃ de 7,5 µg/100 g, os volumes da solução de extração que conduzem a teores de vitamina D₃ mais próximos do valor rotulado são: 400 mL e 75 mL da solução etérea 8:2 e os 400 mL da solução etérea 1:1.

Sendo o objetivo usar a quantidade mínima de volume de extração para o qual se consegue extrair com eficácia a vitamina D, foi escolhido o volume de 75 mL (3 vezes 25 mL) da solução de éter de petróleo e éter dietílico (8:2) como a melhor condição de extração.

7.2. Validação do Método de Análise

Tal como preconizado pela validação de métodos analíticos estudaram-se os parâmetros analíticos:

- Gama de trabalho e Linearidade
- Limites analíticos
- Recuperação
- Precisão e Repetibilidade
- Exatidão
- Estabilidade dos padrões da vitamina D₂ e D₃
- Monitorização da repetibilidade do injetor

É de referir que a estabilidade não se apresenta como um parâmetro obrigatório na validação de métodos analíticos, porém como o analito analisado neste trabalho é a vitamina D, a estabilidade dos padrões desta vitamina foram testados em relação ao tempo de armazenagem e à temperatura.

De forma a melhor controlar o sistema cromatográfico foi seguido um documento interno do DAN, Controlo da Qualidade Interno – Métodos Cromatográficos. Também se determinou a repetibilidade do injetor [122].

Os resultados obtidos foram introduzidos em folhas de cálculo internas do DAN do INSA, presentes no anexo 3.

- Gama de Trabalho e Linearidade

Embora a quantificação da vitamina D seja efetuada através do método de padrão interno, e por isso a calibração não envolva a utilização de uma reta de calibração, estudou-se a linearidade com soluções padrão de trabalho de vitamina D₃, uma vez que no método de padrão interno raramente o teor adicionado coincide com o da amostra, sendo por isso mais seguro confirmar se a resposta do equipamento (medida

pela área do pico) ao teor de vitamina é linear, pelo menos na vizinhança dos teores determinados.

Tendo em consideração a gama de teores de vitamina D nas amostras, estudou-se a linearidade entre 0,1 µg/mL e 3,5 µg/mL para a vitamina D₃. Na tabela 6, apresentam-se os volumes de solução padrão mãe (10 µg/mL) utilizados para cada analito para construir as curvas, com posterior diluição de 1/10 de forma a obter os teores desejados.

Tabela 6 – Teores de vitamina D e volumes de solução mãe (10 µg/mL) para construir as curvas

Teor de vitamina D (µg/mL)	0,1	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5
Volume de D ₃ adicionado (mL)	0,1	0,45	0,9	1,4	1,8	2,3	2,7	3,2

Utilizando a gama de trabalho descrita anteriormente, a reta obtida através do programa EMPOWER[®] está representada na figura 7 (relatório completo obtido através do programa EMPOWER[®] no anexo 4 e respetivos coeficientes de validação no anexo 5).

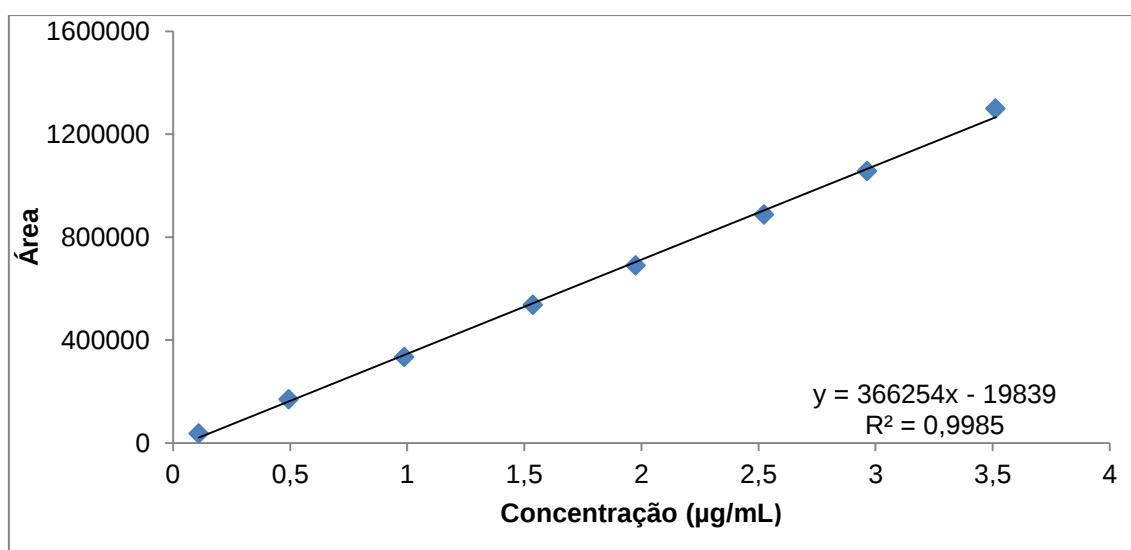


Figura 7 – Reta de calibração para a análise da vitamina D₃

A linearidade da reta obtida foi confirmada através da análise do coeficiente de determinação (r^2), 0,998. Tendo em consideração que este valor é superior a 0,995 e que a inspeção visual nos permite ver que não existem grandes desvios em relação à curva traçada, podendo afirmar que a resposta do equipamento ao teor de vitamina D na solução é linear.

Com vista a verificar se seria possível a quantificação da vitamina D₃ pelo método da curva de calibração (padrões externos) em vez de pelo método do padrão interno analisaram-se 5 replicados de papa infantil A, e procedeu-se à determinação da vitamina D₃ pelos dois métodos. Os teores determinados apresentam-se na tabela 7.

Tabela 7 – Teor de vitamina D₃ na amostra papa A

	Padrão Externo (µg/100g)	Padrão Interno (µg/100g)
Teor em vitamina D ₃	17,8	22,8
	25,6	22,8
	13,9	20,8
	14,8	23,5
	16,7	18,6
Média	17,8	21,7
Desvio padrão	4,66	2,03
Desvio Padrão Relativo (%)	26,2	9,35

O produto utilizado apresenta no seu rótulo um teor em vitamina D₃ de 16 µg/100 g. Os resultados evidenciam que há uma variabilidade muito superior quando se recorre ao método do padrão externo (desvio padrão relativo de 26%) e por isso a metodologia do padrão interno é mais adequada para quantificar a vitamina D.

Assim apesar da utilização da curva de calibração ser mais prática não é adequada para esta metodologia, que envolve muitos passos conduzindo a perdas ao longo do processo de extração do analito da matriz.

- Limite de Deteção e Limite de Quantificação

Como neste trabalho se aplica o método do padrão interno, em que não é utilizada uma curva de calibração, os limites analíticos do método foram determinados com base na razão sinal/ruído.

Inicialmente escolheram-se três teores de vitamina D, 0,1, 0,15 e 0,5 µg/mL para a determinação do limite de quantificação. Destes três teores foram preparados cinco soluções independentes de cada teor, a partir das soluções padrão de trabalho de ambas as formas da vitamina D (D₂ e D₃).

A razão sinal/ruído foi determinada com base no quociente entre a altura do pico de vitamina D a uma determinada concentração e a altura da linha de base do

cromatograma (ruído). Os resultados obtidos para os três teores estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Razão sinal/ruído para os teores de 0,1, 0,15 e 0,5 µg/mL em vitamina D

Teor (µg/mL)	Soluções	Razão Sinal/Ruído	Média da Razão
0,1	1	3,67	3,68
	2	3,67	
	3	4,00	
	4	3,40	
	5	3,64	
0,15	1	3,00	4,59
	2	4,17	
	3	5,30	
	4	5,20	
	5	5,27	
0,5	1	10,3	16,0
	2	13,7	
	3	13,8	
	4	21,5	
	5	20,5	

Como a relação sinal/ruído para o limite de quantificação deve ser 10:1, o teor de 0,1 µg/mL foi rejeitado. Mas como a relação sinal/ruído para o limite de deteção é de 3:1, este teor pode ser definido como limite de deteção [121].

Com base nos resultados obtidos e tendo em consideração que para limite de quantificação a razão sinal/ruído deve ser próxima de 10:1, estimou-se que o limite de quantificação seria 0,25 µg/mL. Assim repetiu-se este procedimento para este teor e confirmou-se que efetivamente que a média da razão sinal/ruído apresentava um valor de 9,5, tendo-se por isso fixado o limite de quantificação analítico em 0,25 µg/mL.

Com os valores dos limites de deteção e quantificação assim definidos, verificou-se a validade do limite de quantificação em amostra, através de ensaios de recuperação, considerando-se que o seu valor é adequado quando a recuperação estiver entre 80 e 120% e verificou-se também a validade do limite de deteção em amostra, sendo que neste caso basta que o pico do analito (pico no cromatograma) seja visível [122].

Para os ensaios de recuperação, utilizou-se uma amostra de papa infantil, contendo cacau e quiona, existente no INSA que não apresentava qualquer das formas de vitamina D. Foram realizados ensaios independentes tendo-se fortificado as amostras,

com teores de vitaminas D₂ e D₃, que conduzissem a teores nos extratos de amostra analisados no sistema de HPLC próximos dos valores dos limiares analíticos previamente determinados. Para fortificar as amostras utilizaram-se 0,5 mL e 0,16 mL, para os limites de quantificação e deteção, respetivamente, das soluções padrão de trabalho com uma diluição 1/20. Os valores da taxa de recuperação (%) para os limites de quantificação apresentam-se na tabela 9.

Tabela 9 – Recuperação no LQ e presença do pico no LD para a vitamina D₂ e D₃

Vitamina	Cromatograma	Recuperação (%)
	Limite de Deteção (0,1 µg/mL)	Limite de Quantificação (0,25 µg/mL)
Vitamina D ₂	Pico visível	85,6
Vitamina D ₃	Pico visível	83,5

Tendo em conta os valores de recuperação para ambas as formas de vitamina D, e os critérios anteriormente definidos pode afirmar-se que o teor de 0,25 µg/mL se apresenta como um limite de quantificação adequado. De igual modo verificou-se que o teor de 0,1 µg/mL se apresenta como um limite de deteção adequado.

Com estes valores definidos, determinou-se os limites do método, com base nas reconstituições e diluições efetuadas durante o procedimento experimental e utilizando a massa da amostra mais elevada (100 g). O limite de deteção do método apresenta um valor de 0,1 µg/100 g de amostra e o limite de quantificação do método apresenta um valor de 0,25 µg/100 g de amostra.

Os valores obtidos como limites do método são valores adequados para os teores de vitamina D presentes nas amostras analisadas neste trabalho.

- Precisão

Os parâmetros de precisão (repetibilidade e precisão intermédia) foram avaliados com as três amostras de papas infantis, A, B e C tendo os cálculos sido efetuados recorrendo à folha de cálculo apresentada no anexo 6.

Repetibilidade e Precisão intermédia

Os estudos de repetibilidade foram efetuados mantendo todas as condições nomeadamente o analista, no mesmo dia, o mesmo equipamento, a mesma fase móvel, utilizando quatro replicados de três amostras diferentes, num total de 12

ensaios. Como referido na introdução, a repetibilidade pode exprimir-se através do coeficiente de variação (CV_r), apresentando-se os valores obtidos na tabela 10.

Tabela 10 – Coeficiente de variação da repetibilidade

Papas infantis	Teor rotulado em vitamina D₃ ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	CV_r (%)
Papa A	16	4,5
Papa B	13	5,8
Papa C	7,5	5,4

Como é possível observar na tabela, o coeficiente de variação de repetibilidade varia entre 4,5 e 5,8%. Combinando os diferentes valores obtidos para o coeficiente de variação da repetibilidade através da variância obtém-se um valor de coeficiente de variação da repetibilidade de 5,3%.

Os estudos de precisão intermédia foram realizados de modo a verificar a concordância entre os resultados obtidos variando parâmetros tais como, o dia do ensaio, a fase móvel, os padrões de trabalho das vitaminas. As amostras foram analisadas em duplicado pelo mesmo analista com o mesmo equipamento mas em 3 dias diferentes. Tal como a repetibilidade, a precisão intermédia é expressa através do coeficiente de variação, o seu valor apresenta-se na tabela 11.

Tabela 11 – Coeficiente de variação da precisão intermédia

Papas infantis	Teor em vitamina D₃ ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	CV_R (%)
Papa A	16	9,6
Papa B	13	10
Papa C	7,5	11

O coeficiente de variação da precisão intermédia apresentou valores entre 9,6 e 11%. Seguindo-se a metodologia utilizada para a repetibilidade obteve-se um coeficiente de variação da precisão intermédia de 10%, nas condições do laboratório em que os ensaios foram realizados.

Tendo como referência a norma EN 12821, os valores referentes ao CV_r (%) para amostras de papas infantis e leite em pó são de 8,9 e 8,2%, respetivamente, e os valores de CV_R (%) 13 e 14%. Comparando estes com os resultados obtidos, os

valores presentes na norma apresentam uma maior variação, quer no mesmo dia quer em dias diferentes.

Assim, pode então afirmar-se que o método seguido neste trabalho permite a repetição no mesmo dia e em dias distintos variabilidades inferiores às apresentadas na norma.

- Recuperação

A recuperação foi também determinada utilizando as mesmas três amostras de papas infantis. Como o método de determinação de vitamina D utilizado neste trabalho é o de padrão interno, a recuperação foi avaliada através da quantidade de padrão interno (vitamina D₂) recuperada. Assim, a área do pico de vitamina D₂, normalizada para o teor, obtida para amostra foi comparada com a área do pico de vitamina D₂, normalizada para o teor, obtida para o padrão.

Utilizando a equação (13), determinou-se a recuperação para as três amostras e respetivos duplicados (tabela 12).

Tabela 12 – Recuperação de vitamina D₂ em papas infantis

Papas infantis	Recuperação (%)	Média
Papa A	75,0	69,1
	63,1	
Papa B	100	85,3
	70,5	
Papa C	89,0	84,2
	79,4	

Os valores de recuperação devem estar entre 80 e 120%, nos ensaios realizados há uma amostra de papa infantil se encontra fora desse intervalo. Quando os valores da recuperação são inferiores a 80%, em princípio, os resultados devem ser corrigidos tendo em consideração a recuperação obtida no ensaio. Atendendo a que se trata de um método de padrão interno os teores de vitamina D₃, vêm sempre corrigidos pela recuperação, assumindo-se que as recuperações para os dois analitos (D₂ e D₃) são idênticas, o que constitui uma boa aproximação uma vez que são substâncias quimicamente idênticas.

- Exatidão

A exatidão deste método foi avaliada através da quantificação da vitamina D₃ numa amostra de um material de referência certificado (MRC), o NIST 1849a, que apresentava um teor em vitamina D₃ de 11 µg/100 g.

Este MRC foi analisado nas mesmas condições que todas as amostras analisadas após a otimização do método de saponificação e de extração. O teor médio obtido de vitamina D₃ foi de 12,9 µg/100 g.

A exatidão do método foi avaliada através do cálculo do *z-score*, equação 12, sendo que um valor de *z-score* igual ou inferior a 2 corresponde a um resultado satisfatório, sendo insatisfatório para valores iguais ou superiores a 3.

O valor de *z-score* obtido para o MRC analisado foi de $1,50 \leq 2$, sendo por isso um resultado satisfatório.

Para além da análise deste MRC, foram também analisados dois materiais de referência, MR, uma pasta de peixe (*Fish Paté*) e o FAPAS Milk Powder 2179 (leite em pó). Tem sido obtidos valores de *z-score* inferiores a 2 para ambos os MR.

- Estabilidade dos padrões de vitamina D₂ e D₃

A estabilidade das soluções de trabalho de vitamina D₂ e de vitamina D₃ foi estudada recorrendo a soluções com teor de 0,5 µg/mL, utilizada na determinação dos limites analíticos. Para isso colocou-se em viais que foram armazenados numa arca de congelação a -70 °C, e analisados durante um determinado período de tempo.

No dia da sua preparação, as soluções foram injetadas no sistema de HPLC e as áreas obtidas foram registadas para ambas as vitaminas. Ao fim de 35 dias e de 50 dias à temperatura de -70 °C, voltaram a injetar-se no sistema de HPLC as soluções e as áreas das vitaminas foram registadas.

Na tabela 13 estão presentes os valores das áreas registadas nos vários dias para a vitamina D₂ e D₃.

Tabela 13 – Efeito do tempo de armazenamento nas áreas dos picos de vitamina D₂ e de vitamina D₃ de 0,5 µg/mL

Dia	Área dos Picos		
	0	35	50
Vitamina D ₂	170494	153919	129361
	162957	160504	126737
Vitamina D ₃	243161	223868	191293
	230020	224805	190543

Para analisar os resultados, realizou-se um teste t, a um nível de significância de 5%, comparando as áreas dos picos das duas soluções congeladas com as da solução inicial. Comparando a solução armazenada durante 35 dias com a do dia 0, os valores de p obtidos para a vitamina D₂ e D₃ foram de 0,199 e 0,312, respetivamente. E comparando os resultados obtidos para a solução armazenada durante 50 dias, os valores de p obtidos para a vitamina D₂ e D₃ foram 0,040 e 0,090, respetivamente.

Tendo em consideração os valores de p obtidos para a vitamina D₂ e D₃, pode afirmar-se que as soluções de padrão com um teor de 0,5 µg/mL são estáveis e podem ser utilizadas até 35 dias de armazenamento a -70 °C.

Após 50 dias os valores obtidos para as áreas dos padrões não são estatisticamente iguais, ou seja, estes padrões não podem ser utilizados.

- Monitorização da repetibilidade do injetor

De acordo com o protocolo interno de controlo cromatográfico do INSA, o sistema deve ser controlado através da monitorização do injetor e do tempo de retenção.

Para este controlo, foi realizada a monitorização da repetibilidade do injetor, o que permite verificar a precisão do aparelho. A monitorização foi realizada através da programação no aparelho de HPLC de 10 injeções para duas soluções correspondentes aos pontos extremos de quantificação, 0,25 µg/mL e 3,5 µg/mL de teor em vitamina D₃.

Na tabela 14, apresentam-se os valores obtidos das áreas para as dez injeções de cada teor.

Tabela 14 – Repetibilidade do injetor

Injeções	Vitamina D ₃	
	0,25 µg/mL	3,5 µg/mL
1ª injeção	106839	1182708
2ª injeção	100490	1182420
3ª injeção	96835	1183552
4ª injeção	105389	1181142
5ª injeção	103246	1184034
6ª injeção	106040	1190444
7ª injeção	96846	1176718
8ª injeção	101326	1207748
9ª injeção	104427	1195491
10ª injeção	106839	1123887
Média	102382	1180814,1
Desvio Padrão	3763,77	21896,8
CV(%)	3,68	1,85

A repetibilidade do injetor baseada no valor do seu coeficiente de variação, CV (%), que deve apresentar um valor igual ou inferior a 5% [122].

Conforme se observa na tabela 16, os valores de CV (%) obtidos apresentam-se abaixo dos 5%, 3,68% para o teor correspondente ao primeiro ponto que corresponde ao limite de quantificação e 1,85% para o teor mais elevado.

Deste modo, pode afirmar-se que o injetor do aparelho utilizado apresenta uma repetibilidade adequada.

- Incerteza dos Resultados Obtidos

Neste trabalho, o cálculo das incertezas foi realizado seguindo uma abordagem com base nos dados da validação do método, nomeadamente, recorrendo aos valores de precisão intermédia e exatidão determinados previamente, anexo 7.

A precisão intermédia foi determinada utilizando as três papas infantis, A, B e C, e recorrendo aos dados obtidos durante a validação do método.

Os valores determinados de incerteza para as três papas são apresentados na figura 8.

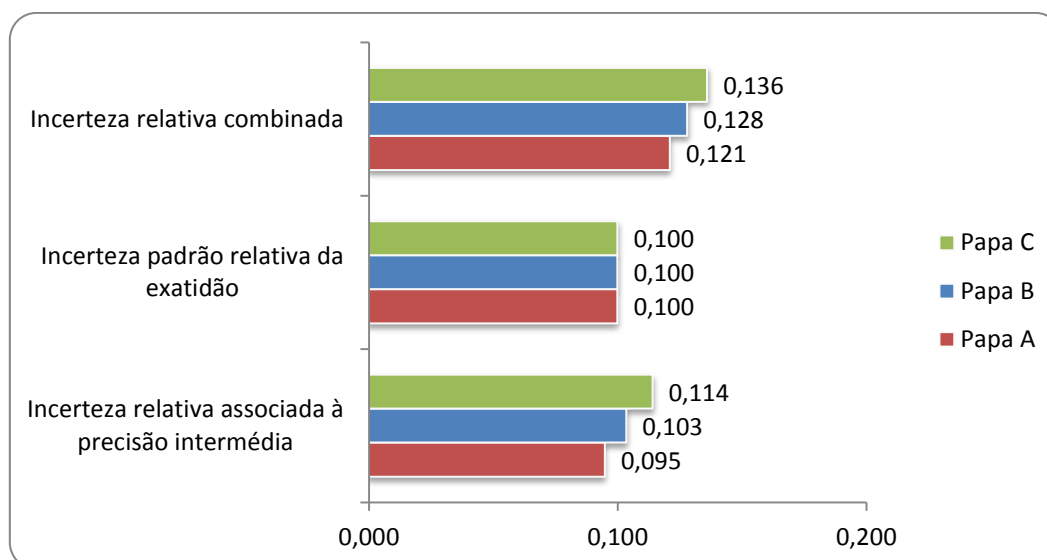


Figura 8 – Incerteza padrão combinada relativa para as amostras de papa infantil

Ao analisar os resultados obtidos para as incertezas combinadas expandidas relativas, pode afirmar-se que para teores em vitamina D mais baixos (papa C - 7,5 µg/100 g) existe uma maior incerteza no resultado obtido, sendo esta de 14%, enquanto que para os teores mais elevados de vitamina, 16 µg/100 g e 13 µg/100 g a incerteza apresentou valores de 13 e 12%, respetivamente.

Com os valores determinados de incerteza combinada relativa para as três matrizes, e para que se obtenha a incerteza para o método validado, realizou-se a média quadrática dos valores. O valor obtido para a incerteza padrão combinada relativa para os resultados obtidos através do método validado foi de 13%. Tendo isso em consideração o intervalo de confiança de 95%, o fator de expansão é 2, a incerteza combinada expandida relativa é de 26%.

- Especificidade e Seletividade

De forma a comprovar que o método é específico e seletivo para as duas formas de vitamina D, as figuras 9 e 10 apresentam, respetivamente, os cromatogramas obtidos para a solução padrão de trabalho da vitamina D₂ e D₃ e para uma amostra de papa A, apresentam-se no anexo 8 cromatogramas representativos de cada matriz analisada.

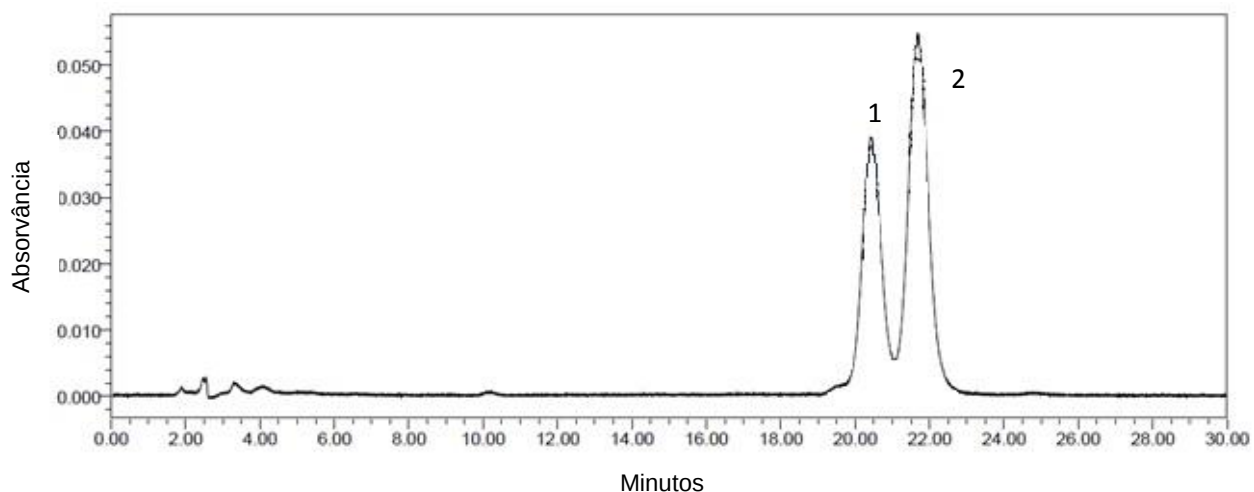


Figura 9 – Cromatograma dos padrões de vitamina D₃ e D₂, 1 – Vitamina D₂ (TR: 20,423 minutos) e 2 – Vitamina D₃ (TR: 21,673 minutos)

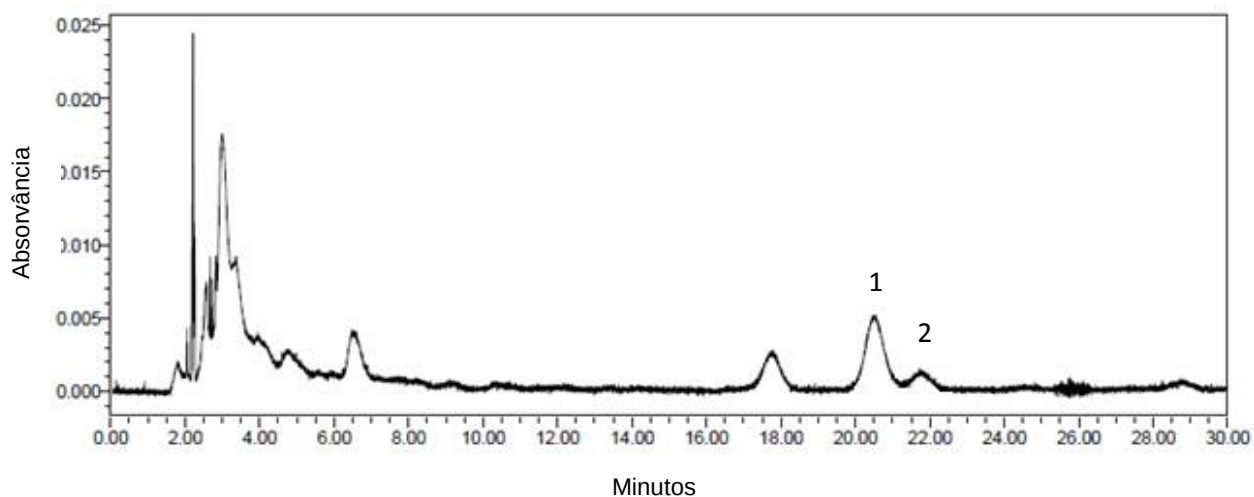


Figura 10 – Cromatograma da amostra de papa A, 1 – Vitamina D₂ (TR: 20,517 minutos) e 2 – Vitamina D₃ (TR: 21,730 minutos)

Nos cromatogramas apresentados, é possível observar claramente os dois picos relativos à vitamina D₂ e vitamina D₃ respetivamente, quer quando se trata de uma amostra (figura 10) quer quando se trata de um padrão (figura 9), não existindo qualquer interferente no tempo de retenção característico desta vitamina. Pode então afirmar-se que o método é seletivo e específico para a vitamina D.

7.3. Teor de vitamina D nas amostras

Com o método baseado na norma EN 12821 otimizado para os passos de saponificação e extração, e após validação, foram analisadas amostras de várias matrizes alimentares, tentando-se abranger a maioria das matrizes existentes no mercado português fortificadas com vitamina D. Foram igualmente analisados ovos, produtos que contêm naturalmente vitamina D.

Todas as amostras foram processadas e analisadas de acordo com o procedimento descrito, e os cálculos foram efetuados utilizando a folha de cálculo apresentada no anexo 4.

Na tabela 15, apresentam-se os valores médios de vitamina D determinada nas várias amostras analisadas em duplicado e respetivos valores dos rótulos.

Para facilitar a comparação dos teores em vitamina D nas várias amostras, apresentam-se na figura 11, os resultados que foram obtidos sob a forma de um gráfico de barras.

Tabela 15 – Vitamina D nas amostras analisadas (rotulado e determinado)

Amostras	Teor de vitamina D ₃ no rótulo (µg/100 g)	Teor de vitamina D ₃ determinado laboratorialmente (µg/100 g) ± incerteza
Cereal A	3	1,1 ± 0,3
Cereal B	4,3	1,7 ± 0,4
Massa Infantil	4,2	5,2 ± 1,4
Iogurte A	0,83	0,6 ± 0,2
Iogurte B	1,3	1,5 ± 0,4
Iogurte C	1,05	0,39 ± 0,09
Iogurte D	0,75	0,6 ± 0,2
Iogurte E	0,75	0,8 ± 0,2
Leite A	0,75 µg/100 mL 0,73 µg/100 g*	0,28 ± 0,07
Leite B	0,75 µg/100 mL (vitamina D ₂) 0,73 µg/100 g*	0,5 ± 0,1 (vitamina D ₂)
Leite C	0,8 µg/100 mL 0,78 µg/100 g*	0,6 ± 0,2
Ovos Biológicos	-	1,9 ± 0,5
Ovos Ar Livre	-	1,6 ± 0,4
Ovos Gaiolas	-	1,4 ± 0,4
Papa A (alimento infantil à base de cereais em pó)	16	22 ± 6
Papa B (alimento infantil à base de cereais em pó)	13	22 ± 6
Papa C (fórmula infantil em pó)	7,5	7 ± 2

*valor calculado tendo em atenção a massa volúmica do leite

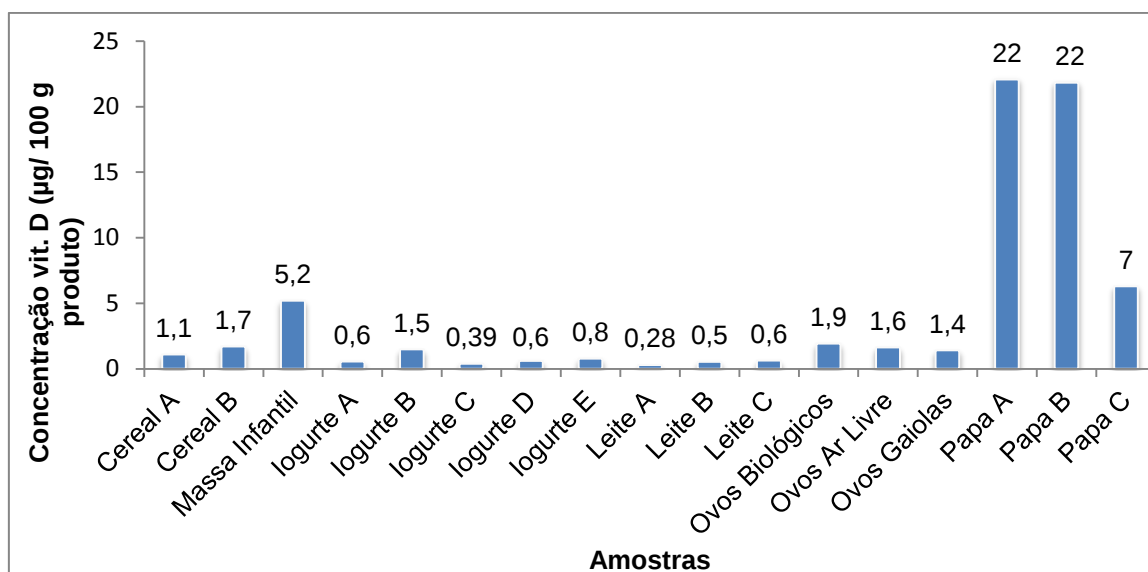


Figura 11 – Teores em vitamina D determinados para as amostras analisadas

Ao analisar os valores obtidos, é possível afirmar que mesmo os alimentos fortificados com vitamina D apresentam um teor relativamente reduzido, com algumas exceções, tais como as papas infantis.

Os leites são as matrizes que contêm menos vitamina D e as papas infantis são as que apresentam uma maior quantidade, sendo necessário algum cuidado no seu consumo, tendo em consideração a DDR (5 µg). Devido ao facto das papas infantis serem direccionadas para crianças jovens, a adição de vitamina D constitui uma forma de prevenção do raquitismo e deformação óssea.

Ao comparar-se os ovos provenientes de três modos de produção diferentes é possível verificar, que as diferenças nos resultados obtidos não são significativas, tendo em consideração a incerteza dos resultados obtidos através deste método (26%). Num estudo realizado por *Jackson et al.*, [96], foram analisados ovos inteiros liofilizados tendo sido obtido um valor médio, para a vitamina D₃ de 1,6 µg/100 g, o que é concordante com os valores obtidos nos ovos analisados neste trabalho.

No que respeita às amostras de cereais, cereal A e B, os valores obtidos apresentaram-se substancialmente inferiores ao rotulado, 63% e 60%, respetivamente. Esta discrepância pode ser devida à falta de controlo de qualidade por parte de alguns dos fabricantes dos produtos analisados, uma vez que os produtos se encontravam dentro do seu prazo de validade. Provavelmente tendo em consideração o seu processo de fabrico, a homogeneização da vitamina D adicionada neste tipo de produtos será difícil.

A amostra de massa infantil apresentou um desvio positivo de 23% em relação ao valor rotulado, desvio este que não é significativo tendo em conta o valor da incerteza dos resultados de 26%.

As amostras de iogurte, iogurte A, C e D, apresentaram desvios negativos em relação à rotulagem, 33%, 63%, 20%, respetivamente enquanto os iogurtes B e E apresentaram desvios positivos em relação ao rotulado, 13% e 4%. Os iogurtes B, D e E apresentam desvios baixos podendo ser considerados como aceitáveis, tendo em consideração a incerteza da medição de 26%.

As amostras de leite, A, B e C apresentaram desvios negativos em relação ao rótulo de 62%, 26% e 21%, respetivamente. Os leites B e C apresentam um desvio não significativo, tendo em conta a incerteza da medição, podendo considerar-se que estão bem rotulados.

Por fim as amostras de papas infantis, a papa A e B apresentaram desvios positivos em relação ao rotulado, 40% e 66%, respetivamente, enquanto a papa C apresentou um desvio negativo de 13% em relação ao rotulado. Neste caso o teor da papa infantil C não apresenta um desvio significativo, tendo em atenção a incerteza dos resultados, podendo considerar-se como bem rotulado. Frequentemente os fabricantes adicionam aos produtos com um prazo de validade relativamente longo, quantidades de nutrientes que se degradam, como é o caso da vitamina D, acima do valor rotulado para que no fim do prazo de validade ainda contenham o valor rotulado.

Com excepção das amostras de ovos, num total de 14 amostras fortificadas com vitamina D, sete amostras apresentaram teores de vitamina D diferentes do rotulado, sendo que em cinco os teores eram inferiores ao rotulado.

Tendo em conta que a DDR de vitamina D, em Portugal é de 5 µg/dia, das 17 amostras analisadas, quatro apresentaram um teor por 100 g superior. Mas analisando as porções referidas nos respetivos rótulos, 30 g no caso das papas infantis e 60 g para a massa, apenas a papa A e B apresentaram valores superiores à DDR, quando se ingerir uma porção.

Considerando que uma porção de qualquer tipo de cereal ou papa é de 30 g e juntando com 100 mL de leite, para a combinação de papa A e com leite A, verifica-se que o consumidor poderá ingerir 6,9 µg de vitamina D (ultrapassando a DDR). Por outro lado a ingestão de uma porção do cereal A com 100 mL de leite A apenas resultaria numa ingestão de 0,61 µg de vitamina D (muito abaixo da DDR).

Os resultados obtidos indiciam que alguns produtos existentes no mercado português apresentam desvios significativos em relação aos valores rotulados, o que sugere que devem ser implementadas medidas corretivas ao nível dos produtores. No entanto, estes desvios não põem em causa a saúde. Os resultados sugerem ainda que é

necessário algum cuidado no consumo de alimentos cujas porções ingeridas resultam numa ingestão de vitamina D acima da DDR, embora o seu consumo excessivo não resulte em princípio em efeitos tóxicos no organismo, pois de acordo com a literatura com uma ingestão de vitamina D inferior a 125 µg/dia não ocorre toxicidade mesmo que esta quantidade seja ingerida durante um longo periodo de tempo [91,92].

8. Conclusão

O método proposto para a determinação da vitamina D em diversas matrizes alimentares apresentou resultados confiáveis, podendo ser utilizado regularmente na determinação da vitamina D.

Com a otimização do tratamento das amostras, foi possível reduzir a quantidade de reagente utilizado (81%) e o tempo de execução da análise (30%).

O método validado quantifica a vitamina D através do método de adição de padrão interno.

Em relação aos valores obtidos para os parâmetros da validação do método, os limites analíticos apresentaram valores reduzidos que permitiram a deteção/quantificação de teores baixos de vitamina D. O limite de deteção analítico apresenta um valor de 0,1 µg/mL o que resulta no valor de 0,1 µg/100 g para limite de deteção do método e o limite de quantificação analítico apresenta um valor de 0,25 µg/mL resultando num valor de 0,25 µg/100 g limite de quantificação do método, considerando uma massa de amostra de 100 g.

Os coeficientes de variação para a precisão intermédia e para a repetibilidade apresentaram valores médios de 10% e 5,3%, respetivamente. Estes valores são inferiores aos referidos na norma EN 12821, podendo-se afirmar que as alterações realizadas foram benéficas na precisão deste método.

Relativamente ao parâmetro da exatidão e ao valor obtido para o z-score, 1,50 correspondente a um resultado satisfatório, pelo que não é necessário corrigir os valores obtidos.

A incerteza expandida relativa dos resultados das medições efetuadas com este método foi de 26%.

Aparentemente o tipo de produção dos ovos analisados (biológicos, ar livre e gaiolas) não influencia o seu teor em vitamina D.

Do total das 17 amostras analisadas, duas apresentaram um teor em vitamina D superior à dose diária recomendada em Portugal (5 µg/dia) quando se ingere uma porção (30 g).

9. Propostas de Trabalho Futuro

Após a otimização e validação deste método, e sendo estes processos contínuos, são sugeridas seguidamente algumas propostas que podem ser realizadas futuramente:

- Realizar um estudo mais aprofundado da estabilidade da vitamina D, a diferentes temperaturas de armazenamento, nomeadamente à temperatura de 4 °C;
- Realização de ensaios de precisão do método (repetibilidade e precisão intermédia) com diferentes matrizes;
- Determinar no passo de saponificação a relação entre a quantidade de KOH adicionada e a quantidade de gordura na amostra a analisar de forma a ajustar a quantidade de reagente à quantidade de gordura, minimizando assim o consumo deste reagente;
- Realizar um estudo sobre o efeito da temperatura de saponificação e numa maior gama de tempos de saponificação na determinação do teor em vitamina D;
- Determinar a vitamina D nos alimentos ingeridos pela população portuguesa de forma a avaliar a sua ingestão pela população, o que poderá ser feito recorrendo às amostras a recolher no âmbito do projeto *TDS EXPOSURE* (que envolve 19 países da União Europeia, participando Portugal no estudo piloto de dieta total, incluído no projeto);
- Analisar mais alimentos fortificados existentes no mercado e confirmar em outros lotes dos produtos em que se observaram desvios significativos se essa tendência se mantém de forma a serem implementadas medidas corretivas.

10. Referências Bibliográficas

- [1] Wimalawansa SJ (2012), *Vitamin D in the New Millennium*, Current Osteoporosis Reports 10, p. 4 – 15;
- [2] Decreto-Lei nº 54, 28 de Maio 2010, Artigo 3, Anexo I;
- [3] Swanson MA, Evenson P (2002), *Nutricional Additives*, p. 225 - 263, in: Branen AL, Davidson PM, Salminen S, Food Aditives, Second Edition;
- [4] Ball GFM (2000), *Fat-soluble vitamins*, p. 321 - 402, in: Nollet LML, Dekker M, Food analysis by HPLC, second edition;
- [5] Ball GFM (1988), *Fat – Soluble Vitamin Assays in Food Analysis – A Comprehensive Review*, Elsevier applied science;
- [6] Navia JM (1971), *Vitamin D group*. 2. Chemistry. In The Vitamins, 2nd edn, Vol. III (W. H. Sebrell, Jr & RS Harris, eds), Academic Press, New York, pp. 158 – 203;
- [7] Farber E (1953), *Nobel Prize Winners in Chemistry*, Abelard-Schuman, New York;
- [8] Dixon KM, Mason RS (2009), *Vitamin D*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 41, p. 982 – 985;
- [9] Holick MF (2007), *Vitamin D deficiency*, The New England Journal of Medicine 357, p.266-281;
- [10] Holick MF (1981), *The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system*, The Journal of Investigative Dermatology 77, p. 51–58;
- [11] Lehmann B, Genehr T, Knuschke P, Pietzsch J, Meurer M (2001), *UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in an in vitro human skin equivalent model*, Journal of Investigative Dermatology 117, p. 1179–1185;
- [12] Mason RS, Posen S (1979), *The relevance of 25-hydroxycalciferol measurements in the treatment of hypoparathyroidism*, Clinical Endocrinology 10, p. 265–269;
- [13] Holick MF (2002), *Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health*, Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity 9, p. 87–98;
- [14] Barral D, Barros AC, Araújo RPC (2007), *Vitamina D: Uma Abordagem Molecular*, Odontopediatria e Clínica Integrada 7, p. 309-315;
- [15] Holick MF (2004), *Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis*, American Journal of Clinical Nutrition 79, p.362–371;
- [16] Rosen CJ (2011), *Vitamin D insufficiency*, The New England Journal of Medicine 364, p.248-254;
- [17] Clements MR, Chalmers TM, Fraser DR (1984), *Enterohepatic circulation of vitamin D: a reappraisal of the hypothesis*, Lancet 1, p.1376–1379;
- [18] Reddy GS, Tserng KY (1989), *Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through C-24 oxidation pathway*, Biochemistry 28, p.1763–1769;
- [19] Davies M, Heys SE, Selby PL, Berry JL, Mawer EB (1997), *Increased catabolism of 25-hydroxyvitamin D in patients with partial gastrectomy and elevated 1,25-dihydroxyvitamin D*

- levels. *Implications for metabolic bone disease*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 82, p.209–212;
- [20] Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Ferrari P, van Duijnhoven FJ, Norat T, Pischon T (2010), *Association between prediagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study*, British Medical Journal 340, b5500;
- [21] Holick M (2003), *Vitamin D: a millennium perspective*, Journal of Cellular Biochemistry 88, p. 296-307;
- [22] Mason RS, Sequeira VB, Gordon-Thomson C (2011), *Vitamin D: The light side of sunshine*, European Journal of Clinical Nutrition 65, p.986-993;
- [23] Grady LT, Thakker KD (1980), *Stability of solid drugs: degradation of ergocalciferol (vitamin D₂) and cholecalciferol (vitamin D₃) at high humidities and elevated temperatures*, Journal of Pharmaceutical Sciences 69, p.1099-1102;
- [24] Krampitz G (1980), *Vitamin D in Animal Nutrition*, F. Hoffmann – La Roche & Co. Ltd, Basle, Switzerland;
- [25] DeLuca HF (1978), *Vitamin D*, in Handbook of lipid research, Vol II (HF DeLuca, ed), Plenum Press, New York, pp. 69-144;
- [26] Hanewald KH, Mulder FJ, Kenning KJ (1968), *Thin-layer chromatographic assay of vitamin D in high-potency preparations*, Journal of Pharmaceutical Sciences 57, p.1308-1312;
- [27] Mulder FJ, de Vries EJ, Borsje B (1971), *Chemical analysis of vitamin D in concentrates and its problems*, 12, Analysis of fat-soluble vitamins, Journal of the Association of Official Analytical Chemists 54, p.1168-1174;
- [28] Chen PS, Terepka R, Lane K & Marsh A (1965), *Studies of the stability and extractability of vitamin D*, Analytical Biochemistry 32, p.81-90;
- [29] Bender AE (1979), *The effects of processing on the stability of vitamins in foods*, in *Proceedings of the Kellogg Nutrition Symposium*, London, 14th-15th Dec., 1978 (Taylor TG ed), MTP press, Lancaster, p.111-125;
- [30] Miller BE, Norman AW (1984), *Vitamin D*, in Handbook of Vitamins, Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects (Machlin LJ, ed), Marcel Dekker, Inc., New York, p.45-97;
- [31] Nordin BE (1997), *Calcium and osteoporosis*, Nutrition 13, p.664–686;
- [32] Nordin BE, Morris HA (2010), *Recalculation of the calcium requirement of adult men*, The American Journal of Clinical Nutrition 93, p.442–445;
- [33] Peterlik M, Cross HS (2005), *Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases*, European Journal of Clinical Investigation 35, p.290–304;
- [34] Bosomworth NJ (2011), *Mitigating epidemic vitamin D deficiency: The agony of evidence*, Canadian Family Physician 57 (1), p.16–20;
- [35] Goldstein D (2009), *The epidemic of vitamin D deficiency*, Journal of Pediatric Nursing 24 (4), p.345–346;
- [36] Chesney RW (2010), *Vitamin D and The Magic Mountain: the antiinfectious role of the vitamin*, Journal of Pediatrics 156 (5), p.698–703;

- [37] Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, et al (2005), *Estimates of optimal vitamin D status*, Osteoporosis International 16 (7), p.713–716;
- [38] Okazaki R (2007), *Vitamin D deficiency and vitamin D insufficiency*, Nippon Naika Gakkai Zasshi 96 (4), p.742–747;
- [39] Holick MF (2004), *Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease*, The American Journal of Clinical Nutrition 80, p.1678–1688;
- [40] Chesney RW (2010), *Vitamin D and The Magic Mountain: the anti-infectious role of the vitamin*, Journal of Pediatrics 156 (5), p.698–703;
- [41] Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, et al. (2011), *Vitamin D supplementation: a promising approach for the prevention and treatment of strokes*, Current Drug Targets 12 (1), p.88–96;
- [42] Levin AD, Wadhera V, Leach ST, et al. (2011), *Vitamin D Deficiency in Children with Inflammatory Bowel Disease*, Digestive Diseases and Sciences 56 (3), p.830-836;
- [43] Wimalawansa SJ (2011), *Vitamin D: Everything You Need to Know*, Homagama, Sri Lanka. Publisher: Karunaratne & Sons, 2011;
- [44] Holick MF (2006), *High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health*, Mayo Clinic Proceedings 81 (3), p.353–373;
- [45] Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, et al. (2009), *Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials*, Archives of Internal Medicine 169 (6), p.551–561;
- [46] van Schoor NM, Lips P (2011), *Worldwide vitamin D status*, Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 25, p.671-680;
- [47] Kleerekoper M, Schleicher RL, Eisman J, et al.(2011), *Clinical applications for vitamin D assays: what is known and what is wished for*, Clinical Chemistry 57 (9), p.1227–1232;
- [48] Kushnir MM, Ray JA, Rockwood AL, et al. (2010), *Rapid analysis of 25-hydroxyvitamin D₂ and D₃ by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and association of vitamin D and parathyroid hormone concentrations in healthy adults*, American Journal of Clinical Pathology 134 (1), p.148–156;
- [49] van den Ouweland JM, Beijers AM, Demacker PN, et al. (2010), *Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay*, Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 878 (15–16), p.1163–1168;
- [50] Flicker L, Mead K, MacInnis RJ, et al. (2003), *Serum vitamin D and falls in older women in residential care in Australia*, Journal of the American Geriatrics Society 51 (11), p.1533–1538;
- [51] MacLaughlin J, Holick MF (1985), *Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃*, The Journal of Clinical Investigation 76 (4), p.1536–1538;
- [52] Klein GL, Wimalawansa SJ, Kulkarni G, et al. (2005), *The efficacy of acute administration of pamidronate on the conservation of bone mass following severe burn injury in children: a double-blind, randomized, controlled study*, Osteoporosis International 16 (6), p.631–635;

- [53] Deplas A, Debais F, Alcalay M, et al. (2004), *Bone density, parathyroid hormone, calcium and vitamin D nutritional status of institutionalized elderly subjects*, The Journal of Nutrition Health and Aging 8(5), p.400–404;
- [54] Harinarayan CV, Ramalakshmi T, Prasad UV, et al. (2004), *High prevalence of low dietary calcium, high phytate consumption, and vitamin D deficiency in healthy south Indians*, The American Journal of Clinical Nutrition 85 (4), p.1062–1067;
- [55] Springbett P, Buglass S, Young AR (2010), *Photoprotection and vitamin D status*, Journal of Photochemistry and Photobiology 101, p.160–168;
- [56] Roy DK, Berry JL, Pye SR, et al. (2007), *Vitamin D status and bone mass in UK South Asian women*, Bone 40(1), p.200–204;
- [57] van der Meer IM, Middelkoop BJ, Boeke AJ, et al. (2011), *Prevalence of vitamin D deficiency among Turkish, Moroccan, Indian and sub-Saharan African populations in Europe and their countries of origin: an overview*, Osteoporosis International 22 (4), p.1009-1021;
- [58] Grover SR, Morley R (2001), *Vitamin D deficiency in veiled or darkskinned pregnant women*, Medical Journal of Australia 175, p.251–252;
- [59] Glass DM, Lens M, Swaminathan R, Spector TD, Bataille V (2009), *Pigmentation and vitamin D metabolism in Caucasians: low vitamin D serum levels in fair skin types in the UK*, Public Library of Science 4, e 6477;
- [60] Sambrook PN, Cameron ID, Chen JS, Cumming RG, Dursavula S, Herrmann M et al. (2011), *Does increased sunlight exposure work as a strategy to improve vitamin D status in the elderly: a cluster randomised controlled trial*, Osteoporosis International 23, p.615-624;
- [61] Holick MF (1996), *Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D*, Journal of Nutrition 126, p.1159-1164;
- [62] Brot C, Vestergaard P, Kolthoff N, Gram J, Hermann AP & Sørensen OH (2001), *Vitamin D status and its adequacy in intake, sun exposure and serum parathyroid hormone*, British Journal of Nutrition 86, suppl. 1, p.97-103;
- [63] Scharla SH, Scheidt-Nave C, Leidig G, Woitge H, Wuster C, Seibel MJ & Ziegler R (1996), *Lower serum 25-hydroxyvitamin D is associated with increased bone resorption markers and lower bone density at the proximal femur in normal females: a population-based study*, Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes 194, p.289-292;
- [64] Associação Portuguesa dos Médicos de Clínica Geral (APMCG) (2009), Serviço de Higiene e Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Sociedade Portuguesa de Doenças Ósseas Metabólicas (SPO DOM), Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, *Declaração Portuguesa da Vitamina D*;
- [65] Arvold DS, Odean MJ, Dornfeld MP, et al. (2009), *Correlation of symptoms with vitamin D deficiency and symptom response to cholecalciferol treatment: a randomized controlled trial*, Endocrine Practice 15(3), p.203–212;
- [66] Dharmarajan TS, Akula M, Kuppachi S, et al. (2005), *Vitamin D deficiency in community older adults with falls of gait imbalance: an underrecognized problem in the inner city*, Journal of Nutrition for the Elderly 25(1), p.7–19;

- [67] Souberbielle JC, Body JJ, Lappe JM, Plebani M, Shoenfeld Y, Wang TJ *et al.* (2010). *Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice*, Autoimmunity Reviews 9, p.709–715;
- [68] Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B *et al.* (2008), *Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality*, Archives of Internal Medicine 168, p.1340–1349;
- [69] Wimalawansa SJ (2011), *Vitamin D: An essential component for skeletal health*, Annals of the New York Academy of Sciences 1240(1), p.90–104;
- [70] Ahmed SF, Franey C, McDevitt H, *et al.* (2011), *Recent trends and clinical features of childhood vitamin D deficiency presenting to a children's hospital in Glasgow*, Archives of Disease in Childhood 96(7), p.694–696;
- [71] van der Mei IA, Posonby AL, Engelsen O, Pasco JA, McGrath JJ, Eyles DW *et al.* (2007), *The high prevalence of vitamin D insufficiency across Australian populations is only partly explained by season and latitude*, Environmental Health Perspectives 115, p.1132–1139;
- [72] Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN (2004), *Vitamin D fortification in the US and Canada: current status and data needs*, The American Journal of Clinical Nutrition 80, 1710–1716;
- [73] Vieth R (1999), *Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety*, The American Journal of Clinical Nutrition 69, p.842-856;
- [74] Holden JM, Lemar LE (2008), *Assessing vitamin D contents in foods and supplements: challenges and needs*, The American Journal of Clinical Nutrition 88, p.551-553;
- [75] Prentice A (2002), *What are dietary requirements or calcium and vitamin D?*, Calcified Tissue International 70, p.83-88;
- [76] National Academy of Sciences (1989), *Recommended dietary allowances*, 10th ed. Washington, DC: National Academy Press;
- [77] Park EA (1940), *The therapy of rickets*, The Journal of the American Medical Association 115, p.370–379;
- [78] Institute of Medicine (2010), *Dietary Reference Intakes for Calcium and vitamin D*;
- [79] Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes (1997), *Dietary reference intakes: calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride*, Washington, DC: National Academy Press;
- [80] Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE (1997), *Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older*, The New England Journal of Medicine 337, p.670–676;
- [81] Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, *et al.* (1992), *Vitamin D₃ and calcium to prevent hip fractures in the elderly woman*, The New England Journal of Medicine 327, p.1637–1642;
- [82] WHO (2004), *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*, 2nd Edition. Geneva, Switzerland;
- [83] Doets EL *et al.* (2008), *Current micronutrient recommendations in Europe: towards understanding their differences and similarities*, European Journal of Nutrition 47, p.17- 40;

- [84] Chel VG, Ooms ME, Popp-Snijders C, et al. (1998), *Ultraviolet irradiation corrects vitamin D deficiency and suppresses secondary hyperparathyroidism in the elderly*, Journal of Bone and Mineral Research 13, p.1238–1242;
- [85] Lips P (1996), *Prevention of hip fractures: drug therapy*, Bone 18, p.159–163;
- [86] Davie MW, Lawson DE, Emberson C, Barnes JL, Roberts GE, Barnes ND (1982), *Vitamin D from skin: contribution to vitamin D status compared with oral vitamin D in normal and anticonvulsant-treated subjects*, Clinical Science 63, p.461–472;
- [87] Miller DR & Hayes KC (1982), *Vitamin excess and toxicity*, in *Nutritional Toxicology*, vol I (J.N. Hathcock, ed), Academic Press, New York, p.81-133;
- [88] Omaye ST (1984), *Safety of megavitamin therapy*, in *Nutritional and Toxicological Aspects of food safety* (Friedman M, ed), Plenum Press, New York, p.169-203;
- [89] Ross AC, Manson JE, Abrams SA, et al. (2011), *The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 96(1), p.53–58;
- [90] Hathcock JN, Shao A, Vieth R, et al. (2007), *Risk assessment for vitamin D*, The American Journal of Clinical Nutrition 85(1), p.6–18;
- [91] Bell NH (1998), *Renal and nonrenal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylases and their clinical significance*, Journal of Bone and Mineral Research 13, p.350–353;
- [92] Lockefeer JH (1990), *Vitamin D poisoning; real and spurious*, Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde 134, p.1931–1934;
- [93] Johnsson H, Hessel H (1987), *High performance liquid chromatographic determination of cholecalciferol (vitamin D₃) in food—a comparison with a bioassay method*, International Journal for Vitamin and Nutrition Research 57, p. 357–365;
- [94] Thompson JN, Hatina G, Maxwell WB, Duval S (1982), *High performance liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milks, margarine, and infant formulas*, Journal of AOAC International 65, p.624–631;
- [95] Sivell LM, Wenlock RW, Jackson PA (1982), *Determination of vitamin D and retinoid activity in eggs by HPLC*, Human Nutrition: Applied Nutrition 36A, p.430–437;
- [96] Jackson PA, Shelton CJ, Frier PJ (1982), *High-performance liquid chromatographic determination of vitamin D₃ in foods with particular reference to eggs*, Analyst 107, p.1363–1369;
- [97] Mattila P, Piironen V, Bäckman C, Asunmaa A, Uusi-Rauva E, Koivistoinen P (1992), *Determination of vitamin D₃ in egg yolk by high-performance liquid chromatography with diode array detection*, Journal of Food Composition and Analysis 5, p.281–290;
- [98] Mattila P, Piironen V, Uusi-Rauva E, Koivistoinen P (1993), *Determination of 25-hydroxycholecalciferol content in egg yolk by HPLC*, Journal of Food Composition and Analysis 6, p.250–255;
- [99] Mattila P, Piironen VC, Uusi-Rauva E, Koivistoinen P (1995), *Contents of cholecalciferol, ergocalciferol and their hydroxylated metabolites in milk products and raw meat and liver as determined by HPLC*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 43, p.2394–2399;

- [100] EN 12821 (2000), *Foodstuffs – Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography – Measurement of cholecalciferol (D_3) and ergocalciferol (D_2)*;
- [101] Blake CJ (2007), *Status of Methodology for the Determination of Fat-soluble Vitamins in foods, dietary supplements, and vitamin premixes*, Journal of AOAC International 90 (4), p. 897 – 910;
- [102] Tan A, Hussain S, Musuku A, Massé R (2009), *Internal standard response variations during incurred sample analysis by LC-MS/MS: Case by case trouble-shooting*, The Journal of Chromatography B 877, p.3201-3209;
- [103] Nilsson LB, Eklund G (2007), *Direct quantification in bioanalytical LC-MS/MS using internal calibration via analyte/stable isotope ratio*, The Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43, p.1094-1099;
- [104] W. Horwitz (Ed.) (2002), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, vol. 11, AOAC International, Maryland, p. 28;
- [105] van den Berg H, Boshuis PG, Schreurs (1986), *Determination of vitamin D in fortified and nonfortified milk powder and infant formula using a specific radioassay after purification by HPLC*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 34, p.264-268;
- [106] Nollet LML (Ed.) (1996), *Handbook of Food Analysis*, vol. 1 (Physical Characterization and Nutrient Analysis), Marcel Dekker Inc., New York, p. 601;
- [107] Hagar AF, Madsen L, Wales L et al (1994), *Reversed-phase liquid chromatographic determination of vitamin D in milk*, Journal of AOAC International 77, p.1047;
- [108] Silva MG, Green AE, Sanders JK, Euber JR, Saucerman JR (1992), *Reversed-phase liquid chromatographic determination of vitamin D in infant formulas and enteral nutritionals*, Journal of AOAC International 75, p.566;
- [109] Schadt HS, Gössl R, Seibel N, Aebischer CP (2012), *Quantification of vitamin D_3 in feed, food and pharmaceuticals using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Journal of AOAC International 95 (5), p.1487 – 1494;
- [110] Phillips KM et al (2008), *Development and validation of control materials for the measurement of vitamin D_3 in selected US foods*, Journal of Food Composition and Analysis 21, p.527-534;
- [111] Clark J (2009), *High Performance Liquid Chromatography – HPLC*;
- [112] Czaplicki S, *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds*, INTECH 2004 – 2013, consultado em 29 de Agosto de 2013: http://www.intechopen.com/source/html/44034/media/image2_w.jpg;
- [113] Agilent Technologies (2000), *Semi-preparative purification of synthesis products with the Agilent high-throughput analysis system*, Agilent Technologies Company;
- [114] Vogel A (2002), *Análise Química Quantitativa*, Livros Técnicos e Científicos Editora, 6ª ed.
- [115] Claessens HA (1999), *Characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography – column testing, classification and chemical stability*, Data Library Technische Universiteit Eindhoven;
- [116] Corradini D, Phillips TM (2010), *Handbook of HPLC*, Second Edition, CRC Press;

- [117] International Standard Organization (1999), *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, ISO/IEC 17025;
- [118] Committee for Medicinal Products for Human Use (2011), *Guideline on Bioanalytical method validation*, European Medicines Agency;
- [119] Inmetro (2007), *Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre a validação de métodos de ensaios químicos*, Instituto Nacional de Metrologia, DOQ-CGCRE-008 Revisão 02;
- [120] RELACRE (2000), *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, IPQ, Portugal;
- [121] Ribani M, Bottoli C, Melo L, (2004), *Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos*, Química Nova 27 (5), p. 771 – 780;
- [122] Departamento de Alimentação e Nutrição (2012), *Controlo da Qualidade Interno - Métodos Cromatográficos*, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge;
- [123] Guia ISO/ IEC 99 (2008), *Vocabulário Internacional de Metrologia*, Instituto Português da Qualidade;
- [124] Instituto Português da Acreditação (2007), *Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos*;
- [125] Bilodeau L, Dufresne G et al (2011), *Determination of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in foodstuffs by HPLC UV-DAD and LC–MS/MS*, Journal of food composition and analysis 24, p. 441 – 448;
- [126] Jette J, Ina C, Torben L, Lars O (2004), *A new method for the determination of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in meat*, Journal of food composition and analysis 17, p.777-787;
- [127] Lone H, Soren J (2011), *Vitamin D analysis in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) with C₃₀ reversed phase column and UV detection – Easy and acetonitrile-free*, Journal of Chromatography A 1218, p. 1835-1841;
- [128] Paulo M, Daniel C, Luís G, Aquiles B (2007), *Detection and Quantification of provitamin D₂ and vitamin D₂ in Hop (Humulus lupulus L.) by Liquid Chromatography-Diode Array Detection – Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*, Journal of Agricultural and food chemistry 55, p.7996 – 8002;
- [129] Rie J, Daniele S, Jorn S, Poul J, Jette J (2013), *Quantification of vitamin D₃ and its hydroxylated metabolites in waxy leaf nightshade, tomato and bell pepper*, Food Chemistry 138, p.1206 – 1211;
- [130] Perales S, Delgado MM et al. (2005), *Liquid chromatographic determination of vitamin D₃ in infant formulas and fortified milk*, Analytica Chimica Acta 543, p.58 – 63;
- [131] Saenger A, Laha T, Bremner D, Sadrzadeh S (2006), *Quantification of serum 25-hydroxyvitamin D₂ and D₃ using HPLC-Tandem Mass Spectrometry and Examination of Reference Intervals for Diagnosis of Vitamin D Deficiency*, American Society for Clinical Pathology 125, p.914 – 920;
- [132] Ostermeyer U, Schimdt T (2006), *Vitamin D and provitamin D in fish. Determination by HPLC with electrochemical detection*, Journal European Food Research and Technology 222, p.403 – 413;

- [133] Byrdwell WC (2011), *"Dilute-and-shot" triple parallel mass spectrometry method for analysis of vitamin D and triacylglycerols in dietary supplements*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 401, p.3317 – 3334;
- [134] Byrdwell WC, Exler J et al. (2011), *Liquid chromatography with ultraviolet and dual parallel mass spectrometric detection for analysis of vitamin D in retail fortified orange juice*, Journal of Food Composition and Analysis 24, p.299 – 306;
- [135] Phillips KM, Ruggio DM et al. (2011), *Vitamin D and Sterol Composition of 10 Types of Mushrooms from Retail Suppliers in the United States*, Journal of Agricultural and food chemistry 59, p.7841 – 7853.

ANEXOS

Anexo 1

Tabela 1- Métodos Analíticos utilizados para a determinação da vitamina D em várias matrizes

Referência Bibliográfica	Método Utilizado	Amostras utilizadas	Analito a analisar	Fase Móvel	Fase estacionária (coluna)	Fluxo	Método de Determinação
[125]	HPLC UV-DAD e LC-MS/MS	Ovos, carne de bovino, carne de aves, peixe	Vitamina D ₃ e 25OHD ₃	HPLC de fase normal semi-preparativa: Vitamina D ₃ : 2-propanol/hexano (0,5:99,5) 25OHD ₃ : 2-propanol/hexano (2,5:97,5)	HPLC semi-preparativa: Supelcosil LC-Si (150 mm x 4,6 mm, 5 µm); Spherisorb NH ₂ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	HPLC semi-preparativa: 1,0 mL/min	Padrão interno de vitamina D ₂ e 25OHD ₂
				HPLC analítica: Vitamina D ₃ : MeOH/água (98:2) 25OHD ₃ : MeOH/água/ácido acético (88:12:0,2)	HPLC analítica: Lichrospher RP-18 (250 mm x 3mm, 5 µm)	HPLC analítica: Vitamina D ₃ : 0,4 mL/min 25OHD ₃ : 0,42 mL/min	
[126]	HPLC UV-DAD	Carne de porco	Vitamina D ₃ e 25OHD ₃	HPLC semi-preparativa: n-heptano (A); 10% 2 – propanol em n-heptano (B), condições de gradiente: 80% A e 20% B (0 min), 40% A e 60% B (10 – 20 min) e 80% A	HPLC semi preparativa: sistema com duas colunas, uma de sílica (Luna, Si 60 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e a outra de amina	1 mL/min	Padrão interno de vitamina D ₂ para vitamina D ₃ ; Padrão externo para a 25OHD ₃

				e 20% B (20 – 35 min)	(Sphereclone, Amino, 5 µm, 150 x 4.6mm ID)		
				HPLC analítica: Vitamina D ₃ : metanol/acetonitrilo (20:80) 25OHD ₃ : Metanol/água (90:10)	HPLC analítica: combinação de colunas, ou duas VYDAC201TP54 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) ou duas LUNA C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) e (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)		
[127]	RP HPLC- UV	Amostras de seis espécies diferentes de animais (porco, aves, cavalos, seres humanos, bovinos e marta)	Vitamina D ₂ e D ₃ , 25OHD ₂ e 25OHD ₃	MeOH/EtOH (85:15)	HPLC analítica: Coluna C ₃₀ (250mm × 4,6mm, 5,0 µm) YMC Europe GmbH Coluna de Guarda: Coluna C ₃₀ (10 mm × 4,0 mm, 5,0 µm) da YMC Europe GmbH	1,0 mL/min	Padrões internos vitamina D ₂ e D ₃ e respetivos metabolitos
	HPLC-DAD e HPLC-ESI-	<i>Humulus</i> <i>lupulus L</i>	Vitamin D ₂ e provitamina	HPLC-DAD: metanol/água (98:2)	HPLC-DAD: coluna RP-C ₁₈ LiChrocort	HPLC-DAD: 0,4 mL/min	Curva de calibração

[128]	MS/MS		D ₂	HPLC-ESI-MS/MS: metanol/água (98:2)	(125 mm x 3,0 mm, 3 µm) e a coluna de guarda LiChrocort RP – C ₁₈ (4,0 mm x 4,0 mm, 5 µm)	HPLC-ESI- MS/MS: 0,4mL/min	
					HPLC-ESI-MS/MS: Coluna LiChrocort RP- C ₁₈ (125 mm x 3,0 mm, 3 µm)		
[129]	LC-ESI- MS/MS	Tomate, pimento, folhas de erva- moura	Vitamina D ₃ , 25OHD ₃ e 1,25(OH) ₂ D ₃	HPLC semi-preparativa: (A) 2-propanol/n- heptano (1:99), (B) 2- propanol /n-heptanol (20:80); 5% B por 5 min, aumento gradual até 100% B durante 20 min, seguido de 5%B por 9 min	HPLC semi- preparativa: LUNA, CN (150 mm x 4,6 mm, 3 µm) HPLC-ESI-MS/MS: Ascentis Express C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 2,7 µm)	HPLC semi- preparativa: 1 mL/ min	Derivação de Diels-Alder
				LC-ESI-MS/MS: (A) água/ácido fórmico/5mM metilamina (99,9:0,1); (B) MEOH ácido fórmico/5mM metilamina			

				(99,9:0,1); 70%B por 1 min, aumento gradual até 95% durante 7 min, aumente até 100%B por 2 min, e re-equilíbrio durante 4 min			
[130]	LC - EC	Leite e fórmulas infantis	Vitamina D ₃	2.5 mM ácido acético/ 2.5 mM acetato de sódio (v/v) em 92:8 (v/v) metanol:água	Coluna Waters Xterra RP ₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm)	1,5 mL/min	Curva de calibração com vitamina D ₃
[109]	HPLC-MS/MS	Rações animais, barritas de cereais, sumo, leite, gema de ovo, iogurtes	Vitamina D ₃	HPLC analítica Coluna 1: água/ácido fórmico (99,5:0,05) (A) e metanol/acetonitrilo (80:20) com 0,05% de ácido fórmico (B), condições de gradiente: 0–1 min Gradiente linear de 92 a 100% B; 1–9 min isocrático, 100% B; 9,9–15 min isocrático, 92% B Coluna 2: metanol/	HPLC analítica: Coluna 1 Ascentis Express octylsilyl C ₈ (150 × 3,0 mm, 2,7 µm) Coluna 2 Ascentis Express C ₁₈ (150 × 3,0 mm, 2,7 µm)	0,5 mL/min	Curva de calibração com padrão interno de vitamina D ₃ deuterada

				acetonitrilo (80:20) com 0,05% de ácido fórmico			
[131]	HPLC-MS/MS	Amostras de soro	25OHD ₂ e 25OHD ₃	100% metanol com 2 mmol/L de acetato de amónio e 0,1% de ácido fórmico	HPLC analítica: Waters XTerra (50 mm x 2,1 mm, 3,5 µm)	100 µL/min (0 a 4 min), 1 mL/min até 5,9 min voltando a 100 µL/min	Δ ⁹ -THC-D ₃
[132]	RP HPLC - EC	Peixes de água doce e água salgada	Vitamina D e provitamina D	HPLC semi-preparativa: n-hexano/ 2-propanol (99:1) HPLC analítica: Metanol contendo 8,4 mM de ácido perclorídrico e 57 mM de perclorato de sódio	HPLC semi-preparativa: LiChrosorb Si 60 (250 x 4 mm, 5 µm) HPLC analítico: Discovery C ₁₈ , (250 x 4,6 mm, 5 µm)	1 mL/ min	Vitamina D ₂ e provitamina D ₂
[133]	HPLC-UV	Óleos de várias origens (capsulas de gel)	Vitamina D ₃	Gradiente ternário de metanol, acetonitrilo e diclorometano	Duas colunas: Inertsil ODS-2 em série (250 x 4,6 mm, 5 µm)	1,3 mL/min e 0,9 mL/min	Vitamina D ₂ (padrão interno e externo)
[134]	HPLC-DAD/UV HPLC- MS	Sumo de laranja fortificado dos	Vitamina D ₃	HPLC semi-preparativa: metanol/ acetonitrilo (20:80)	HPLC semi-preparativa: Inertsil Sil 100a (250 x 4 mm, 5	HPLC analítica: 1 mL/min	Vitamina D ₂

EUA				HPLC analítica: acetonitrilo/ metanol (40:60)	HPLC analítica: Inertsil ODS-2 (250 x 4,6 mm, 5 µm)		
[135]	HPLC- DAD/UV	Cogumelos	Vitamina D ₂ (cartuchos)	HPLC semi-preparativa: hexano/diclorometano/ alcóois (85.15:0,2) os alcóois apresentavam a	HPLC semi- preparativa: 2 colunas, Zorbax SIL (250 x 9 mm, 5 µm), e Zorbax NH ₂ (250 x 0,45 mm, 5 µm)	Não refere	Vitamina D ₃ deuterada
				constituição de isopropanol/metanol (2:1) HPLC analítica: acetonitrilo/ diclorometano (65:35)	HPLC analítica: Vydac ODS 201TP54		

Anexo 2

Tabela 1 – Condições de saponificação [100]

g de Gordura	g de KOH	Concentração de KOH (g/mL)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
16	30	0,133	70	30
8	12	0,08	80	30
8	10	0,118	100	45
12	15	0,167	100	30
6	25	0,167	20	1200 (20 horas)
8	42	0,28	100	30
24	18	0,15	100	45
10	30	0,15	97	30

Tabela 2 – Condições de extração [100]

Solução de Solventes	Nº de Extrações	Lavagem	Nº de Lavagem
Éter de petróleo + éter dietílico (9+1)	2 x 100 mL	Água	5 x 100 mL
n-Heptano	3 x 100 mL e 3 x 50 mL	Água	4 x 100 mL
n-Heptano	1 x 100 mL	1ª – 5% KOH 2ª – 30% etanol numa solução 9% de cloreto de sódio 3ª – 0,9% cloreto de sódio	1 x 100 mL 1 x 100 mL 1 x 100 mL
Éter dietílico	2 x 100 mL	Água	4 x 50 mL
Éter de petróleo + éter dietílico (1+1)	2 x 200 mL	Água	6 x 50 mL
Éter de petróleo + éter dietílico (1+1)	2 x 500 mL	Água	5 x 150 mL
Éter dietílico	1 x 150 mL 3 x 75 mL	Água	5 x 200 mL
Éter de petróleo + éter dietílico (1+1)	3 x 100 mL	Água	100 mL até pH neutro

Anexo 3

Tabela 1 – Exemplo de uma folha de cálculo utilizada na determinação do teor da vitamina D

PARÂMETRO:	Vitamina D		
DATA:	04.07.2013	Executante:	DIP
AMOSTRA:	xxx	Nº/Data Entrada:	xxx/03.07.2013
Observações:		Pasta Nº:	

VITAMINA D₃

	D ₂	D ₃
λ (nm)	265	265
E ^{1%} _{1cm} (em etanol)	475	480
Absorvência A	0,385	0,570
Conc. do Padrão C_p (µg/ml) = (A x 10 ⁴ /E)	8,105	11,875
Áreas(médias) dos picos dos Padrões A_{p,Di}	1344941,4	2056833,7

DETERMINAÇÃO DO FATOR DE RESPOSTA

$$F_R = (A_{P,D3} \times C_{P,D2}) / (A_{P,D2} \times C_{P,D3}) = 1,043828905$$

	i = 1	i = 2	i = 3
AMOSTRA			
Massa M_i (g)	-----	50,014	51,1991
Volume V_i (ml)			
PADRÃO INTERNO			
Volume V_{PI,D2} (ml)		0,2	0,2
DILUIÇÃO		1	1
PADRÃO INTERNO			
Concentração C_{i,D2} (µg/ml)		8,105263158	8,105263158
ÁREA de PICO de D ₂ , A_{i,D2}		249252,8	408104,8
ÁREA do PICO de D ₃ , A_{i,D3}		117758,2	200964,7
CONCENTRAÇÃO DE VITAMINA D ₃ NA AMOSTRA C_{i,D3} = (A_{i,D3} × V_{PI,D2} × C_{i,D2} × 100) / (A_{i,D2} × F_R × M_i) ou V_i) µg / 100 g de amostra		1,466990563	1,493666175
REPETIBILIDADE (C.V. <= 5%)		OK	
r Repetibilidade		0,207245972	
Data do fim de análise 05.07.2013			
C_{D3, média} = (C_{2,D3} + C_{3,D3}) / 2 =	1,480 µg/100 g de amostra		

Anexo 4



LC Calibration Report

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencia/Vitamina D

Processing Method: 130502D3RC

Project Name: Referencia/Vitamina D

Processing Method ID: 5289

System: HPLC5

Calibration ID: 5291

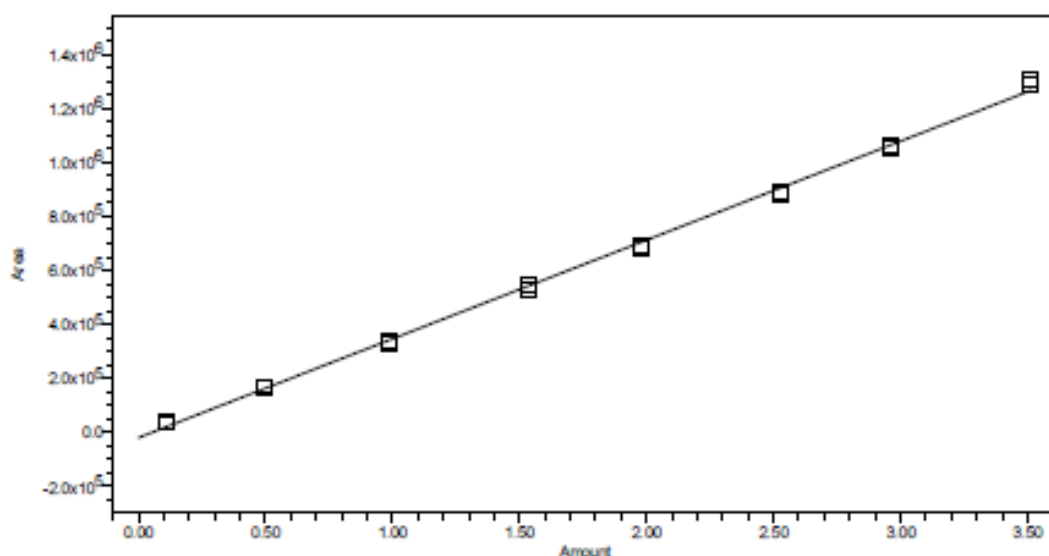
Channel: W2996 265.0nm-1.2

Date Calibrated: 5/2/2013 11:09:03 AM

Proc. Chnl. Descr.: W2996 PDA 265.0 nm at 1.2

Calibration Plot group for D2 contains no data.

Point Information ' Peak: D2' table contains no data.



Name: D3; RT: 21.597; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 5293; R: 0.999148; R²: 0.998297; Weighting: None; Equation: $Y = 3.66e+005 X - 1.98e+004$

Peak: D3

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	0.1_D2+D3	5299	D3		0.110	39299.001	0.161	-31.98	No	No
2	0.1_D2+D3	5302	D3		0.110	34229.110	0.148	-25.60	No	No
3	0.5_D2+D3	5305	D3		0.494	171158.674	0.521	-5.25	No	No
4	0.5_D2+D3	5308	D3		0.494	167099.962	0.510	-3.19	No	No
5	1_D2+D3	5311	D3		0.988	327931.233	0.950	4.06	No	No
6	1_D2+D3	5314	D3		0.988	338844.745	0.979	0.89	No	No
7	1.5_D2+D3	5315	D3		1.537	526228.056	1.491	3.09	No	No
8	1.5_D2+D3	5318	D3		1.537	546278.932	1.546	-0.56	No	No
9	2_D2+D3	5321	D3		1.976	693221.575	1.947	1.50	No	No
10	2_D2+D3	5324	D3		1.976	685541.072	1.926	2.60	No	No
11	2.5_D2+D3	5327	D3		2.525	883158.937	2.466	2.41	No	No
12	2.5_D2+D3	5330	D3		2.525	891949.477	2.490	1.43	No	No
13	3_D2+D3	5333	D3		2.964	1059910.413	2.948	0.54	No	No
14	3_D2+D3	5336	D3		2.964	1053350.940	2.930	1.16	No	No
15	3.5_D2+D3	5339	D3		3.513	1291982.985	3.582	-1.92	No	No
16	3.5_D2+D3	5342	D3		3.513	1305890.835	3.620	-2.95	No	No

Figura 1- Exemplo do relatório de calibração da reta efetuada resultante do programa

EMPOWER® utilizado

Anexo 5

Exemplo de folha de cálculo para a validação da reta de calibração

Conc.		Sinal (y_{ij} =Área do pico i ;ensaio j)									
i	x _i (mg/ml)	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	0,100	40438,00000	36192,00000	40931,00000	40084,00000	34010,00000	40726,00000	38088,00000	37833,00000	42503,00000	57092,00000
1	0,100	40629,00000	42802,00000	37201,00000	41155,00000	38000,00000	46947,00000	39278,00000	37235,00000	45804,00000	55883,00000
2	0,500	171158,67400									
2	0,500	167099,94600									
3	1,000	327931,23300									
3	1,000	338844,74500									
4	2,000	693221,57500									
4	2,000	685541,07200									
5	2,500	883158,93700									
5	2,500	891949,47700									
6	3,500	1185413,00000	1182592,00000	1187602,00000	1183039,00000	1184124,00000	1186222,00000	1178771,00000	1198705,00000	1200967,00000	1146810,00000
6	3,500	1180002,00000	1182247,00000	1179501,00000	1179244,00000	1183943,00000	1194666,00000	1184665,00000	1206791,00000	1190015,00000	1160963,00000

Figura 1 – Ilustração do separador de introdução dos dados da reta de calibração na folha de cálculo

Concentração (µg/ml)	Área do Pico
0,100	40438,000
0,100	40629,000
0,500	171158,674
0,500	167099,946
1,000	327931,233
1,000	338844,745
2,000	693221,575
2,000	685541,072
2,500	883158,937
2,500	891949,477
3,500	1185413,000
3,500	1180002,000
Coeficiente de correlação	
R = 0,999278002	
R>0,995 OK	

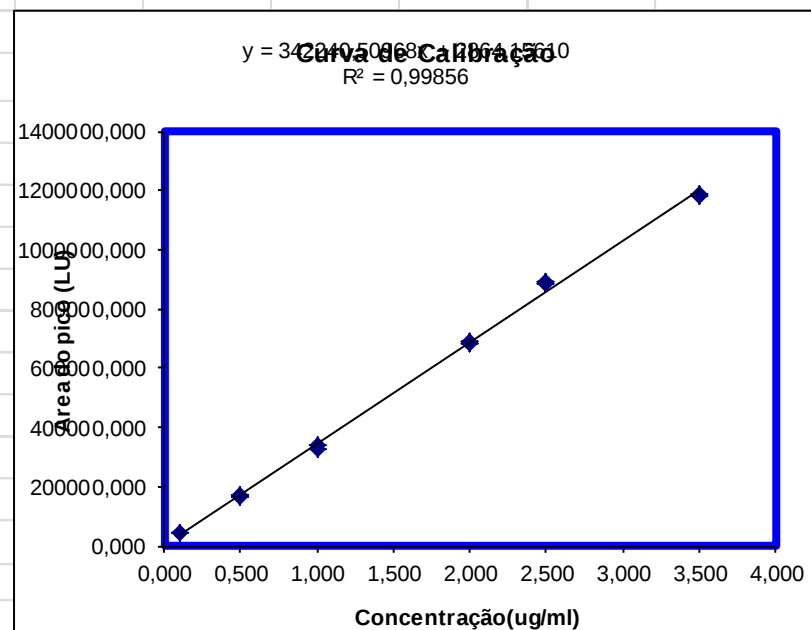


Figura 2 – Ilustração representativa do separador do coeficiente de correlação

		Sinal (y_{ij} =Área do pico i ;ensaio j)									
i	Conc.	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
	x_i (mg/ml)										
1	0,100	40533,50000	39497,00000	39066,00000	40619,50000	36005,00000	43836,50000	38683,00000	37534,00000	44153,50000	56487,50000
2	0,500	169129,31000									
3	1,000	333387,98900									
4	2,000	689381,32350									
5	2,500	887554,20700									
6	3,500	1182707,50000	1182419,50000	1183551,50000	1181141,50000	1184033,50000	1190444,00000	1181718,00000	1202748,00000	1195491,00000	1153886,50000
Média y_1 = 41641,55 Desvio Padrão y_1 = 5796,84 CV% y_1 = 13,92 Variância y_1 = 33603392 Média y_{10} = 1183814,10 Desvio Padrão y_{10} = 12689,81 CV% y_{10} = 1,07 Variância y_{10} = 161031375 $S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^N (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$ $\bar{y} = \frac{\sum_{j=1}^n y_{ij}}{n_i}$ $S_i^2 =$ Variância de y_i											
##	$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$	SE	$S_{10}^2 > S_1^2$	PG = 4,792116722							
##	$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}$	SE	$S_1^2 > S_{10}^2$	$F_{(n_{10}-1, n_1-1, 99,0 \%)} = 5,35$ PG<F OK PG>F .							

Figura 3 – Ilustração representativa do separador de homogeneidade das variâncias do primeiro e do último ponto da reta de calibração

	Diferença das variâncias		Valor do teste					
	$DS^2 = (N - 2).Sy_1^2 - (N - 3).Sy_2^2$		$PG = \frac{DS^2}{Sy_2^2}$					
$DS^2 =$	4,884122189E+08		$PG =$	1,865668258				
	F (1,N-3,99%) = 10,56143105							
	PG<F	OK	O ajuste polinomial não é significativamente melhor que o linear					
	PG>F	.	O ajuste polinomial é significativamente melhor que o linear					

Figura 4 – Ilustração representativa do separador para o teste de linearidade (Mandel)

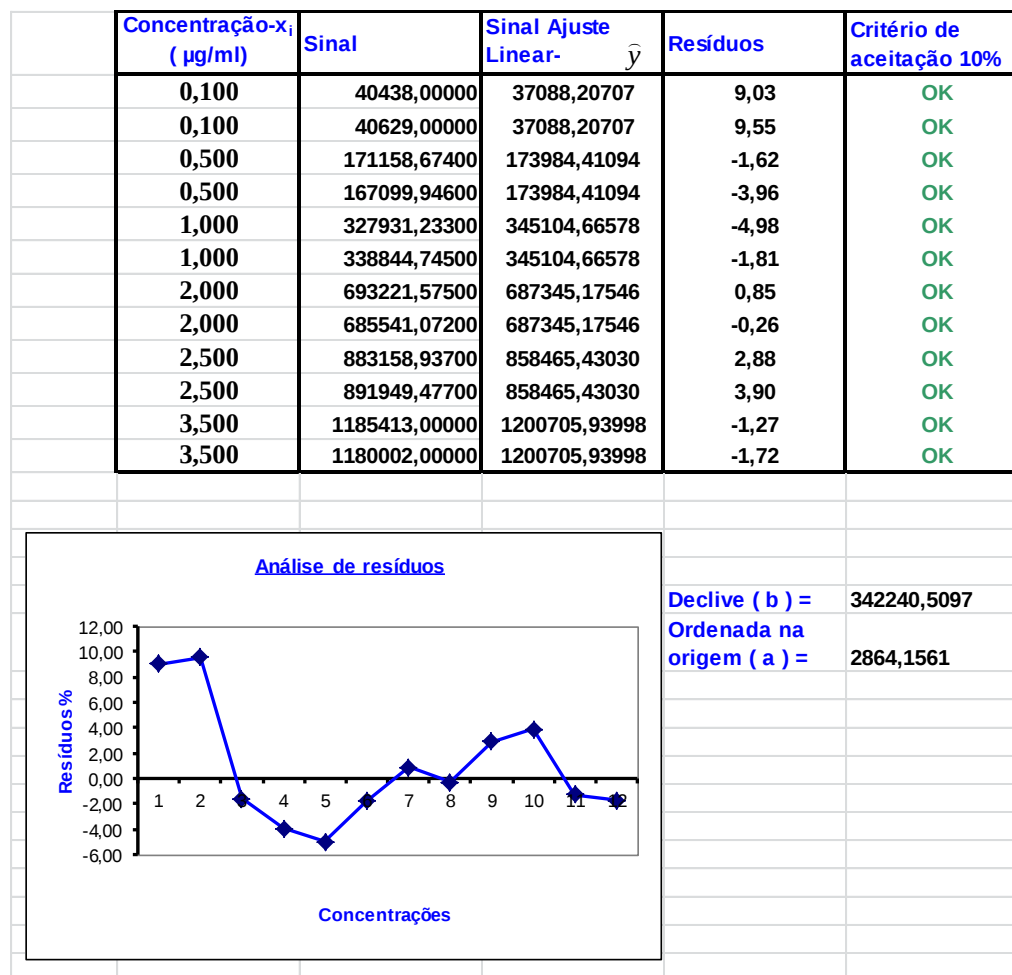


Figura 5 – Ilustração representativa do separador da análise de resíduos para os pontos da reta de calibração

Anexo 6

Tabela 1 – Exemplo de uma folha de cálculo para a determinação dos coeficientes de variação para a repetibilidade e para a precisão intermédia

AMOSTRA

XXXXX

DADOS / série	Dia 1	Dia 2	Dia 3
data de análise	18.04.2013	14.05.2013	3.6.2013
n			
1	5,888757093	6,11738114	6,867759
2	5,781307787	6,73296955	7,584484
	5,814181571		
	6,313243377		
CÁLCULOS			
$\bar{x}_i$ médio	5,949372457	6,42517535	7,226122
$\bar{X}$ médio	6,533556541		
s_i	0,246710747	0,43528674	0,506801
v_i	0,060866193	0,18947454	0,256848
u_i	3	1	1
v média (s_r^2)	0,125784134		
V média (s_L^2)	0,416332096		
V_{Pi} (s_{Pi}^2)	0,54211623		
S_r	0,35466059		
S_{Pi}	0,736285427		
CV_r (%)	5,428292965		
CV_{Pi} (%)	11,2692899		
r	0,993049652		
Pi	2,061599196		

Folhas de cálculo utilizadas na determinação da incerteza dos resultados

DADOS DE PRECISÃO

96	Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
----	--

Tabela 2 – Exemplo de uma folha de cálculo para a determinação da incerteza relativa associada à exatidão

DADOS DE EXATIDÃO					
			Material Referência Certificado	NIST 1849a	
			Analito	Vitamina D₃	
			Valor Certificado	11	µg/100 g
			Incerteza expandida (certificado)	1,7	µg/100 g
			Incerteza padrão (estimada)*	0,85	µg/100 g
			Data	Operador	µg/100 g
			14-10-2013	DIP	13,7070
			14-10-2013	DIP	12,0520
Média	C _{mi}	µg/100 g			12,8795
Desvio Padrão	s	µg/100 g			1,17028355
Coeficiente de variação	CV	%			9,08640345
Variância	V	µg ² /(100 g) ²			1,36956359
Z-score**					1,50005799
Incerteza padrão relativa da exactidão	u _r (Ex)				0,09996053
Incerteza padrão relativa da exactidão, não considerando a incerteza do MRC	u _r (Ex)_p				0,06425057

Tabela 3 – Exemplo de uma folha de cálculo utilizada na determinação da incerteza relativa combinada e da incerteza relativa expandida combinada

INCERTEZA EXPANDIDA				
Analito		vitamina D ₃		
		Unidades	Incerteza do MRC contabilizada	Incerteza do MRC não contabilizada
Incerteza padrão relativa combinada	$u(C)/C$		0,120910275	0,093286455
Incerteza padrão combinada	$u(C)$	$\mu\text{g}/100\text{ g}$		
Incerteza expandida relativa combinada*	$U(C)/C$		0,241820551	0,18657291
Incerteza expandida combinada*	$U(C)$	$\mu\text{g}/100\text{ g}$	0	0

Anexo 8

Cromatogramas representativos de cada matriz analisada

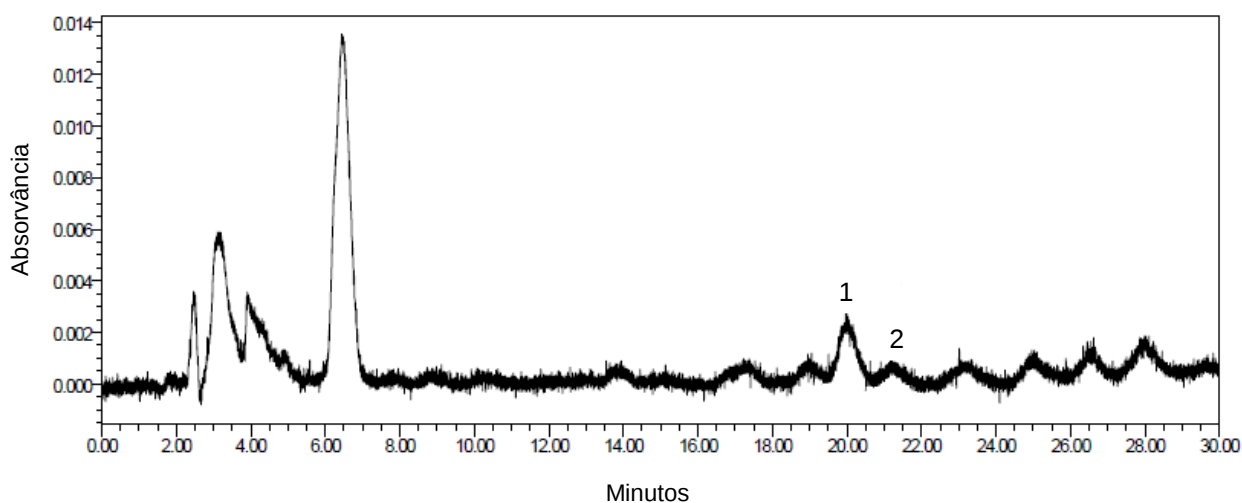


Figura 1 – Cromatograma da amostra de MRC utilizado, NIST1489a, 1 – Vitamina D₂ (TR: 19.992 minutos) e 2 – Vitamina D₃ (TR: 21.213 minutos)

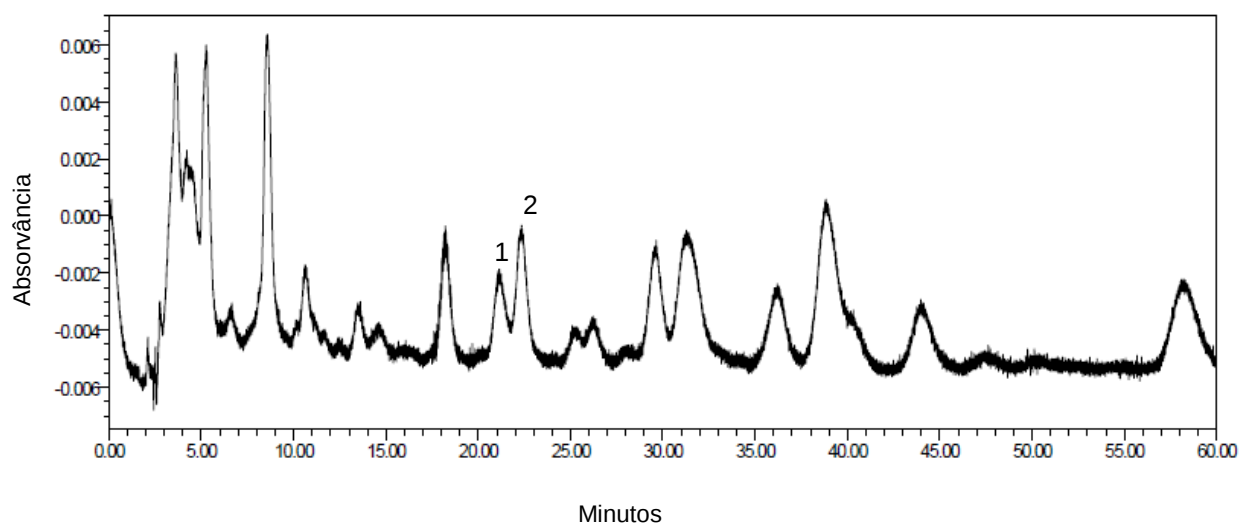


Figura 2 – Cromatograma da amostra de massa infantil, 1 – Vitamina D₂ (TR: 21.142 minutos) e 2 – Vitamina D₃ (TR: 22.340 minutos)

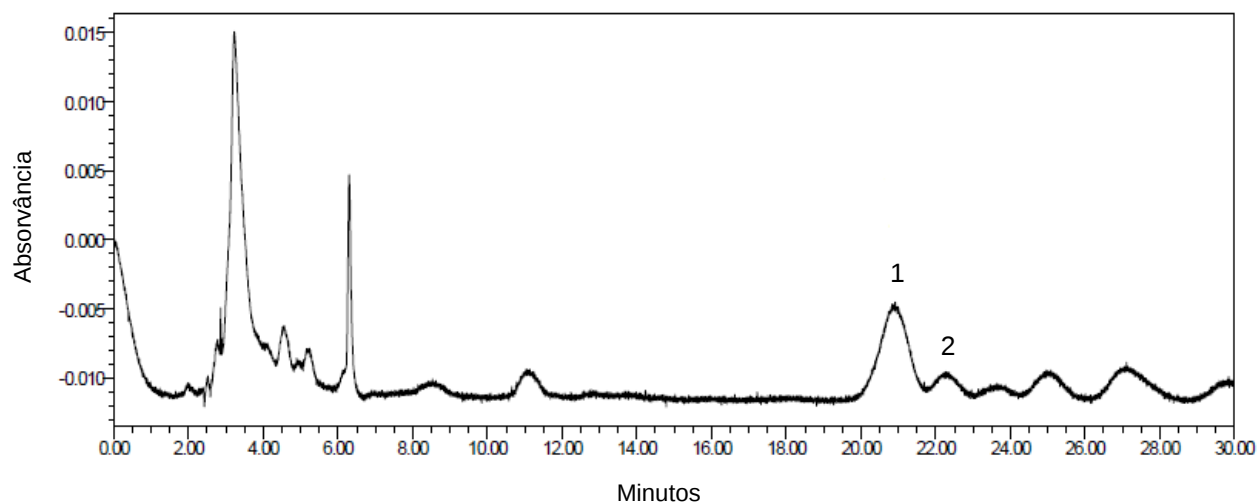


Figura 3 – Cromatograma da amostra de iogurte D, 1 – Vitamina D₂ (TR: 20.916 minutos) e 2 – Vitamina D₃ (TR: 22.284 minutos)

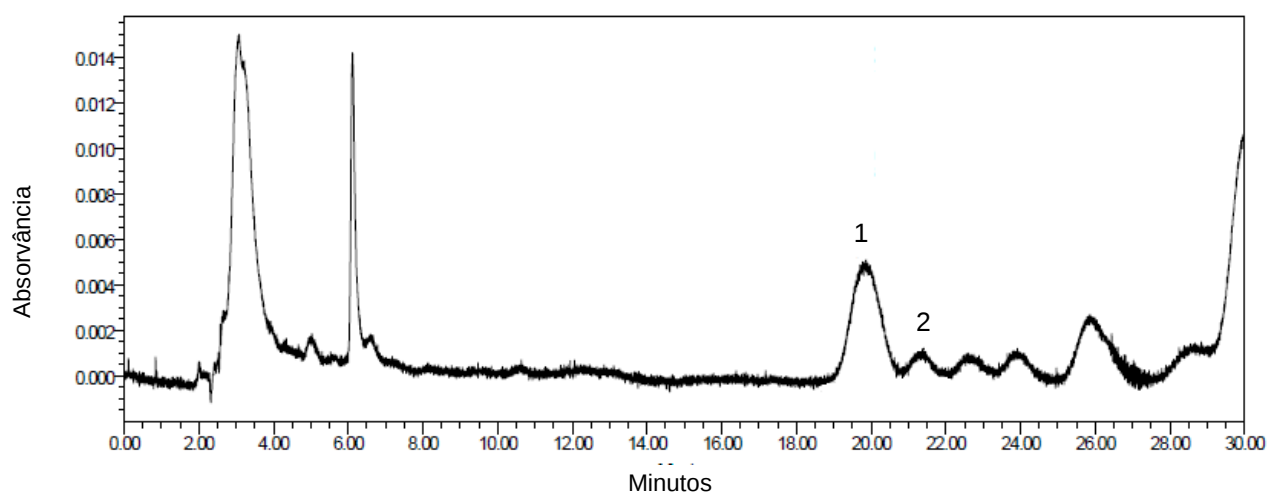


Figura 4 – Cromatograma da amostra de leite A, 1 – Vitamina D₂ (TR: 19.865 minutos) e 2 – Vitamina D₃ (TR: 21.397 minutos)

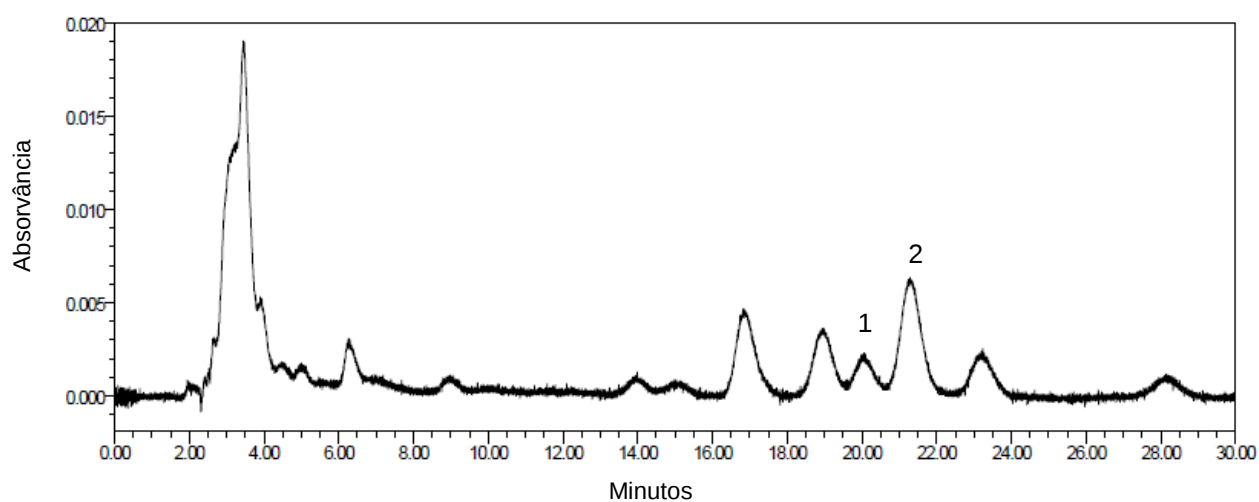


Figura 5 – Cromatograma da amostra de leite B, 1 – Vitamina D₂ (TR: 20.075 minutos) e 2 – Vitamina D₃ (TR: 21.287 minutos)

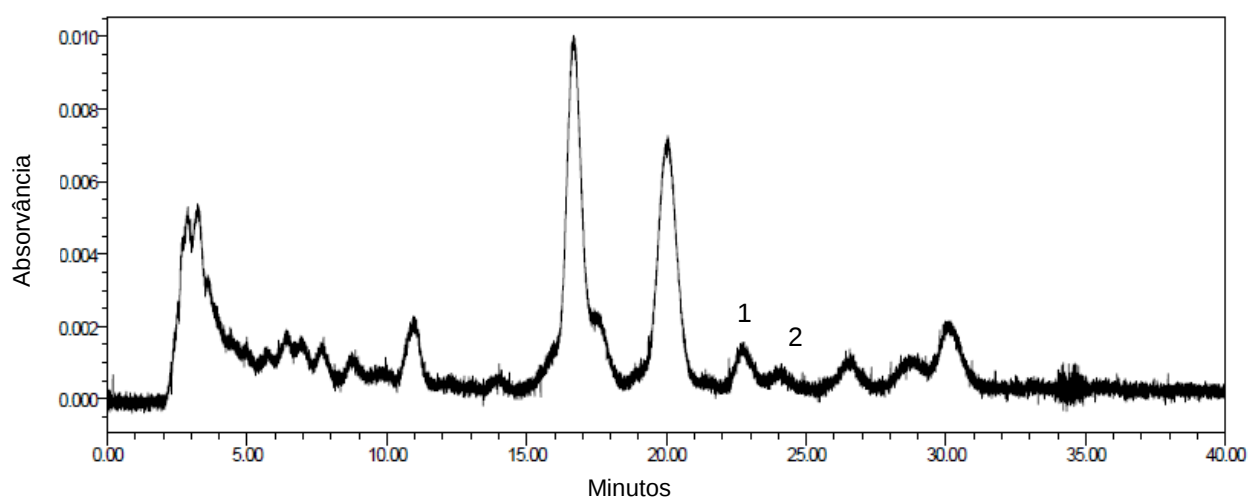


Figura 6 – Cromatograma da amostra de ovos gaiolas, 1 – Vitamina D₂ (TR: 22.781 minutos) e 2 – Vitamina D₃ (TR: 24.113 minutos)

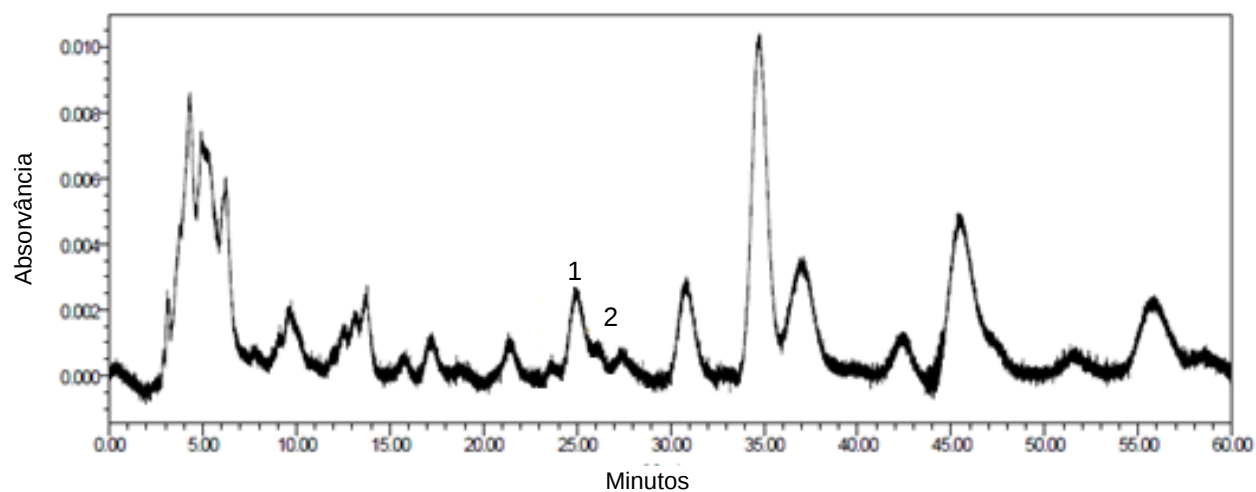


Figura 7 – Cromatograma da amostra de cereal A, 1 – Vitamina D₂ (TR: 24.853 minutos) e 2 – Vitamina D₃ (TR: 26.150 minutos)