

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**QUANTIFICAÇÃO DE VITAMINA A EM
CONCENTRADOS POLIVITAMINICOS POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Leandro Zanini Giacomini

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**QUANTIFICAÇÃO DE VITAMINA A EM
CONCENTRADOS POLIVITAMINICOS POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

por

Leandro Zanini Giacomini

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos A. Mallmann

Santa Maria , RS, Brasil

2006

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**QUANTIFICAÇÃO DE VITAMINA A EM CONCENTRADOS
POLIVITAMINICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA**

elaborada por
Leandro Zanini Giacomini

como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF. DR. CARLOS A. MALLMANN
(Presidente/Orientador)

PROF. DR. IRINEO ZANELLA (UFSM)

PROF. DR. PAULO A. LOVATTO (UFSM)

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2006.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa Carla, e aos meus filhos Tales e Letícia, pelo companheirismo, dedicação e ao apoio que sempre encontrei, mesmo nos momentos mais difíceis. A compreensão de minha família foi fundamental para a concretização deste novo projeto de vida,

Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos A. Mallmann, orientador deste trabalho, pela oportunidade, incentivo, orientação e confiança. Seus exemplos de dedicação ao trabalho proporcionaram valiosos ensinamentos, os quais foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste projeto, bem como para minha vida profissional.

A ADISSEO do Brasil, em especial aos amigos Marcio, Moro e Washington por terem oportunizado um intercâmbio científico com seu laboratório de controle de qualidade da indústria de produção de vitaminas em Commentry, França.

Aos meus colegas do LAMIC, Andressa, Fabiana, Ricardo, Paulo, Washington, Carlos, Silvia, Mauricio, Fernanda, Karine, Mariane, Adriano, Juliano, Lidiane, Leandro, Joviana, Simone e outros que já não fazem mais parte, que de uma forma ou outra tiveram sua parcela de contribuição para o desenvolvimento do projeto.

As agroindustrias Sadia, Doux Frangosul e Avipal, que gentilmente forneceram amostras de “premixes” para avaliação da eficiência da metodologia analítica empregada.

A CAPES e ao LAMIC, por terem proporcionado recursos financeiros e de infra-estrutura para realização desta pesquisa.

Aos meus pais, Luis Sergio e Lisete Giacomini, meus eternos incentivadores.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

QUANTIFICAÇÃO DE VITAMINA A EM CONCENTRADOS POLIVITAMINICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Autor: Leandro Zanini Giacomini
Orientador: Carlos Augusto Mallmann
Santa Maria, 24 de fevereiro de 2006.

Atualmente o interesse por vitaminas tem sido de grande importância na saúde humana e animal. Suas concentrações nos ingredientes são baixas, sendo necessário a adição nas dietas, através da utilização de complexos multivitamínicos, agregando custos à alimentação que por vezes são representativos. No presente estudo buscou-se a validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de vitamina A em concentrados multivitamínicos para a nutrição animal. A metodologia de análise de vitamina A foi a partir do método publicado na "United States Pharmacopeia", adaptado às condições do Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria. A fase móvel utilizada para a determinação da vitamina (All-trans-retinol) foi composta de metanol: água (98:2 v/v). O comprimento de onda ideal para a vitamina A no detector UV, foi de 325 nm. Utilizou-se coluna de fase reversa C18, vazão de 1 mL/min e temperatura da coluna de 40° C. O tempo de análise cromatográfica ocorreu em 8 minutos, sendo que a vitamina A eluiu em 4,2 minutos. O método mostrou-se linear, apresentando um coeficiente de correlação igual a $r = 0,9995$, nas concentrações de 0,475 – 9,50 µg/mL. O limite de quantificação encontrado para amostras nas quais o veículo para adição de vitaminas apresentavam partículas desuniformes (Aderex) foi de 0,24 µg/mL. A vitamina A foi extraída com o emprego de hexano, após processo de hidrólise e saponificação. O coeficiente de recuperação do método foi de 85,98%. Na análise de repetitividade do método em amostras de "premixes" obteve-se uma média de CV de 1,52%. De acordo com os resultados encontrados, observa-se que 4 (26,67 %) das amostras de "premixes" analisadas apresentaram valor abaixo do esperado. Entre as 15 amostras analisadas, 6 (40,0 %) dos "premixes" apresentaram valores de vitamina A acima da concentração desejada. Somente 5 amostras (33,33 %) apresentaram valores de vitamina A dentro dos parâmetros de mínimo e máximo preconizados para alimentação de aves e suínos. O método mostrou-se eficiente, rápido e preciso para análise de rotina, disponibilizando desta forma, uma importante ferramenta para controle de qualidade na alimentação animal.

Palavras-chave: CLAE, Premix, Vitamina A

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

QUANTIFICATION OF VITAMIN A IN POLYVITAMIN CONCENTRATED BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYSIS

Author: Leandro Zanini Giacomini

Adviser: Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, february 24th 2006.

Nowadays the importance and interest for vitamins in human and animal health increased. When vitamin concentration is low in the raw material and is necessary to add multivitamin complexes to the animal diet a representative cost is incorporated to animals' nutrition. The proposal of this study was evaluation and validation of a methodology by high performance liquid chromatography to quantify vitamin A in polyvitamin concentrates for animal nutrition. The method developed was adapted for the Micotoxicologic Analysis Laboratory conditions, placed at Universidade Federal de Santa Maria (RS), from a method published at "United States Pharmacopoeia". The vitamin A extraction from concentrates was done using hexane as extraction solvent after hydrolysis and saponification. The recovery found for this method was 85.98% with a mean of relative standard deviation (RSD) of 1,52% at the repetition test using premix samples. All analyses were performed using a HPLC system with UV detection at 325 nm, a reversed phase column at 1 mL/min flow rate and 40°C of temperature. The mobile phase used was methanol:water (98:2, v/v) at isocratic mode. The calibration curve was constructed using standard vitamin A (All-trans-retinol) at concentrations varying from 0.475 to 9.50 µg/mL. The correlation coefficient (r^2) was 0.9995, the detection limit 0.095 µg/mL and quantification limit of 0.24 µg/mL for Aderex (compound without vitamin A with non uniform particles) fortified samples. Observing the results obtained, in 15 premix samples analyzed, six samples (40 %) of them present values of vitamin A greater than the desired concentration. Four samples (26,67 %) had values bellow the expected and only five (33,33 %) presented values between the minimum and maximum preconized for birds and pig nutrition. In this way, this method was efficient, rapid and precise for routine analysis providing in this way, an important instrument for quality control in animal nutrition area.

Key-Words: HPLC, Premix, Vitamin A

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Isopreno – unidade estrutural dos compostos isoprenóides.	21
FIGURA 2 -	Curva de calibração da vitamina a empregando detector uv.	45
FIGURA 3 -	Distribuição estatística do coeficiente de recuperação (cr) de vitamina a em amostras com partículas desuniformes (aderex), analisadas em detector uv/ vis.	46
FIGURA 4 -	Distribuição estatística da repetitividade de vitamina a em amostras com partículas desuniformes (aderex), analisadas em detector uv/ vis.	47
FIGURA 5 -	Cromatograma de uma solução de 2,37 µg/ml de vitamina a, utilizada para realização da curva de calibração.	48
FIGURA 6 -	Cromatograma de uma solução com a concentração de 0,095 µg/ml utilizado para determinação do limite de detecção. expressa comparação do pico da concentração e a linha de base.	49
FIGURA 7 -	Cromatograma do branco de vitaminas, utilizado para a determinação do coeficiente de recuperação do método de vitamina a.	49
FIGURA 8 -	Cromatograma de uma solução de vitamina a, utilizada como controle para determinação do coeficiente de recuperação do método, na concentração de 2,37 µg/ml.	50
FIGURA 9 -	Cromatograma de uma amostra de aderex fortificada com solução de vitamina a na concentração de 2,37 µg/ml, utilizada para determinação do limite de coeficiente de recuperação.	51
FIGURA 10 -	Cromatograma de uma amostra de “premix” utilizado na alimentação de suínos na fase inicial.	51
FIGURA 11 -	Cromatograma de uma amostra de “premix” utilizado na alimentação de aves na fase de crescimento.	52
FIGURA 12 -	Cromatograma de uma amostra de “premix” utilizado na alimentação de suínos na fase de crescimento.	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Estabilidade geral das vitaminas	18
TABELA 2 -	Efeito das vitaminas no metabolismo animal.....	25
TABELA 3 -	Avaliação do nível de vitaminas entre diferentes “premixes”	27
TABELA 4 -	Áreas dos picos cromatográficos da curva de calibração da vitamina a, em detector de uv.....	45
TABELA 5 -	Coeficiente de recuperação da vitamina a em amostras com partículas desuniformes (aderex) analisadas com detector de uv/vis.	46
TABELA 6 -	Avaliação da repetitividade do método analítico para a determinação da vitamina a em concentrado vitamínico com partículas desuniformes (aderex), analisadas em detector de uv / vis	47
TABELA 7 -	Concentrações de vitamina a em “premixes” comerciais utilizados em rações de aves e suínos.	53

SUMÁRIO

FOLHA DE ROSTO	2
FOLHA DE APROVAÇÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
SUMÁRIO	10
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. HISTÓRICO DAS VITAMINAS	15
2.2. NATUREZA DAS VITAMINAS	16
2.3. PROPRIEDADES DAS VITAMINAS	17
2.4. DEFICIÊNCIA DE VITAMINAS	18
2.5. CLASSIFICAÇÃO DAS VITAMINAS	19
2.5.1. <i>Vitaminas hidrossolúveis</i>	19
2.5.2. <i>Vitaminas lipossolúveis</i>	20
2.6. VITAMINA A	20
2.6.1. <i>Ocorrência</i>	21
2.6.2. <i>Função</i>	21
2.6.3. <i>Absorção e transporte de vitamina A</i>	22
2.6.4. <i>Deficiência de Vitamina A</i>	22
2.6.5. <i>Suplementação vitamínica</i>	23
2.7. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS	27
2.7.1. <i>Cromatografia</i>	28
2.7.2. <i>Cromatografia gasosa (CG)</i>	28
2.7.3. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	29

2.8. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA.....	30
2.8.1. <i>Delineamento experimental</i>	31
2.8.2. <i>Linearidade</i>	31
2.8.3. <i>Seletividade</i>	31
2.8.4. <i>Limite de detecção (LD)</i>	32
2.8.5. <i>Limite de quantificação (LQ)</i>	32
2.8.6. <i>Coefficiente de recuperação</i>	32
2.8.7. <i>Precisão e exatidão</i>	32
2.9. IDENTIFICAÇÃO DA SITUAÇÃO E ALTERNATIVAS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. MATERIAL	35
3.1.1. <i>Amostras</i>	35
3.1.2. <i>Padrão utilizado</i>	35
3.1.3. <i>Reagentes e solventes</i>	35
3.1.4. <i>Vidraria e material de consumo</i>	36
3.1.5. <i>Aparelhos/instrumental</i>	36
3.2. MÉTODOS.....	38
3.2.1. <i>Cuidados ao manipular o analito</i>	38
3.2.2. <i>Preparação da solução padrão de all-trans-retinol</i>	38
3.2.3. <i>Extração e preparação das amostras</i>	39
3.2.4. <i>Preparação da solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH)</i>	39
3.2.5. <i>Condições cromatográficas</i>	39
3.2.5.1. Equipamento cromatográfico	39
3.2.5.2. Coluna 40	
3.2.5.3. Fase móvel.....	40
3.2.5.4. Comprimento de onda	40
3.2.5.5. Fluxo da fase móvel.....	40
3.2.5.6. Volume de injeção.....	40
3.2.5.7. Tempo de retenção	40
3.2.5.8. Cálculo para expressão dos resultados	40
3.2.6. <i>Validação da metodologia analítica</i>	41
3.2.6.1. Curva de calibração	41
3.2.6.2. Determinação do limite de detecção.....	41

3.2.6.3. Determinação do limite de quantificação	42
3.2.6.4. Determinação do coeficiente de recuperação	42
3.2.6.5. Determinação da repetitividade do método	42
3.2.7. <i>Determinação de vitamina A em amostras de “premix” utilizadas na fabricação de rações animais</i>	42
3.2.8. <i>Avaliação estatística</i>	43
4. RESULTADOS	44
4.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	44
4.1.1. <i>Curva de calibração</i>	44
4.1.2. <i>Limite de detecção do método analítico (LD)</i>	44
4.1.3. <i>Limite de quantificação do método analítico (LQ)</i>	44
4.1.4. <i>Coefficiente de recuperação de processo analítico de extração</i>	45
4.1.5. <i>Repetitividade do método analítico</i>	46
4.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	47
4.3. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MÉTODO	51
4.4. QUANTIFICAÇÃO DE VITAMINA A EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE “PREMIXES” UTILIZADOS EM RAÇÕES ANIMAIS	53
5. DISCUSSÃO	54
5.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	55
5.1.1. <i>Curva de calibração da vitamina A</i>	55
5.1.2. <i>Determinação dos limites de detecção (LD)</i>	55
5.1.3. <i>Determinação dos limites de quantificação</i>	56
5.1.4. <i>Determinação do coeficiente de recuperação</i>	56
5.1.5. <i>Repetitividade do método</i>	57
5.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA METODOLOGIA	58
5.2.1. <i>Quantificação de vitamina A em amostras comerciais de “premixes” utilizados em rações animais</i>	58
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	61

1. INTRODUÇÃO

A alta correlação entre a qualidade da dieta e o desenvolvimento animal, faz com que aumente a preocupação dos técnicos responsáveis pela nutrição animal. Por esta razão, os alimentos são formulados com valores nutricionais cada vez maiores, gerando gastos muitas vezes desnecessários. Além disso, a adição de micronutrientes, como as vitaminas, em rações industrializadas tem sido utilizada também como uma estratégia de “marketing”, onde os interesses comerciais prevalecem, em detrimento das reais necessidades nutricionais dos animais.

Vitaminas são substâncias indispensáveis para o metabolismo orgânico e na maioria das espécies não podem ser produzidas pelo organismo animal. Assim, elas são obtidas através dos alimentos, bebidas ou suplementos. As exceções são as vitaminas do complexo D, que são sintetizadas no organismo em escala limitada e as vitaminas B₁₂ e K, as quais são sintetizadas pela flora bacteriana intestinal (Cooper, 1996).

Nos últimos anos o interesse na avaliação da deficiência de suplementação vitamínica em aves e suínos aumentou significativamente. Sem as vitaminas, as reações metabólicas, no organismo animal, ficariam tão lentas que não seriam efetivas (Mavromichalis, 1999). Portanto, o controle das vitaminas na alimentação animal é de fundamental importância econômica.

A vitamina A participa na formação do sistema da visão, no crescimento, desenvolvimento dos ossos, manutenção do tecido epitelial e no sistema de imunidade animal. Pesquisas demonstram diminuição na taxa de crescimento de frangos de corte, quando alimentados com altos níveis de vitamina A (12.000 UI/kg de ração) em comparação com aves alimentadas com baixos níveis (1.500 UI/kg de ração).

O fornecimento de vitaminas para animais ocorre através das dietas alimentares, as quais são formuladas com macro e micronutrientes. É nos micronutrientes que encontramos as vitaminas. A adição de vitaminas às rações animais é realizada através dos complexos multivitamínicos, denominados de “premixes”. Um “premix” multivitamínico é uma mistura concentrada de produtos vitamínicos, homogeneizados a um adequado veículo para posterior adição em

suplementos, concentrados e rações completas, e adicionados em um índice de 1 – 5 kg/ton de alimento processado (Mc Naughton, 1990).

Quando compararam diferentes veículos utilizados em “premixes” vitamínicos, Zhuge & Klopfenstein (1986) observaram que a destruição da vitamina A foi grande quando utilizaram o sorgo como diluente e menor quando o diluente foi casca de arroz ou milho.

Além de sofrerem ação dos diluentes, as vitaminas apresentam como características negativas, a instabilidade em sua concentração quando exposta a luz, temperatura e oxidação. Por isso são necessários que rigorosos métodos de análises de vitaminas estejam disponíveis, pois somente assim níveis adequados podem ser adicionados na dieta animal.

Vários métodos têm sido utilizados para a detecção da vitamina A, entre eles, o método clássico de Carr-Price (AOAC, 1990), que é uma análise espectrofotométrica, utilizando o tricloreto de antimônio ($SbCl_3$), que apresenta alta toxicidade (Pesce & Kaplan, 1990) e análises fluorimétricas, que consistem em análises de fluorescência. Esses métodos fluorimétricos e espectrofotométricos clássicos, que são comumente usados, não discriminam compostos com moléculas conformacional e isomericamente diferentes que possuem atividades características da vitamina A (Rizzolo & Plesello, 1988).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) surgiu como uma técnica de separação, entretanto, com as vantagens que ela apresenta, atualmente, passou a ter grande importância como técnica analítica qualitativa e quantitativa. Possui inúmeras vantagens em relação aos outros métodos existentes: rapidez, precisão, reprodutibilidade, simplicidade, sensibilidade, menor exposição a agentes externos e separação eficiente (Collins, 1995). O método por CLAE, com detecção por UV (Ultravioleta) é a técnica de detecção mais utilizada na análise da vitamina A ou, simultaneamente, com outras vitaminas.

O objetivo deste trabalho foi implantar e validar uma metodologia para análise de vitamina A em polivitamínicos destinados a alimentação animal. Esta metodologia envolve a preparação, extração e quantificação de vitamina A em “premix” multivitamínico para nutrição animal, utilizando CLAE como método de análise e controle de qualidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico das vitaminas

Desde a antiguidade era conhecido que os componentes fundamentais da dieta eram as proteínas, os carboidratos, os lipídios, sais minerais e a água (Balla, 1998). As análises químicas dos alimentos demonstraram que as substâncias mencionadas em conjunto, constituíam praticamente 100% de toda matéria alimentar. Pensou-se então que a reconstituição dos alimentos naturais com mesclas compostas por proteínas, glicídios, lipídios e minerais em quantidade e qualidade equivalentes as dos alimentos, deveriam obter-se iguais resultados do ponto de vista nutritivo. Sem exceção os animais alimentados com essas dietas sintéticas apresentavam uma serie de transtornos que os levavam a morte.

De acordo com Leeson & Summer (2001), o que agora nós reconhecemos como sinais de deficiência de vitaminas, já havia sido documentado há muitos anos. Desde séculos passados já existia a relação entre a dieta e a ocorrência de enfermidades. Sabia-se que o fígado de animais era um alimento capaz de curar a cegueira noturna. No início do século XVII descobriu-se que o suco de limão evitava os sintomas do escorbuto (deficiência de vitamina C) em marinheiros britânicos. Logo após, óleo de bacalhau foi utilizado para curar o raquitismo. Estas experiências indicavam que, além dos compostos conhecidos, os alimentos naturais deviam apresentar outros fatores essenciais. A estes compostos desconhecidos deram o nome de fatores nutritivos acessórios.

Em 1897, Eijkman relatou sobre o fator alimentar essencial do arroz, o qual previne a beribéri. Mas, foi somente em 1911 que Casimir Funk descobriu um desses fatores. O pesquisador obteve um concentrado contendo uma amina, que é considerada como qualquer membro do grupo de compostos formados pela substituição de um ou mais hidrogênios da amônia por um ou mais radicais livres de hidrocarboneto monovalente ou de outros radicais orgânicos, não ácidos, provenientes das cascas e das pelúcias do polimento de arroz. O pesquisador acreditava que todas aquelas substâncias eram aminas, e deu o nome de amina vital ou vitamina (Mc Naughton, 1990). Segundo Adams (1982), o termo vitamina é aceito para compostos orgânicos os quais: a) são componentes naturais de alimentos, mas diferentes de carboidratos, proteína, gordura e água; b) estão

presentes nos alimentos em diminutas quantidades; c) são essenciais para o crescimento, manutenção, saúde e bem estar animal; d) quando excluídos nas dietas ou pobremente absorvidos ou utilizados, resultam em doenças carenciais; e) não podem ser sintetizadas pelos animais e podem ser obtidas através das dietas.

A partir dessas descobertas, finalmente conseguiu-se isolar oligosubstâncias (substâncias necessárias em quantidades mínimas) que eram indispensáveis na nutrição de ratos e de outros animais de laboratório. Mas o progresso significativo só ocorreu em meados da década de 1930, quando algumas das vitaminas foram isoladas pela primeira vez e suas estruturas moleculares estabelecidas.

As vitaminas são consideradas como substâncias necessárias para o metabolismo no organismo, mas que não podem ser produzidas pelo mesmo. Assim elas são obtidas através de alimentos, bebidas ou suplementos (Cooper, 1996; Albers et al., 2002). Sua ausência sistemática na dieta resulta, quase sempre, em crescimento e desenvolvimento deficientes e outras perturbações orgânicas, configurando um quadro sintomatológico característico de carência (Paixão & Stamford, 2004). A deficiência ou ausência completa de uma ou mais vitaminas pode conduzir para múltipla disfunção do metabolismo resultando em diminuição do desempenho, retardo no crescimento, problemas reprodutivos ou aumento de incidência de enfermidades (Albers, et al., 2002).

Tanto para o homem como para os animais de experimentação (ratos e cobaias), a determinação das quantidades precisas de vitaminas exógenas é complexa, pois uma parte ou a totalidade das suas necessidades podem ser atendidas pela presença de microorganismos intestinais capazes de sintetizar algumas das vitaminas (Lehninger, 1993).

2.2. Natureza das vitaminas

Por um curto período as vitaminas que ocorrem naturalmente nos cereais, utilizados como ingredientes das rações, podem suplementar em razoável proporção a necessidade diária dos animais, porém esta contribuição é considerada insignificante durante a formulação (Adams, 1982). Esta situação se deve a variabilidade dos ingredientes, especialmente em cereais e proteínas vegetais, para ambos e níveis digestíveis das vitaminas. Por exemplo, a vitamina E do milho pode

variar de 10 a 40 UI/kg (Bartov, 1997). Diferentes origens das safras, tipos de óleo, fertilizantes usados, variedades do cereal, diferentes estágios de maturidade dos cereais, secagem e condições de armazenagem podem interferir na concentração das vitaminas nos cereais (Adams, 1992).

Comumente insetos e fungos infestam lavouras, resultando em menor disponibilidade de vitaminas lipossolúveis no milho e outros cereais, porque estes microorganismos invadem a porção germinativa do grão, onde se localiza a maior concentração de gordura (Chan, 1984). Durante a produção de ração, algumas vitaminas são instáveis durante o processo de aquecimento da mesma (especialmente A, D₃, E, K, C e tiamina) resultando desta forma, no declínio do nível de biodisponibilidade de todas as vitaminas através do tempo de armazenagem dos grãos e rações (Cooperman, 1984).

A biotina natural tem uma frequência de utilização de 60% em alimentos de frangos de corte, devido a sua baixa biodisponibilidade em matérias-primas utilizadas no preparo de rações. Isto pode ser observado no trigo, onde somente menos de 10% é aproveitada (Bain, 1988).

Os fatores acima mencionados levam a incerteza na suplementação animal, por esta razão, a participação das vitaminas naturais raramente são consideradas na nutrição animal. Desta forma a suplementação vitamínica é realizada através da adição de vitaminas sintéticas, na forma de complexos multivitamínicos usualmente denominamos de “premix” (Chan, 1984).

2.3. Propriedades das vitaminas

De acordo com suas propriedades as vitaminas caracterizam-se como compostos orgânicos, de estrutura química variada, relativamente simples. Encontram-se nos alimentos naturais em concentrações muito pequenas, porém essenciais para manter a saúde e crescimento normal do organismo. Quando não são fornecidas nas dietas ou não absorvidas no intestino, desenvolve-se no indivíduo um estado de carência que se traduz por um quadro de patologia específico (Balla, 1998).

As vitaminas podem ser desativadas por trocas físicas e químicas, dentro de “premix”, na mistura da ração ou no organismo animal. Quando ocorrem

degradações químicas, tais efeitos podem ser determinados por provas químicas ou microbiológicas (Leeson & Summers, 2001).

Para os nutricionistas há um conceito geral de que as vitaminas são sensíveis a oxidação, redução e a determinados fatores como temperatura, luz ultravioleta e pH. Na tabela 1 podemos observar as características de estabilidade das vitaminas.

TABELA 1 - Estabilidade geral das vitaminas

Vitamina	Característica de estabilidade
A	Oxidação, especialmente com Fe^+ e Cu^+
D ₃	Moderada estabilidade para oxidação
E	Estável em acetato. Com álcool muito instável
K	Muito instável
Tiamina	Sensível a oxidação e pH
Piridoxina e Riboflavina	Moderadamente estável
Ac. Pantoténico	Suscetível a hidrólise
Niacina	Razoavelmente estável
B ₁₂	Altamente estável
Biotina	Razoavelmente estável
Ácido fólico	Estável, suscetível a oxidação/redução
Vitamina C	Muito instável na forma natural

Fonte: Leeson e Stamford, 2001.

2.4. Deficiência de vitaminas

Quando a disponibilidade das vitaminas está abaixo dos níveis de requerimentos nutricionais dos animais, por um longo tempo, sinais clássicos de deficiência podem ser observados (Mc Dowell, 1989). Em geral, o começo dos sinais de deficiências é mais rápido em animais jovens, e o desenvolvimento embrionário é talvez o mais sensível.

Sinais clínicos de deficiência de vitaminas do complexo B nas aves aparecem, algumas vezes entre 5 – 7 dias, porque há pouco armazenamento desta no organismo (Bain, 1988). Deficiência de vitaminas lipossolúveis apresentam sinais clinicamente diagnosticáveis após um período prolongado de carência. Isso ocorre, porque são armazenadas nas gorduras depositadas e especialmente no fígado das aves adultas. Como regra, para induzir uma clássica deficiência de vitamina A em aves de postura, por exemplo, pode ser necessário alimentá-las com dieta deficiente durante 6 – 8 semanas (Lesson & Summer, 2001).

Em suínos jovens, a suplementação de vitamina E durante a lactação e vitamina C após o desmame dos leitões, demonstrou ser uma importante estratégia para melhorar a resposta imunológica dos animais (Lauridsen & Jensen, 2005).

2.5. Classificação das vitaminas

A classificação das vitaminas é realizada de acordo com sua solubilidade em dois grandes grupos: hidrossolúveis e lipossolúveis. O que determina em certo grau a sua solubilidade, presença em alimentos, distribuição nos fluidos orgânicos e sua capacidade de armazenamento nos tecidos (Krause & Mahan, 1998). Pesquisadores como Paixão & Stamford (2004), classificaram as vitaminas em lipossolúveis e hidrossolúveis, de acordo com as propriedades fisiológicas e físico-químicas comuns. Os textos modernos de bioquímica sugerem uma subclassificação para as vitaminas hidrossolúveis, baseada em suas funções bioquímicas de captadoras e libertadoras de energia e ação na hematopoese.

2.5.1. Vitaminas hidrossolúveis

A maioria das vitaminas hidrossolúveis são componentes do sistema de enzimas essenciais. São envolvidas em reações de manutenção do metabolismo energético e armazenadas no organismo em grandes quantidades. São excretadas em pequenas quantidades na urina. Um suprimento diário é indispensável com o intuito de se evitar a depleção e interrupção das funções fisiológicas normais (Biomania *on line*, 2004).

As vitaminas hidrossolúveis são compostas pelo grupo B que se dividem em: tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), cianocobalamina (B12),

biotina, ácido fólico, niacina e ácido pantotênico (Albers et al. 2002). Além dessas temos a vitamina C e a Colina que atuam como coenzimas e são muito importantes para reações metabólicas. Cada coenzima é especializada em uma reação metabólica específica. Uma suplementação insuficiente de vitamina B reduzirá a atividade da enzima correspondente induzindo alterações do metabolismo.

2.5.2. Vitaminas lipossolúveis

As vitaminas lipossolúveis A, D, E e K são absorvidas com outros lipídios, na presença do suco biliar e suco pancreático. São transportadas para o fígado através da linfa como uma parte de lipoproteína e estocadas em vários tecidos corpóreos. Tem funções fisiológicas distintas e são principalmente excretadas na urina (Biomania *on line*, 2004). As vitaminas lipossolúveis, notadamente A, D e E, são minuciosamente controladas por ocasião do desenvolvimento de produtos enriquecidos e vitaminados, com o intuito de assegurar ao público infantil o suprimento destes micronutrientes a diversas funções biológicas incluindo o desenvolvimento e crescimento (Paixão & Stamford, 2004).

2.6. Vitamina A

A vitamina A foi descoberta em 1913, por Mc Collum e Davis, quando eles notaram que ratos alimentados com gordura suína, como fonte de gordura, desenvolviam uma deficiência nutricional que podia ser corrigida pela adição de um fator presente na gema do ovo e no óleo de fígado de bacalhau. No mesmo ano Osborne e Mendel também relataram que algumas manteigas desempenhavam funções essenciais para a manutenção da vida em ratos (Mc Dowell, 1989; Mahan & Escott-Stump, 1998). A vitamina A teve sua estrutura determinada por Karrer e colaboradores em 1931. Posteriormente, foi sintetizado pelo processo de Isler, o qual utiliza como matéria-prima a β -ionona (Korolkovas & Burckalter, 1988).

A vitamina A é uma substância isoprenóide, composta por uma unidade chamada isopreno (Figura 1) formada por hidrocarbonetos de 5 átomos de carbono, fundamental em muitas substâncias de origem vegetal, possuindo aspecto oleoso, de alta viscosidade (Lehninger, 1993).

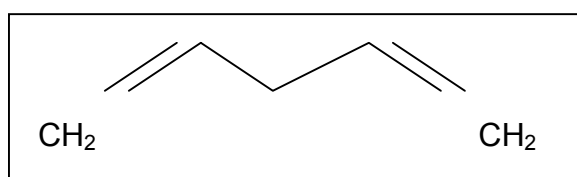


FIGURA 1 - Isopreno – Unidade estrutural dos compostos isoprenóides.

Três compostos, vitamina A álcool (retinol), vitamina A aldeído (retinal), vitamina A ácido (ácido retinóico) e alguns outros ésteres isômeros, possuem atividade de vitamina A para frangos e outros animais (Leeson & Summer, 2001).

O termo vitamina A foi utilizado para nomear compostos químicos específicos, como o retinol ou seus ésteres. Atualmente, ele é mais empregado como termo descritivo genérico, para referir-se a compostos que exibam as propriedades biológicas do retinol. O termo retinóide refere-se a entidade química retinol ou a outros derivados naturais (Goodman & Gilman, 1996).

2.6.1. Ocorrência

A vitamina A (retinol) é encontrada somente em alimentos de origem animal como óleos de peixes, fígado, leite, queijo, manteiga, ovos e farinha de peixes. Vários vegetais, legumes, frutas e também os azeites de dendê e de buriti, possuem substâncias precursoras como o β -caroteno, que se convertem em vitamina A após absorção no organismo. Os carotenóides são transformados em vitamina A no intestino delgado e no fígado dos mamíferos (Krolkovas, 1999; Albers, et al. 2002).

2.6.2. Função

A vitamina A apresenta importantes funções fisiológicas, como: formação, proteção e regeneração da pele e mucosas (proteção epitelial); interfere na fertilidade pela influencia que exerce na ovulação e implantação do óvulo, embrião e desenvolvimento fetal; controle do crescimento e processos de diferenciação do metabolismo celular para influenciar a transcrição de mais de 300 genes (expressão genética) e aumento da resistência contra doenças infecciosas (Albers, et al. 2002). Esta vitamina é importante para a visão, no crescimento, desenvolvimento do esqueleto ósseo, manutenção do tecido epitelial como: pele,

pelo, unhas, mucosas respiratórias e nos processos imunitários para prevenir as infecções (Balla, 2004).

2.6.3. Absorção e transporte de vitamina A

A vitamina A e β -caroteno transformam-se em forma de micélio disperso antes da absorção no intestino. Estes micélios são compostos por misturas de sais biliares, monoglicerídeos e longas cadeias de ácidos graxos, juntamente com vitaminas D, E e K, as quais facilitam a transferência de vitamina A e de β -caroteno para as células intestinais. Neste local, a maior parte do β -caroteno é transformado em vitamina A, que por sua vez, é convertido em vários ésteres, dependendo principalmente, do tipo de ácido graxo absorvido com a vitamina A. Todavia, o ácido palmítico é o ácido graxo de eleição para a estereificação. No plasma, a vitamina A pode ser transportada como álcool livre e na forma de esterificado. Os ésteres são transportados para o fígado através dos quilomicrons, os quais são derivados dos lipídios absorvidos. Fisiologicamente a vitamina A ativa é mobilizada do fígado como retinol, ligado a uma proteína específica de transporte denominada de proteína de ligação do retinol (PLR). Acredita-se que a liberação da vitamina A aos tecidos seja controlada pelos processos que regulam a produção e secreção da PLR pelo fígado. A PLR contém uma cadeia simples de polipeptídeo com um peso molecular de 21.000, que forma um complexo molar com retinol de 1:1. É estimado que 90% da proteína de ligação do retinol plasmático forma um complexo com a tiroxina ligado com a pré-albumina. A PLR e o complexo pré-albumina são transportados para o tecido alvo onde são ligados aos receptores de superfícies das células e o retinol é transportado para dentro das células alvo dos tecidos. O retinol celular ligando proteínas tem sido também identificado, o qual pode ser envolvido no transporte de retinol dentro da célula e eventualmente com ação biológica (Bonjour, 1984; Cham, 1984; McDowell, 1989).

2.6.4. Deficiência de Vitamina A

A deficiência de vitamina, em geral, pode ser classificada como deficiência primária, quando ocorre devido a ingestão inadequada ou, ainda, em deficiência secundária, devido a mal absorção. Interação entre drogas e nutrientes

ou necessidades aumentadas de vitaminas em consequência de estresse fisiológico ou de doenças (McDowell, 1989).

A carência de vitamina A foi primeiramente reconhecida em ratos, entretanto, todos os mamíferos, inclusive o homem são susceptíveis, variando apenas os sinais clínicos (Krause & Mahan, 1998). Os animais jovens são mais sensíveis que os adultos, pois o fígado tem a capacidade de armazenar quantidade suficiente de vitamina para suprir as necessidades nutricionais por um longo período de tempo, sendo que os animais recém-nascidos não apresentam depósito de vitamina A (Lehninger, 1992). Com a carência, os animais jovens podem apresentar comprometimento do crescimento, com alteração no desenvolvimento dos ossos e do sistema nervoso; alterações cutâneas; xeroftalmia (associado com atrofia de glândula periocular, hiperkeratose de conjuntiva e envolvimento da córnea, levando ao amolecimento ou ceratomalácia e cegueira). Em adultos, um sinal bem característico da deficiência é a cegueira noturna, a qual consiste na dificuldade de adaptação da visão a luz fraca ou ao crepúsculo (Lehninger, 1993; Krause & Mahan, 1998).

Com a deficiência progressiva, as aves diminuem seu desenvolvimento, ficam debilitadas e as penas apresentam-se com aspecto arrepiado. Durante este tempo, uma marcada queda de produção de ovos é percebida, a taxa de incubação dos ovos é diminuída e ocorre um aumento na taxa de mortalidade embrionária dos ovos incubados. Tal queda de postura é atribuída a atresia folicular ovariano, sendo que em alguns casos apresentam sinais de hemorragia (Leeson & Summer, 2001).

2.6.5. Suplementação vitamínica

A suplementação vitamínica ideal é baseada nas necessidades dos animais. Em geral os nutricionistas distinguem entre a necessidade mínima, necessidade ideal e necessidade específica adicional. A influência das vitaminas em atividades metabólicas específicas é difícil de estimar, pois, muitas vezes não é precisamente definida e algumas vezes nem todos conhecem (Albers et al., 2002).

Segundo Mc Naughton (1990), as vitaminas abrangem 33% do número total dos ingredientes, 2,0% dos custos e 0,08% do peso das rações das aves. Contudo, as vitaminas são necessárias para todas as funções metabólicas e por

isso, devem ser consideradas entre os mais importantes nutrientes das aves. O mesmo autor também conclui que as vitaminas de ingredientes naturais podem variar entre tipos de rações, por isso a importância da suplementação vitamínica, pois as vitaminas de ingredientes naturais tem uma baixa biodisponibilidade e são facilmente biodegradadas.

O efeito da falta de suplementação de riboflavina (vitamina B₂) foi a redução do peso do peito em frangos de corte dos 42 aos 56 dias de idade, embora não houvesse efeito na redução da eficiência alimentar (Patel et al. 1997).

Quando Latshaw (2002), estudou o efeito das vitaminas lipossolúveis no sistema imune das aves, observou que a deficiência de vitamina A em frangos de corte, proporcionou uma diminuição da resposta celular imune. A vitamina A foi capaz de fornecer um efeito protetor à toxicidade do alcalóide pirrolisidina a 5% na dieta, em frangos de corte intoxicados experimentalmente (Huan, 1992).

Frangos abatidos aos 42 dias de idade, que receberam suplementação vitamínica combinada com 15.000 UI de vitamina A /kg de ração, mais 250 mg de vitamina E /kg de ração, apresentaram maior concentração de ferro, zinco, cobre e cromo no soro sanguíneo e fígado, em relação ao grupo controle, quando submetidos a um estresse calórico com temperatura superior a 32°C (Sahin, et al. 2002).

Uma significativa redução no crescimento e consumo foi observado em suínos de terminação, com a retirada total da suplementação vitamínica durante a fase de crescimento (Purlock et al. (1998). Edmonds & Arentson (2000), quando avaliaram 252 suínos até 12 semanas pós-desmame, sem a suplementação vitamínica, observaram que houve redução na concentração de cobre e 50% do índice de vitamina E nos músculos do pernil, quando comparados com suínos submetidos a uma dieta controle.

Resultados de recentes pesquisas apresentaram que isoladamente de suas principais funções, as vitaminas produzem efeito metabólico adicional com uma possível influencia na saúde e fertilidade dos animais e ainda na qualidade dos produtos de origem animal, os quais podem ser observados na tabela 2.

TABELA 2 - Efeito das vitaminas no metabolismo animal.

VITAMINA	EFEITO PRINCIPAL	EFEITO ADICIONAL
A	Proteção do epitélio	Fertilidade, metabolismo celular e imunidade
β -Caroteno	Precursor da vitamina A	Saúde e fertilidade
D	Metabolismo de Ca e P	Imunidade
E	Antioxidante	Saúde, imunidade, qualidade da carne, ovos e leite
K	Coagulação sanguínea	Carboxilação protéica
B ₁	Metabolismo de carboidratos	Transmissão de estímulos nervosos
B ₂	Metabolismo energético	-----
B ₆	Metabolismo protéico	Imunidade
B ₁₂	Produção sanguínea e metabolismo protéico	-----
Biotina	Metabolismo de carboidratos e lipídios	Qualidade da pele, pêlo e chifres
Ácido Fólico	Carboidratos e metab. de ac. nucléico	Fertilidade
Niacina	Metabolismo energético	Atividade metabólica
Ac. Pantotênico	Metabolismo energético	-----
C	Antioxidante	Redução do estresse, saúde e imunidade
Colina	Metabolismo lipídico	Transmissão de estímulos do sistema nervoso

Fonte: Vitaminas na nutrição animal – Albers, et al. 2002.

As concentrações vitamínicas na maioria das rações são pequenas, sendo de difícil quantificação. Conseqüentemente para que a distribuição das vitaminas seja uniforme durante a mistura, preparo e armazenagem, as vitaminas devem ser preparadas em forma de “premix” (ou diluídas) com um carreador apropriado para serem adicionadas nas rações. Os “premixes” multivitamínicos são uma mistura concentrada de produtos vitamínicos misturadas a um carreador apropriado para adição em suplementos, concentrados e rações (Zhuge & Klopfenstein, 1986).

A qualidade do “premix” e o controle de produção são essenciais para assegurar o valor das vitaminas nas rações produzidas. Aiello (1978) descreveu as características desejáveis dos “premixes”: Tamanho da partícula uniforme, livre de contaminação, conter baixa umidade (Maximo 12,0%), pH favorável e característico tamanho de densidade – 30 libras.

Conforme Parrish & Patterson (1983), a moagem, armazenagem e a temperatura têm influenciado negativamente nos resultados analíticos das vitaminas. Os pesquisadores trituraram amostras de “premixes” e armazenaram as mesmas, durante um mês, em um congelador (-18° C) e em uma sala sob temperatura ambiente. As amostras armazenadas no congelador apresentaram níveis de vitamina A 10% superior, em relação aquelas mantidas a temperatura ambiente.

Os técnicos da nutrição animal são unânimes em afirmar de que o fornecimento adequado das vitaminas é fundamental para a manutenção da saúde dos animais. Os animais alimentados adequadamente possuem maior resistência a agentes infecciosos, maior integridade dos tecidos, maior produção de anticorpos, maior imunidade para as doenças, grande habilidade para detoxificação, aumento na regeneração das células sanguíneas e outros fatores. Em contraste a essas características, os animais que apresentam deficiências vitamínicas possuem maior suscetibilidade aos agentes infecciosos (Shurson & Johnston, 1998). Com essa preocupação Mc Naughton (1990), apresenta em seu artigo um levantamento de sete companhias avícolas, com a proposta de medir o nível de vitaminas em seus “premixes”. Os resultados estão demonstrados no tabela 3.

TABELA 3 - Avaliação do nível de vitaminas entre diferentes “premixes”.

VITAMINA	UNIDADE	NRC (1984)	VARIAÇÃO	MÉDIA
A	UI	1,4	3,5 - 12	5,8
D ₃	UI	0,2	0,9 – 4,2	2,0
E	UI	9,1	1,0 – 25	12,3
B ₁₂	mg	8,2	4 – 20	11,8
K	g	0,5	0,2 – 6,5	4,1
RIBOFLAVINA (B ₂)	g	3,3	2,5 - 13	6,9
NIACINA	g	24,5	12 - 60	39,9
AC. PANTOTÊNICO	g	9,1	4,0 – 18,5	10,8
COLINA	g	1.180,0	500 – 1.600,00	902,2
ÁCIDO FÓLICO	g	0,5	0,1 – 1,8	0,6
TIAMINA (B ₁)	g	1,6	0,0 – 2,0	1,0
PIRIDOXINA (B ₆)	g	2,7	0,0 – 100	52,2
BIOTINA	mg	136,2	0,0 – 100	52,2

2.7. Métodos para determinação de vitaminas

A padronização de métodos para determinação das vitaminas em alimentos é dificultada devido à diversidade de procedimentos descritos na literatura e a morosidade da aplicação da técnica oficial da “Association Official of Analytical Chemistry” (AOAC). Isso faz com que nos organismos oficiais de fiscalização e na própria indústria sejam impedidos de exercerem um controle de qualidade adequado nos processos tecnológicos, como também e nos produtos desenvolvidos (Ball, 1988; Paixão & Stamford, 2003).

A análise das vitaminas está sujeita a uma série de erros, pouco freqüente em outras substâncias, especialmente pela facilidade de isomerização desses nutrientes que conduz a perda total ou parcial do valor vitamínico em condições extremas de pH, temperaturas elevadas e alto poder de oxi-redução, fatores que devem ser considerados pelos métodos analíticos (Paixão & Stamford, 2003).

A análise qualitativa e quantitativa de vitaminas é de grande importância para a ciência médica e alimentar. Tais análises podem ser executadas para determinar as vitaminas em uma variedade de matrizes, incluindo tabletes, cereais, rações, produtos farmacêuticos e cosméticos. As análises de vitaminas em rações de animais são importantes para medir se estes produtos possuem realmente esses valores descritos nos rótulos (controle de qualidade interno) e também para controle de qualidade governamental (Ricker & Schellenberger, 2002).

2.7.1. Cromatografia

A precisão para a determinação simultânea das diferentes vitaminas esta ligada ao grande progresso da aplicação dos métodos cromatográficos, porém, o principal inconveniente a ser considerado é a padronização das condições de extração, em função das características físico-químicas dos alimentos e à instabilidade das vitaminas a serem determinadas. As vitaminas possuem alta sensibilidade a luz, oxidação e, ainda, a possibilidade de isomerização e degradação durante o processo de determinação e quantificação (Rizzolo & Polesello, 1992).

Técnicas analíticas modernas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa tem aperfeiçoado a qualidade das análises de vitaminas. Foi por esta razão que ganharam significativa importância. Com esses equipamentos de alta precisão, as vitaminas podem ser analisadas em baixas concentrações de partes por milhão (ppm) (Albers, et al. 2002).

2.7.2. Cromatografia gasosa (CG)

O uso da CG tem apresentado algumas dificuldades para a determinação das vitaminas. Isso ocorre devido a instabilidade de algumas vitaminas a elevadas temperaturas. Assim sendo, foi utilizada a cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa para a determinação do ácido retinóico e, com maior eficiência, para a terceira geração de retinóis.

A combinação da CG à espectrometria de massa não se apresentou como um método eficiente para a determinação de retinóis devido a quantidade de amostra necessária e aos problemas relacionados à distinção entre os isômeros geométricos de primeira e segunda geração de retinóis (WISS, 1990). Assim, a

análise de vitaminas por CG é muito difícil e requer, geralmente, a formação de derivados voláteis (Collins et al., 1995). Devido a sua baixa volatilidade, a maioria das vitaminas lipossolúveis não são apropriadas para determinação por cromatografia gasosa acoplada a detector de massa (GC-MS) (Heudi et al., 2003).

2.7.3. *Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*

Em 1968 foram publicados os primeiros trabalhos sobre CLAE, os quais relataram resultados experimentais comprovando a possibilidade de utilizar-se equipamentos, que favorecessem análises de substâncias com maior rapidez em relação a CG, operando com uma fase móvel líquida de alta pressão e obtendo-se resultados satisfatórios (Valente et al., 1983; Collins et al., 1995).

A CLAE pode ser executada a temperatura ambiente e sem derivação das substâncias, utilizando a detecção por UV e ou propriedades de fluorescência dos compostos que desempenham a função de vitaminas (Paixão & Stamford, 2004)

Basicamente, a CLAE dispõem de um reservatório com filtro, onde é colocada a fase móvel; um sistema de bombeamento; um injetor; uma coluna; um detector (por exemplo, UV ou fluorescência) e um sistema de registro de dados.

Segundo Rodrigues-Amaya (1989), a CLAE possui vantagens significativas em relação a outras técnicas, como: rapidez; simplicidade; reprodutibilidade; menor exposição ao oxigênio, luz, adsorventes e solventes; precisão; separação eficiente e alta sensibilidade.

Quando testavam simultaneamente a quantificação de vitamina A, D₃ e E em formulações de dietas infantis fortificadas, concluíram que o método de CLAE tem grande aplicabilidade por apresentar resultados similar no método de cromatografia líquida acoplada a detector de massa (LC-MS) (Heudi, et al. 2003),

A característica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são a rapidez e a segurança do método, foi o que Quian & Sheng (1998) observou quando avaliavam diferentes métodos de extração de vitaminas lipossolúveis para determinação por CLAE.

De acordo com Moreno & Salvadó (2000), a eficiência do método por CLAE foi constatada quando os pesquisadores determinaram vitaminas hidro e lipossolúveis em formulações multivitamínicas e obtiveram um coeficiente de recuperação entre 78 e 116%.

Mesmo utilizando sistema de extração de vitamina A simplificado em concentrados multivitamínicos, Marques (1999) encontrou um satisfatório coeficiente de recuperação (72,5 %) quantificando suas amostras fortificadas por CLAE.

Métodos seguros, sensíveis e rápidos para a determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos fortificados são essenciais para a segurança nutricional. Normalmente, vitaminas A e E são determinadas em produtos alimentares por CLAE com UV e detecção fluorescente (Heudi et al., 2003).

2.8. Validação de metodologia

O processo de validação de uma metodologia é formado por um conjunto de atividades dinâmicas e contínuas (Leite, 1996), considerando como parte de um programa de segurança da qualidade (Chasin et al., 1994). Validar é estar com o objetivo voltado para a confiabilidade analítica do laboratório e do método escolhido ou desenvolvido para se obter resultado (Leite, 2002).

As verificações precisam ser realizadas para garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas e para demonstrar que o método seja cientificamente coerente, sob as condições nas quais ele deve ser aplicado (ANVISA, 2004).

Segundo a AOAC (2000), validar um método é estabelecer através de estudo sistemático de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes à necessidades do problema analítico.

A AOAC tem efetuado dois procedimentos para a validação de métodos, os quais, entretanto, não estão relacionados diretamente com a produção dos métodos de análises que têm sido validados por testes colaborativos, resultando em uma grande parte da validação. São eles: - métodos validados igualmente, nos quais um método de análise é avaliado em um limitado número de laboratórios (usualmente três), e uma avaliação é realizada a partir de suas características, e; - métodos avaliados pelo instituto de pesquisa AOAC, cujos métodos são normalmente produtos padrões (como por exemplo, testes de kits), para os quais um certificado com as especificações correspondentes é emitido pelo instituto de pesquisa (Horwitz, 1990).

2.8.1. Delineamento experimental

É o planejamento propriamente dito, consistindo na escolha e adequação da metodologia às condições laboratoriais, tendo em vista o objetivo a que se propõem. Para o uso do CLAE, envolve escolha correta de amostras, escolha do tipo de detecção, fase móvel, fase estacionária, material e equipamentos adequados (Bressole, 1996).

O protocolo do delineamento experimental pode assumir, ainda, modelos baseados em normas oficiais, levando-se sempre em conta as características e peculiaridades referentes à área de atuação de cada laboratório (AOAC, 2000).

2.8.2. Linearidade

A linearidade consiste, geralmente, o primeiro parâmetro a ser estudado. É determinada pela medição de amostras, com concentrações de analito abrangendo a faixa reivindicada do método (Kateman & Buydens, 1993). Os resultados são usados para obter uma reta por regressão com relação ao cálculo do analito, usando-se o método dos mínimos quadrados (Horwitz, 1990).

A linearidade é representada pela curva de calibração, também chamada curva padrão, é a relação existente entre o valor experimental e a concentração analítica (Shah et al., 1992), devendo apresentar o seguinte tratamento estatístico: intersecção, equação da regressão linear, coeficiente de correlação (r) ou de determinação e concentração estimada dos calibradores (Miller & Miller, 1998).

2.8.3. Seletividade

A seletividade de um método se refere a extensão, até o qual ele pode determinar o analito específico em uma mistura complexa sem interferência dos outros grupos componentes de mistura (ANVISA, 2004). O analito de interesse deve ter o sinal analítico isento de interferências que possam levar à confusão na

identificação ou dar margem de não confiabilidade ao resultado quantitativo (Leite, 2002).

2.8.4. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é calculado na prática como sendo correspondente à concentração que produzira um valor de sinal medido 3 vezes maior que o nível de ruído médio obtido com a solução de controle ou branco (Horwitz, 1990; Leite, 2002). O LD consiste na menor concentração da substância em análise que o processo analítico pode diferenciar com confiança, dos níveis relacionados à linha de base (Shah et al., 1992).

2.8.5. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor concentração de analito que pode ser determinado com um nível de incerteza aceitável (AOAC, 2000). Ele é a menor concentração que pode ser precisamente medida e estar incluído na curva de calibração (Taylor, 1981). O LQ é normalmente o ponto mais baixo na curva de calibração (ANVISA, 2004).

2.8.6. Coeficiente de recuperação

Qualquer que seja a manipulação que possa levar à perda da substância a ser analisada, esta deve ter seu valor determinado (Bressole, 1996). Toda amostra que recebe tratamento de análise indireta (diluição, extração, concentração e derivação) deve ter calculado experimentalmente o erro ou a perda da espécie em análise (Leite, 1996). O percentual recuperado deve ser tal que não interfira na quantificação da rotina analítica que se segue. Portanto, com o fator de recuperação, o resultado fica mais próximo da realidade analítica, sendo que o valor adicionado não deve ser superior ao dobro da resposta do sinal da matriz e todos os demais componentes ou produtos de contato na análise indireta devem ser considerados no fator de recuperação (Leite, 2002).

2.8.7. Precisão e exatidão

A precisão de um método é a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes, sendo normalmente expresso em termos de desvio-padrão (ANVISA, 2004). A precisão deve ser determinada pela repetitividade com três a cinco análises sobre duas ou três amostras com concentrações diferentes e pertinentes à análise da substância a ser analisada. Esta repetição pode ser ampliada para ocasiões diferentes (horas, dias, semanas e mês) (Harris, 2001).

Para a reprodutividade considera-se, para as ocasiões, a variação dos coeficientes de variação, variação das médias aritméticas ou ainda testes de verificação de precisão (Leite, 2002).

Segundo Shah (1992), a precisão exprime o grau de dispersão dos resultados em torno da média, sendo, portanto relacionado ao grau de repetitividade do método analítico podendo ser subdividido em precisão durante um dia ou precisão intra-ensaio e entre dias ou precisão inter-ensaios.

Exatidão traduz a concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro, ou seja, os estimados pelo método analítico (Shah, 1992; Leite, 1996). A variação dos valores em relação a média devem estar compreendidos entre os limites de -50 a + 20% para concentrações inferiores a 1µg/kg e -30 a + 10% para concentrações superiores a 1µg/kg (Arnold, 1988; Commission of the European Communities, 1991 *apud* MALLMANN, 1993).

2.9. IDENTIFICAÇÃO DA SITUAÇÃO E ALTERNATIVAS

Atualmente o interesse por vitaminas tem sido de grande importância na saúde humana e animal. Suas concentrações nas matérias-primas são baixas, sendo necessário a adição nas dietas, através da utilização de complexos multivitamínicos, agregando custos à alimentação que por vezes são representativos.

Muitas das vitaminas integram o sistema enzimático, atuando como coenzimas e formando parte da molécula das coenzimas. Outras cumprem seu papel de modo similar aos hormônios. Assim são participantes essenciais de inúmeras vias metabólicas e processos fisiológicos.

A utilização de suplementos vitamínicos é clinicamente aconselhável em quadros de avitaminose. Estas situações surgem em consequência da ingestão

de alimentos desbalanceados, má absorção ou aumento das necessidades metabólicas. Para tanto se encontram disponíveis em multivitamínicos, cápsulas, alimentos enriquecidos, como exemplo o leite em pó, cereais e alimentos para dieta balanceada de humanos. Para alimentação animal encontram-se em “premixes” que são adicionados as rações, os quais sabe-se que o custo agregado à composição final chega até 15,0% do custo total das formulações.

Devido a grande importância das vitaminas na saúde humana e animal, aos altos custos da inclusão das mesmas à dieta, o surgimento de inúmeros fornecedores sem a comprovação de sua capacidade técnica e os problemas já relatados em situações de inconformidades da apresentação do “premix” com a real disponibilidade vitamínica se faz necessário a implementação de métodos analíticos de controle de qualidade dos produtos comercializados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostras

As amostras empregadas para o estabelecimento e validação da metodologia analítica de vitamina A eram compostas pela própria vitamina e um veículo sendo este composto por partículas desuniformes (Aderex).

Aproximadamente 15 amostras de “premixes” comerciais foram analisadas com o objetivo de avaliar a robustez do método.

3.1.2. Padrão utilizado

All-trans Retinol (vitamina A)¹ – 25 mg

3.1.3. Reagentes e solventes

- Água ultra-pura
- Acetonitrila²
- Metanol p.a.²
- Hexano p.a.³
- Etanol 95% p.a.³
- Hidróxido de potássio p.a.³
- L (+) ácido ascórbico 99+%³
- Sulfato de sódio anidro³
- Nitrogênio
- BHT (butil hidróxitolueno)¹

¹ SIGMA – Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O. 1120 – 89552 Steinheim. Alemanha

² VETEC – Vetec Química Fina Ltda. Distrito Industrial Duque de Caxias – Rio de Janeiro – RJ. Brasil

³ MERCK KgaA, 64271 Darm Stadt, Alemanha

3.1.4. Vidraria e material de consumo

- Funil de separação (250 mL)⁴
- Funil⁴
- Balão volumétrico âmbar (10, 50, 100 e 250 mL)⁴
- Erlenmeyer, béquer, provetas, funis e pipetas⁴
- Ponteiras pequenas e grandes⁴
- Frascos âmbar⁴
- Tubo para aquecimento em banho-maria⁴
- Papel alumínio
- Papel de pesagem
- Aditivo homogeneizador de “premix” - Aderex⁵

3.1.5. Aparelhos/instrumental

- Balança analítica Sartorius AG⁶
- Rota vapor⁷
- Banho-maria⁷
- Bomba de vácuo⁸
- Condensador⁹
- Gerador de Nitrogênio¹⁰
- Pipetador automático¹¹
- Sistema de Ultra-Purificação USF ELGA¹²
- Espectrofotômetro UV/VIS 1203¹³

⁴ PYREX – Vidros Corning Brasil Ltda. Av. Corning, 496, Suzano, São Paulo – SP. Brasil

⁵ DILUMIX – Dilumix Diluentes para “premix” Ltda. R. Antonio Fiocco, 26 - Jd. Adelina - Leme – SP. Brasil

⁶ SARTORIUS AG – Goettingen, 37070 – Alemanha.

⁷ FISATOM - Equipamentos Científicos Ltda. R. Ministro Godoy nº 1485, São Paulo – SP. Brasil.

⁸ BOC EDWARDS – Boc Edwards Brasil Ltda. R. Bernardo Wrona, 222 – São Paulo – SP. Brasil.

⁹ ATLAS COPCO – R. Santa Catarina, 304 – Porto Alegre – RS. Brasil.

¹⁰ AGILENT – Agilent Technologies Brasil Ltda. – Al. Araguaia, 1142, Alphaville – Barueri, SP – Brasil.

¹¹ KACIL INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA. R. Senador Soares Meireles, nº 123, Casa Amarela, Recife – Pernambuco – Brasil.

¹² C G ANALÍTICA – Com. de Equipamentos Importação e Exportação Ltda. R. Domingo de Moraes, 244. Vila Mariana – São Paulo, Brasil.

¹³ SHIMADZU – Corporation Marketing Division, Chyoda, Ku, Tokyo 101 Japan.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies serie 1100¹⁰, composto por bomba injetora automática, detector de fluorescência, e Coluna Cromatográfica¹⁴ Lichrospher RP 18 (5µm)

¹⁴ HP Hewlett Packard – Company Brasil S.A. Av. Rio Negro, 750 Alphaville, Barueri. São Paulo. Brasil

3.2. MÉTODOS

O estabelecimento e validação da metodologia de análise de vitamina A foi realizada conforme o método publicado pela “United States Pharmacopeia (2004)”, com adaptações às condições do laboratório de análises micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria.

3.2.1. Cuidados ao manipular o analito

Devido à alta sensibilidade do retinol a luz e a oxidação, foram tomadas algumas medidas operacionais de precaução: todas as atividades operacionais foram realizadas sob condições reduzidas de exposição à luz, utilizando vidrarias de cor âmbar e evitando exposição prolongada ao ar e os extratos de vitamina A foram injetados no mesmo dia de preparação, sendo os mesmos protegidos por papel alumínio.

3.2.2. Preparação da solução padrão de all-trans-retinol

A solução padrão (S0) foi preparada a partir da mistura de uma ampola de 25 mg de *all-trans-retinol* em 25 mL de metanol, em um balão volumétrico âmbar, estabilizada com BHT (0,1 g de BHT para 25 mL de solução). Após realizou-se 5 novas diluições, (S1, S2, S3, S4 e S5) preparadas a partir da S0, com as respectivas concentrações 9,5 - 7,12 - 4,75 - 2,37 e 0,47 µg/mL, com o objetivo de realizar a curva de calibração. A absorvância de cada solução (A_{S1} , A_{S2} , A_{S3} , A_{S4} e A_{S5}) foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 325 nm. Calculou-se a concentração em U.I. / mL, multiplicando-se a absorvância por 18,57 (equação 1), que é um fator derivado da absorvância para o retinol (USP, 1995).

$$C(\text{UI/mL}) = A \times 18,57 \quad (1)$$

Onde:

C = concentração em UI/mL

A = absorvância do padrão em 325 nm

18,57 = fator de correção para o *all-trans retinol* em fase móvel metanol:água (98/2; v/v).

3.2.3. *Extração e preparação das amostras*

A extração da vitamina A foi realizada em 5,0 g de amostras (premix), colocando-se em um tubo de ebulição, contendo 1,69 g de ascorbato de sódio. Adicionou-se 75 mL de etanol e 7,5 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio a 50%. Homogeneizou-se. A mistura foi homogeneizada, em seguida prendeu-se o tubo em um condensador de ar, sob a presença de água refrigerada circulante, e aqueceu-se em banho fervente (80-90 °C) por 20 minutos. Após resfriou-se o tubo, em água corrente. A seguir, adicionou-se 75 mL de água purificada. A extração foi realizada, em funil de separação de cor âmbar de 250 mL por cinco vezes, empregando volumes de 30 mL de hexano. O extrato foi coletado em outro funil de separação de 250 mL, onde este foi lavado 2 vezes com 100 mL de água purificada. A fase orgânica foi seca por filtração, através de papel filtro contendo sulfato de sódio anidro (± 20 g). O filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL, lavando-se o sulfato de sódio anidro com a mesma solução para a remoção dos eventuais resíduos, completando-se o volume do balão com aproximadamente 100 mL de hexano. Posteriormente uma alíquota de 10 mL foi evaporada no rotavapor a uma temperatura de 45 °C durante 3 minutos. A recuperação do extrato foi realizada através da ressuspensão com 10 mL de metanol. O volume recuperado foi homogeneizado e 1 mL foi destinado para análise por cromatografia líquida.

3.2.4. *Preparação da solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH)*

A solução de hidróxido de potássio foi preparada na concentração de 1 g para 1 mL de água destilada. O preparo desta solução ocorreu anteriormente a extração das amostras.

3.2.5. *Condições cromatográficas*

3.2.5.1. *Equipamento cromatográfico*

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies serie 1100, composto por bomba injetora automática e detector de fluorescência, .

3.2.5.2. *Coluna*

Coluna Cromatográfica Lichrospher RP 18 (5µm)

3.2.5.3. *Fase móvel*

Metanol – 98%

Água – 2%

3.2.5.4. *Comprimento de onda*

325 nm

3.2.5.5. *Fluxo da fase móvel*

1 mL/min

3.2.5.6. *Volume de injeção*

20 µl

3.2.5.7. *Tempo de retenção*

All-trans-retinol: 4.12

3.2.5.8. *Cálculo para expressão dos resultados*

$$\text{Vitamina A (UI / mL)} = \frac{C \times A(\text{trans}) \times V \times F}{m_E}$$

onde:

C = média do coeficiente de resposta da vitamina A

A(trans) = área do pico de *trans*-retinol obtido com a solução de amostra

V = volume final em mL (por ex. 250 mL ou outra diluição realizada)

m_E = massa da amostra em gramas

F = fator de diluição ou concentração da solução teste

Para corrigir o valor encontrado de vitamina A nas análises de “premixes” comerciais será utilizado o Fator de Correção (FC). O FC é um índice que leva em consideração o Coeficiente de Recuperação (CR) do método, permitindo desta forma corrigir o valor encontrado em detrimento da eficiência do método analítico validado.

$$FC = \frac{100}{CR}$$

$$VC = VE \times FC.$$

onde:

FC = Fator de Correção

CR = Coeficiente de Recuperação

VC = Valor Corrigido

VE = Valor Encontrado

3.2.6. Validação da metodologia analítica

3.2.6.1. Curva de calibração

A curva de calibração foi obtida a partir de cromatografias sucessivas (em triplicatas) das soluções analíticas dos padrões de vitamina A. As concentrações utilizadas foram de 0,47 - 2,37 - 4,75 - 7,12 e 9,5 µg/mL.

3.2.6.2. Determinação do limite de detecção

O limite de detecção foi obtido através de análise em triplicata e diluição das soluções analíticas da vitamina A, a partir da concentração de 0,47 µg/mL. A cromatografia foi realizada conforme descrito no item 3.2.5. O limite de detecção foi determinado pela menor concentração cromatografada, cuja altura do pico do cromatograma da solução de vitamina A se destacou à uma altura três vezes superior a média das oscilações de ruído da linha de base cromatográfica.

3.2.6.3. *Determinação do limite de quantificação*

O limite de quantificação foi obtido a partir da fortificação de amostras de Aderex, em triplicata. Escolheu-se a menor concentração cromatográfica, cujo pico se destacou à uma altura cinco vezes superior à medida das oscilações de ruído da linha de base cromatográfica.

As extrações e cromatografia foram realizadas conforme o descrito nos itens 3.2.3 e 3.2.5.

3.2.6.4. *Determinação do coeficiente de recuperação*

Para realizar a avaliação do coeficiente de recuperação, fortificaram-se amostras de partículas desuniformes (Aderex) com diferentes concentrações de soluções analíticas de vitamina A. As concentrações utilizadas foram 4,75 µg/mL, 2,37 µg/mL e 0,95 µg/mL, sempre em triplicata, com um branco e um controle.

Em seguida realizaram-se as extrações, conforme descrito no item 3.2.3. Após foi realizado o procedimento de cromatografia, seguindo o item 3.2.5.

3.2.6.5. *Determinação da repetitividade do método*

Para avaliar a repetitividade do método foram analisadas 3 amostras, fortificadas com padrão de vitamina A, em triplicata, sendo avaliados com detector UV/VIS. Os parâmetros de extração e cromatografia utilizados foram descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.5, respectivamente.

3.2.7. *Determinação de vitamina A em amostras de “premix” utilizadas na fabricação de rações animais*

As amostras de “premix” analisadas (15) foram enviadas por agroindústrias de produção animal. A extração foi realizada conforme descrito em 3.2.3 e a análise cromatográfica foi realizada de acordo com o item 3.2.5.

3.2.8. Avaliação estatística

As avaliações estatísticas dos resultados dos experimentos de validação do método analítico foram realizadas empregando-se a estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação). O programa estatístico empregado foi o Statgraphics, versão 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. Validação da metodologia

Os parâmetros de validação da metodologia foram obtidos empregando-se as condições cromatográficas descritas no item 3.2.5.

4.1.1. Curva de calibração

Para avaliar a linearidade da resposta cromatográfica da vitamina A, construiu-se a curva de calibração conforme descrito no item 3.2.6.1. Na Tabela 4 encontram-se os valores das áreas dos picos cromatográficos da curva de calibração da vitamina A. Na Figura 2 observaram-se às curvas de calibração desta vitamina, com o emprego do detector de UV. A curva de calibração apresentou-se linear, demonstrando um coeficiente de correlação de 0,9995.

4.1.2. Limite de detecção do método analítico (LD)

O limite de detecção foi obtido conforme a metodologia descrita no item 3.2.6.2. Representa a menor concentração capaz de produzir um pico perfeitamente detectável (3 vezes superior a média das oscilações produzidas na linha de base). Utilizando o detector de UV o valor encontrado foi de 0,095 µg/mL.

4.1.3. Limite de quantificação do método analítico (LQ)

O limite de quantificação foi obtido conforme a metodologia descrita no item 3.2.6.3. O LQ é definido como a menor concentração do analito que produza um pico cinco vezes superior à média das oscilações obtidas pela linha de base cromatográfica, quando uma amostra é submetida a todo o processo analítico. No detector UV o valor encontrado foi de 0,24 µg/mL.

4.1.4. Coeficiente de recuperação de processo analítico de extração

O coeficiente de recuperação (CR) foi estimado empregando-se a metodologia descrita no item 3.2.6.4 e métodos de extração descritiva no item 3.2.3. Foi determinado um CR médio de 85,98%, conforme a Tabela 5 e Figura 3.

TABELA 4 - Áreas dos picos cromatográficos da curva de calibração da vitamina A, em detector de UV.

Vitamina A $\mu\text{g/mL}$	Área (mAU)*	DP**	CV%***
0,47	74,47	4,10	4,64
2,37	372,84	4,0	1,07
4,75	728,13	11,59	1,59
7,12	1074,23	4,58	0,42
9,50	1416,33	6,50	0,46

* - Média de três repetições

** - Desvio Padrão

*** - Coeficiente de Variação %

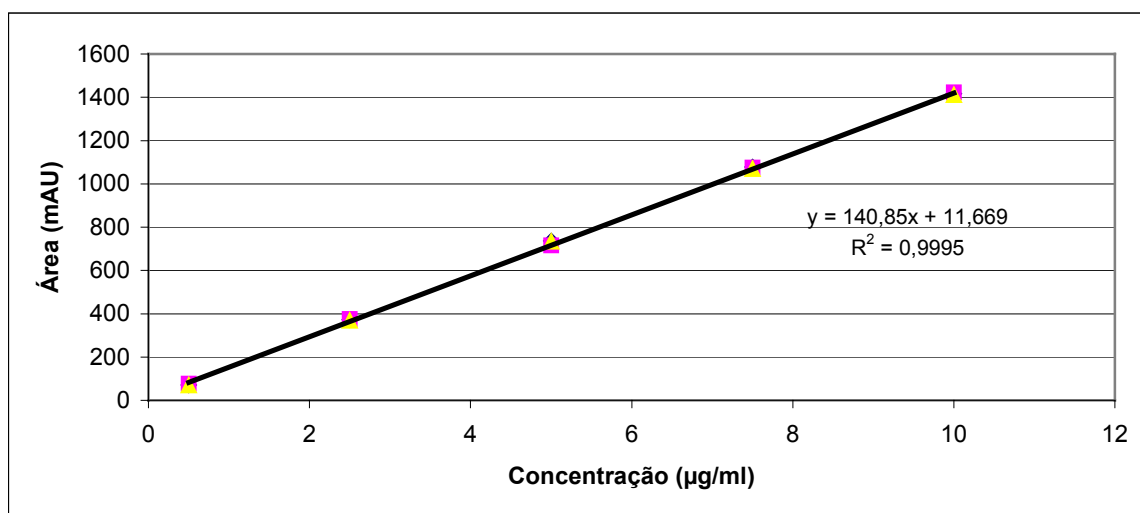


FIGURA 2 - Curva de calibração da vitamina A empregando detector UV.

TABELA 5 - Coeficiente de recuperação da vitamina A em amostras com partículas desuniformes (Aderex) analisadas com detector de UV/VIS.

Vitamina A (µg/mL)	CR 1*	CR 2	CR 3	Media %**	S***	CV%****
0,95	83,5	82,3	81,6	82,46	0,96	1,16
2,38	88,00	85,4	84,00	85,80	2,03	2,36
4,75	90,3	88,8	90,00	89,70	0,79	0,88
Média				85,98	3,35	3,90

* - Coeficiente de Recuperação

** - Média de três repetições

*** - Desvio Padrão

**** - Coeficiente de Variação%

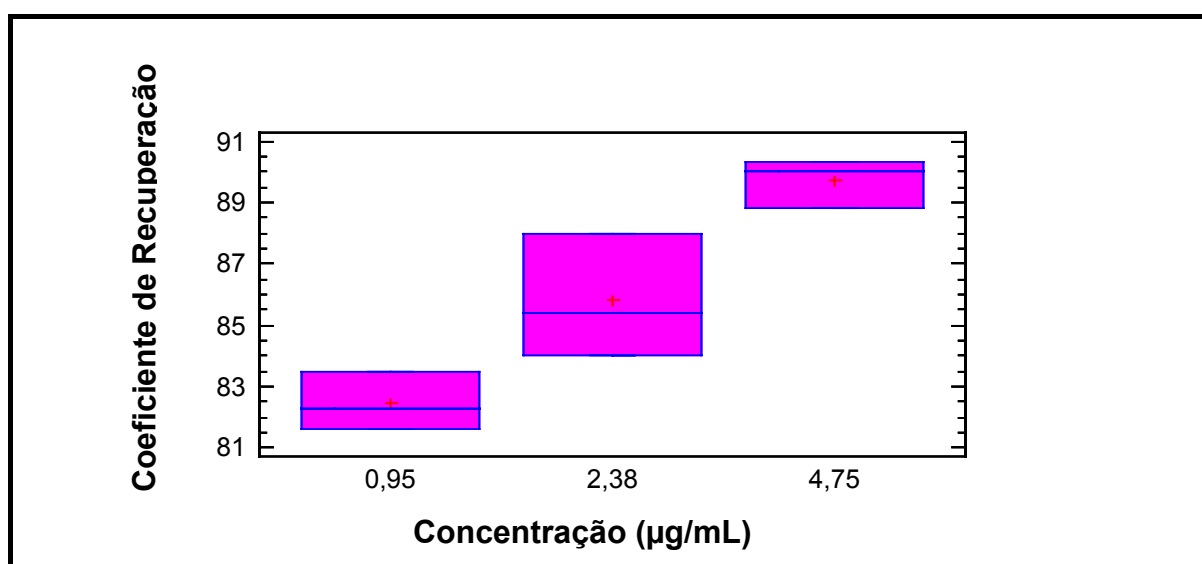


FIGURA 3 - Distribuição estatística do coeficiente de recuperação (CR) de vitamina A em amostras com partículas desuniformes (Aderex), analisadas em detector UV/ VIS.

4.1.5. Repetitividade do método analítico

Conforme descrito no item 3.2.6.5 e utilizando a metodologia de cromatografia segundo o item 3.2.5, avaliou-se a repetitividade do método através da extração de três amostras em triplicatas, com detecção por UV. Na Tabela 6, pode-se observar o coeficiente de variação de repetitividade da vitamina em estudo.

TABELA 6 - Avaliação da repetitividade do método analítico para a determinação da vitamina A em concentrado vitamínico com partículas desuniformes (Aderex), analisadas em detector de UV / VIS.

Amostra	Repetição de amostra			Média*	S**	CV%***
	1	2	3			
A	132	130	129	130,33	1,52	1,17
B	312	303	298	304,33	7,09	2,33
C	725	710	720	718,33	7,63	1,06

* - Média de três repetições

** - Desvio Padrão

*** - Coeficiente de Variação%

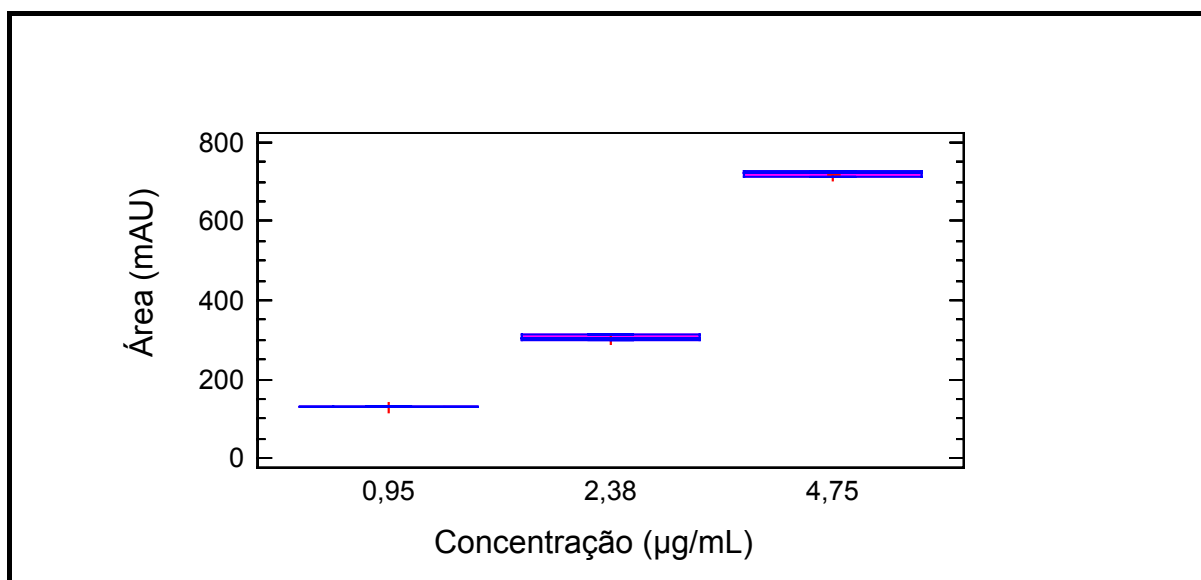


FIGURA 4 - Distribuição estatística da repetitividade dos resultados analíticos de vitamina A em amostras com partículas desuniformes (Aderex), analisadas por cromatografia líquida com detector UV/VIS.

4.2. Análise cromatográfica

A Figura 5 ilustra o cromatograma obtido da vitamina A durante o processo de validação da metodologia, no desenvolvimento da curva de calibração, apresentando o pico cromatográfico de uma das soluções empregadas.

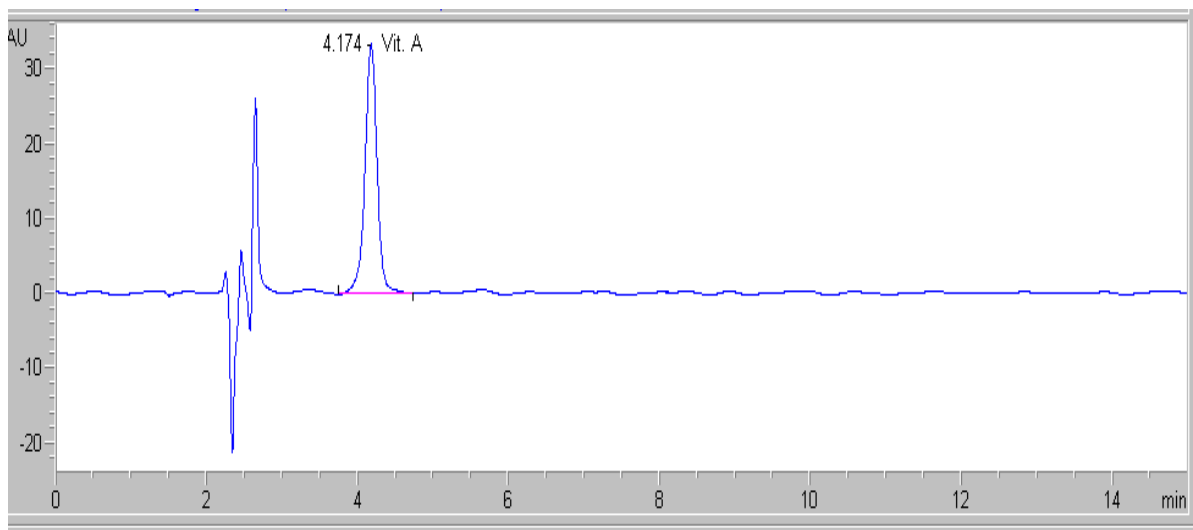


FIGURA 5 - Cromatograma de uma solução de 2,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina A, utilizada para realização da curva de calibração.

A Figura 6 ilustra o cromatograma obtido da vitamina A durante o processo de validação da metodologia, na determinação do limite de detecção do método, apresentando a comparação entre o pico cromatográfico de uma das soluções empregadas com o ruído da linha de base.

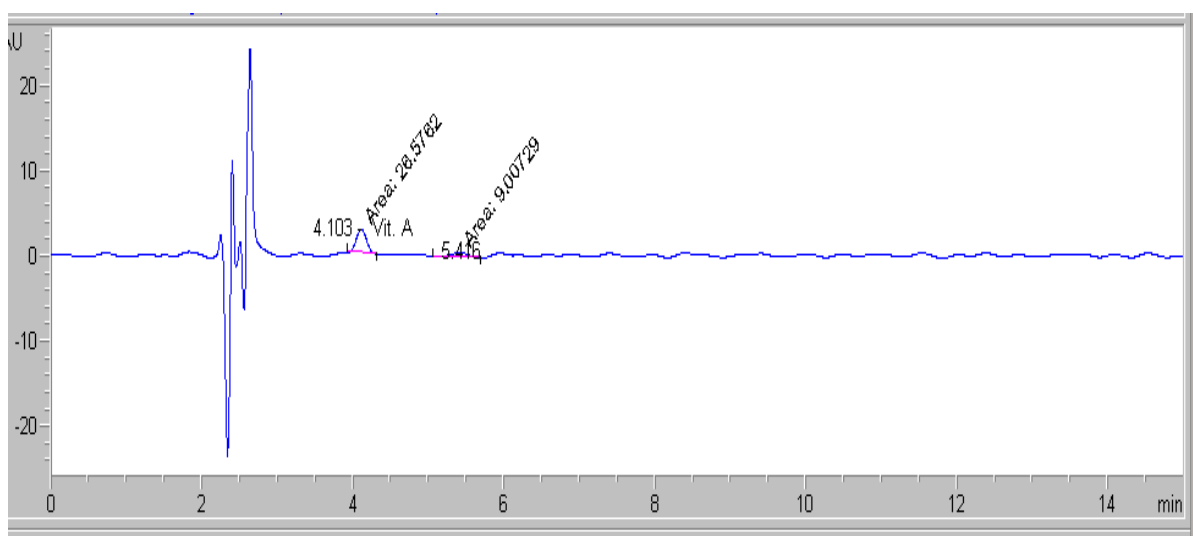


FIGURA 6 - Cromatograma de uma solução com a concentração de 0,095 µg/mL utilizado para determinação do limite de detecção. Expressa comparação do pico da concentração e a linha de base.

A Figura 7 ilustra o cromatograma obtido do veículo utilizado durante o processo de validação da metodologia, na determinação do coeficiente de recuperação, evidenciando a ausência de vitamina A.

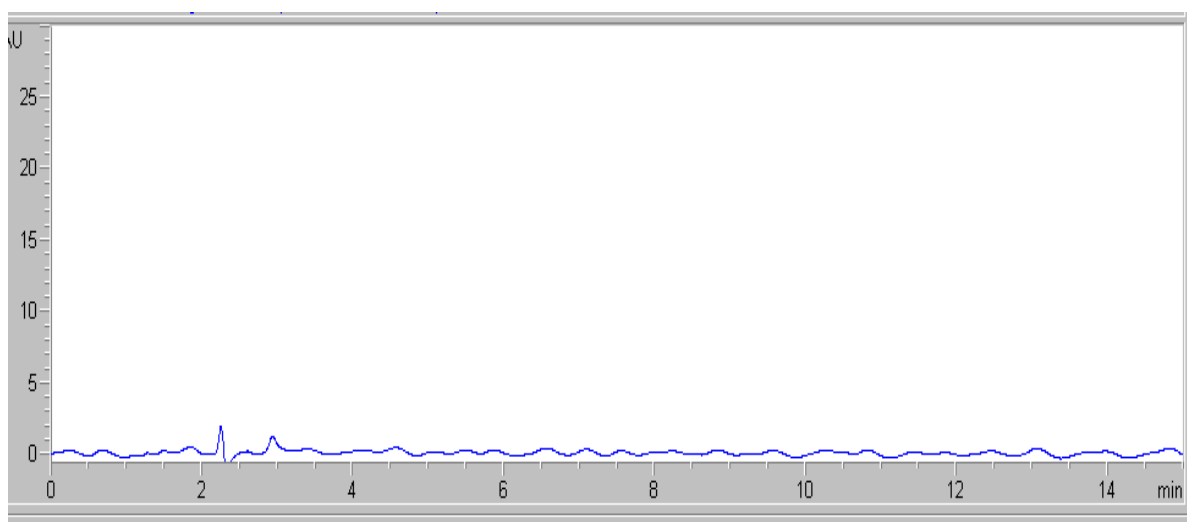


FIGURA 7 - Cromatograma veículo branco de vitaminas, utilizado para a determinação do coeficiente de recuperação do método de vitamina A.

A Figura 8 ilustra o cromatograma obtido de uma solução de vitamina A na concentração de 2,37 µg/ml utilizada durante o processo de validação da metodologia, na determinação do coeficiente de recuperação.

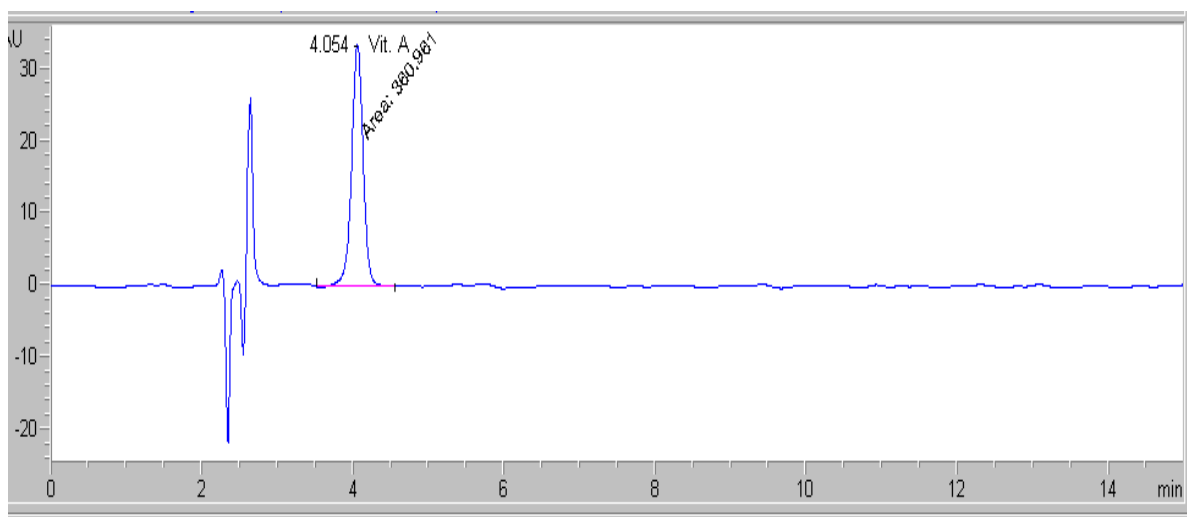


FIGURA 8 - Cromatograma de uma solução de vitamina A, utilizada como controle para determinação do coeficiente de recuperação do método, na concentração de 2,37 µg/mL.

A Figura 9 ilustra o cromatograma obtido do veículo utilizado durante o processo de validação da metodologia, na determinação do coeficiente de recuperação, fortificado com uma solução de vitamina A na concentração de 2,37 µg/ml.

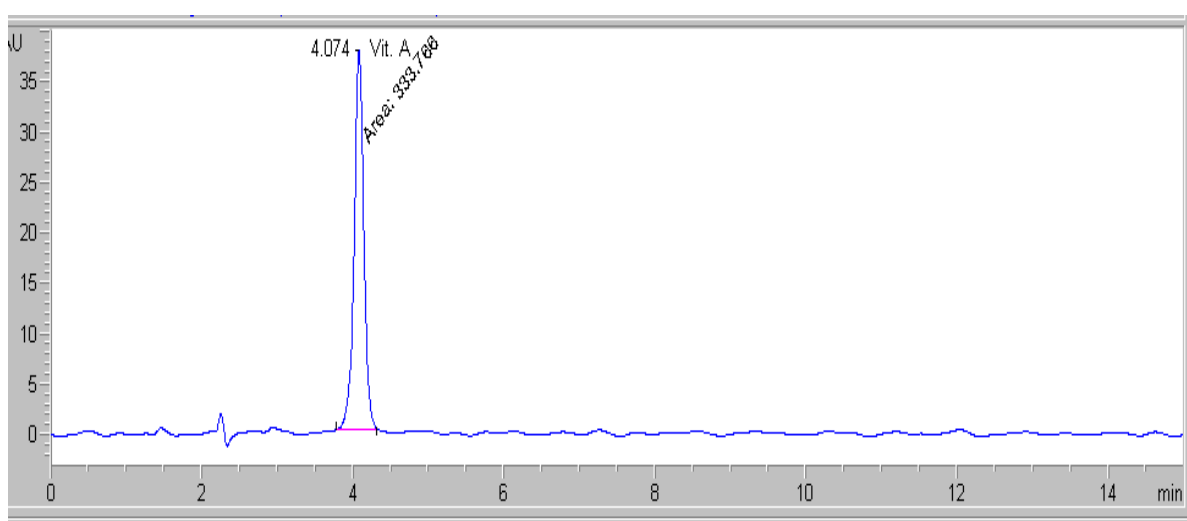


FIGURA 9 - Cromatograma de uma amostra de Aderex fortificada com solução de vitamina A na concentração de 2,37 µg/mL, utilizada para determinação do limite de coeficiente de recuperação.

4.3. Avaliação da eficiência do método

A Figura 10 ilustra o cromatograma de análise de uma amostra de “premix” comercial utilizado na dieta de suínos na fase inicial.

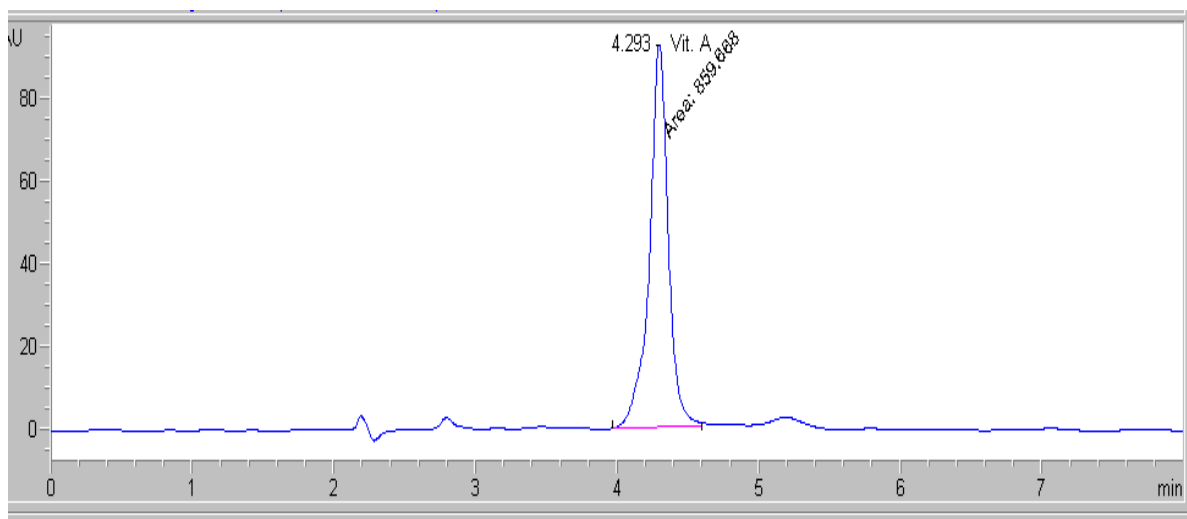


FIGURA 10 - Cromatograma de uma amostra de “premix” utilizado na alimentação de suínos na fase inicial.

A Figura 11 ilustra o cromatograma de análise de uma amostra de “premix” comercial utilizado na dieta de aves na fase de crescimento.

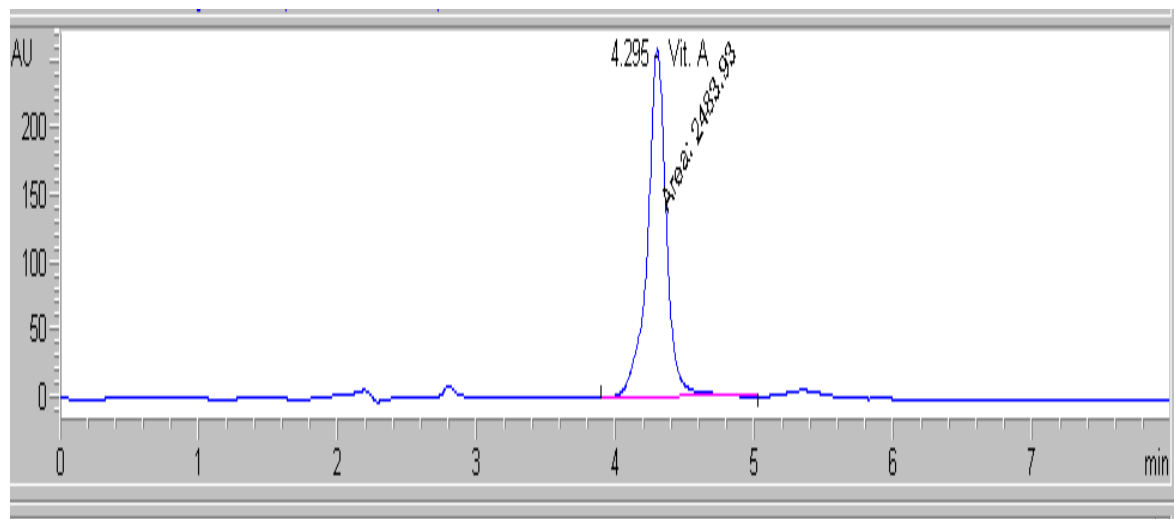


FIGURA 11 - Cromatograma de uma amostra de “premix” utilizado na alimentação de aves na fase de crescimento.

A Figura 12 ilustra o cromatograma de análise de uma amostra de “premix” comercial utilizado na dieta de suínos na fase de crescimento

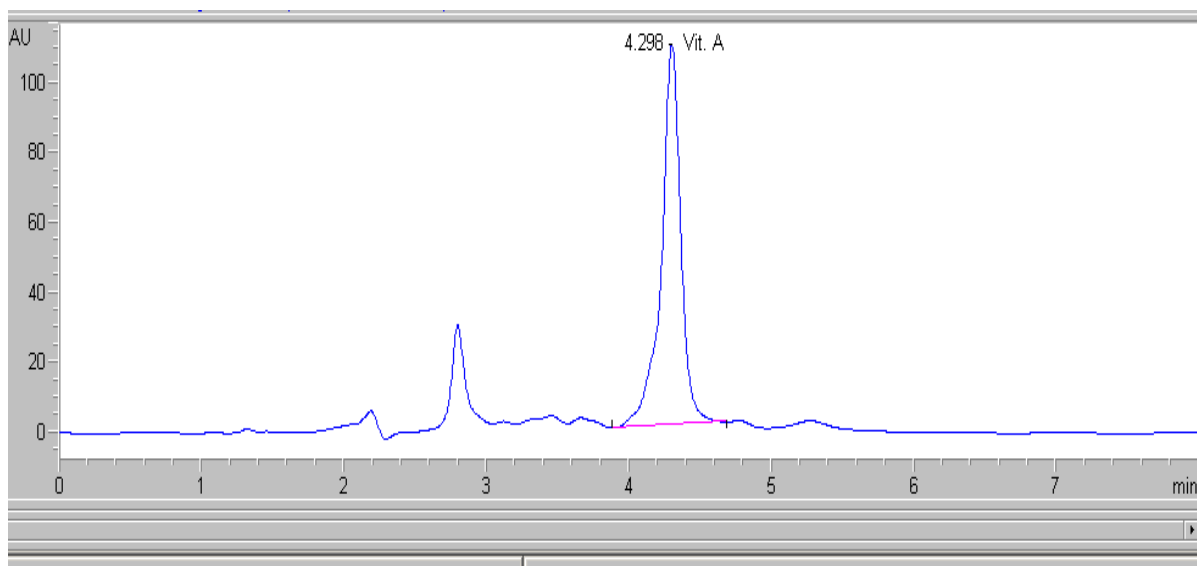


FIGURA 12 - Cromatograma de uma amostra de “premix” utilizado na alimentação de suínos na fase de crescimento.

4.4. Quantificação de vitamina A em amostras comerciais de “premixes” utilizados em rações animais

Quantificou-se a concentração da vitamina A em 15 amostras de “premix” comercial destinadas para alimentação de aves e suínos. Cada amostra possuía uma concentração diferente de vitamina A, observando as necessidades de acordo com a idade de produção de cada espécie animal. Para cada amostra foram realizadas as extrações e análises cromatográficas, obtendo-se os resultados na Tabela 7. Os valores encontrados de vitamina A nas amostras de “premix” foram transformados para UI/kg de ração de acordo com a recomendação de inclusão do fabricante.

TABELA 7 - Concentrações de vitamina A em “premixes” comerciais utilizados em rações de aves e suínos.

Tipo de ração / Espécie animal	Vitamina A / kg de ração* (UI/kg)	Valor ideal** (UI/kg)	Diferença (%) ***
Suíno inicial	4.599,69	8.000	-42,50
Suíno inicial	9.144,86	8.000	14,31
Suíno crescimento I	13.339,01	5.250	154,08
Suíno crescimento II	3.090,87	5.250	-41,13
Suíno crescimento II	6.290,68	5.250	19,82
Suíno terminação	3.504,94	3.500	0,14
Suíno terminação	4.555,90	3.500	30,17
Suíno terminação	5.600,30	3.500	60,01
Suíno gestação	7.938,57	8.000	-0,77
Aves 1 – 7 dias	9.859,30	10.000	-1,41
Aves 1 – 7 dias	7.424,00	10.000	-25,76
Aves 7 – 21 dias	6.219,92	8.000	-22,25
Aves 7 – 21 dias	7.702,40	8.000	-3,72
Aves 21 – 35 dias	3.865,12	3.000	28,84
Aves 21 – 35 dias	2.976,60	3.000	-0,78

* valor encontrado x fator de correção do método (1,16)

** requerimento por kg de ração – Tab. Br. para Aves e Suínos

*** encontrado - mínimo do ideal

5. DISCUSSÃO

A validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) implica em adequar às exigências analíticas em uma série de quesitos. Estabeleceu-se os parâmetros, visando adequar a metodologia a todas as atividades, equipamentos, solventes e infra-estrutura disponíveis neste laboratório. Objetivou-se estabelecer e validar um método econômico, prático e confiável, para posterior implantação na rotina laboratorial. Para tanto algumas adaptações foram fundamentais na metodologia preconizada.

Embora exista na literatura científica internacional, citações do emprego da fase cromatográfica normal com resultados muitos satisfatórios, optou-se testar a fase cromatográfica reversa na determinação de vitamina A neste estudo. Esta escolha foi feita com o objetivo de adequar a metodologia de análise de vitamina A aos equipamentos e fase cromatográfica existentes no laboratório. A opção pela fase reversa pode-se atribuir ao fato de que este laboratório apresenta como rotina analítica métodos para quantificação de micotoxinas e aminoácidos, os quais empregam a fase cromatográfica reversa. A utilização da fase cromatográfica normal implicaria na aquisição de uma fase estacionária de constituição diferente das demais empregadas na fase reversa. As fases móveis empregadas na fase cromatográfica normal apresentam um custo mais elevado e uma maior toxicidade, quando comparadas com as fases móveis utilizadas na fase cromatográfica reversa. Outro fator levado em consideração foi de que a fase cromatográfica reversa utilizada neste trabalho apresenta comprovação científica da sua eficiência e precisão para análise vitamínica.

Com relação ao eficiente processo de extração deste método que permite recuperar a vitamina A do substrato analisado, atribui-se à alguns pontos críticos como a utilização de condensadores com circulação de água refrigerada, acoplados aos tubos de ebulição para evitar perdas de vitamina A através da evaporação com os solventes empregados. Além disso, a substituição do solvente (hexano) empregado para extração da vitamina A, pelo solvente utilizado na fase móvel da cromatografia (metanol) devido a incompatibilidade do hexano com as condições cromatográficas empregadas, representou um avanço significativo por proporcionar uma economia através da otimização das condições cromatográficas já

existentes. Para a execução desta atividade sem que houvesse perdas da vitamina A, o emprego de um sistema de secagem a vácuo com nitrogênio foi fundamental para manter as concentrações da vitamina A nas soluções de extração.

5.1. Validação da metodologia

5.1.1. Curva de calibração da vitamina A

O método para determinação da vitamina A apresentou boa linearidade, com um coeficiente de correlação (r) igual a $r = 0,9995$ (Figura 2) para as concentrações de 0,47 – 9,5 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado expressa a linearidade da resposta do sistema cromatográfico, quando avaliado com detector UV/VIS.

5.1.2. Determinação dos limites de detecção (LD)

O limite de detecção é determinado através da injeção da solução analítica, capaz de proporcionar um pico perfeitamente detectável, em detector de UV / VIS. O LD encontrado para o método foi de 0,095 $\mu\text{g/mL}$. Para Collins & Chow (1984), o limite de detecção mais baixo para retinol em plasma foi encontrado em torno de 0,5 ng, sendo que a concentração de retinol em plasma pode ser medida com amostras de 5 μL ou mais.

Pelo método de Rodriguez-Amaya et al. (1988) pode-se conseguir a separação e quantificação de todas as pró-vitaminas, mesmo aquelas presentes em pequenas quantidades em alimentos com limite de detecção de 0,04 $\mu\text{g/g}$. Quian & Sheng (1998) usaram a mesma técnica de extração, mas empregaram condições cromatográficas diferentes. Segundo estes autores, o limite de detecção para vitamina A foi de 10 ng/g em amostra de ração.

Stefanon (2001), desenvolveu um método para determinação simultânea das vitaminas A, D₃ e E em multivitamínicos por CLAE, e o limite de detecção encontrado foi de 0,007 $\mu\text{g/mL}$, 0,011 $\mu\text{g/mL}$ e 0,125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Marques (1999), desenvolveu um método para determinação de vitamina A por CLAE em multivitamínicos utilizados para alimentação animal, o qual possibilitou a detecção de pequenas concentrações de retinol, 0,0097 ng.

5.1.3. Determinação dos limites de quantificação

O LQ encontrado em amostras com partículas desuniformes para vitamina A foi de 0,24 µg/mL. Lopez et al. (2005) desenvolveram e validaram metodologia para quantificação de vitamina A em leite. Os autores utilizaram saponificação com hidróxido de potássio/etanol e após extração com hexano. Segundo Lopez et al. (2005) em amostras de leite analisadas o limite de quantificação é de 0,025 µg/mL. Já Stefanon (2001), encontrou como limite de quantificação de vitamina A em multivitamínicos 0,03 µg/mL. Marques (1999), obteve de seu método o limite de quantificação de 10,62 µg/mL. Segundo a autora o limite de quantificação do seu método foi superior aos demais métodos de determinação de vitamina A, porque na maioria das determinações realizadas possuem o sangue como substrato.

5.1.4. Determinação do coeficiente de recuperação

O coeficiente de recuperação nas amostras de multivitamínicos, no qual o veículo fortificado com padrões de vitaminas era composto por partículas desuniformes de casca de arroz (Aderex), obteve-se uma recuperação média de 82,46 %, 85,80 % e 89,70 % para as concentrações de 0,95 µg/mL, 2,38 µg/mL e 4,75 µg/mL, respectivamente. A recuperação média do método foi de 85,98 %, o que segue as normas internacionais de desenvolvimento de métodos analíticos, onde o coeficiente de recuperação deveria ficar entre 70 a 120 % para analitos com concentração conhecidas.

Quando Marques (1999) avaliou a recuperação de seu método (percentual da vitamina recuperada de amostra fortificada com padrão *all-trans* retinol), encontrou em média 72,5 %, nas concentrações utilizadas. A baixa recuperação do método analítico atribui-se ao sistema de extração de vitamina A empregado. A autora utilizou pouca quantidade de ácido ascórbico (0,1 g) na amostra, produto este fundamental para evitar a oxidação da vitamina A durante o processo de extração. Também, durante o processo de extração, não foi empregado sistema de condensadores com circulação de água refrigerada, adaptados aos tubos em ebulição, o que evita a perda por evaporação da vitamina A.

O coeficiente de recuperação registrado por Quian & Sheng (1998), para vitamina A foi de 87,2%. Lopez et al. (2005), obtiveram um coeficiente de recuperação em seu método de 83,8% para quantificação de vitamina A em leite. Este último autor demonstra que durante o processo de extração, o emprego da saponificação e hidrólise pode ser utilizado, mesmo quando a amostra for líquida.

Para Stefanon (2001), o coeficiente de recuperação em amostras de cascas de arroz fortificadas com soluções analíticas de vitamina A foi de 86,25 %. A autora empregou uma metodologia de extração diferente, porém as mesmas condições cromatográficas empregadas no presente trabalho.

5.1.5. Repetitividade do método

Para Leite (2002), a repetibilidade é um parâmetro estatístico considerado aceito quando os critérios de avaliação do sistema apresentam uma variação máxima de 2 %. Portanto, o presente método apresentou uma repetitividade considerada satisfatória, dentro dos limites permitidos para as concentrações utilizadas. O desvio padrão relativo (DPR) médio do método foi de 3,90 e o coeficiente de variação médio de 1,52 %. Considerando que a repetitividade se refere à precisão do método e é maior quanto menor for o coeficiente de variação dos resultados, neste trabalho, os resultados obtidos foram adequados para o processo de validação de metodologia analítica. Lopez et al. (2005), obtiveram em seu método um desvio padrão relativo igual a 9,0, e 3,4 % de coeficiente de variação para quantificação de vitamina A em amostras de leites analisadas no mesmo dia. Cabe ressaltar que a homogeneidade da matriz líquida (leite) em relação a matrizes sólidas (veículos de “premixes”) facilita de alguma forma a obtenção de resultados mais coesos.

Marques (1999), concluiu que a repetitividade de seu método foi satisfatória, quando o desvio padrão relativo médio das concentrações utilizadas no processo de validação foi de 2,5. Já Stefanon (2001), trabalhando com a fortificação de partículas desuniformes (Aderex) com soluções de vitamina A em diferentes concentrações, encontrou um C.V. de 3,15 % na quantificação de vitamina A. Moreno & Salvado (2000), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar vitaminas A, E e D₃ simultaneamente, encontraram um coeficiente de variação que variou entre 1,5 – 5,7 %, em análises realizadas em dias diferentes.

5.2. Avaliação da eficiência da metodologia

5.2.1. Quantificação de vitamina A em amostras comerciais de “premixes” utilizados em rações animais

Para a verificação do método de análise de vitamina A, adaptado e validado às nossas condições laboratoriais, foram analisadas quinze (15) amostras de “premixes” fornecidas por agroindústrias brasileiras, as quais seriam destinados à alimentação de aves e suínos. De acordo com os resultados encontrados na Tabela 7, observa-se que 4 (26,67 %) das amostras de “premixes” analisadas apresentaram valor abaixo do esperado. Entre as 15 amostras analisadas, 6 (40,0 %) dos “premixes” apresentaram valores de vitamina A acima da concentração desejada. Somente 5 amostras (33,33 %) apresentaram valores de vitamina A dentro dos parâmetros de mínimo e máximo preconizados para alimentação de aves e suínos deste País. Estes resultados obtidos de quantificação de vitamina A, demonstram que mais de 65,0 % das formulações de rações das maiores agroindústrias brasileiras, encontram-se fora dos requerimentos ideais para aves e suínos. Isto significa dizer que baseado nestes resultados, mais de 23,0 % da avicultura e 13,0 % da suinocultura brasileira estão expostos a distúrbios por deficiência ou excesso de vitamina A. Importantes perdas zootécnicas e ou econômicas poderão estar ocorrendo nestas empresas. A gravidade será de maior ou menor impacto, dependendo da idade dos animais, tempo de exposição e dose de vitamina A fornecida. Segundo, Sahin et al. (2002), quando submeteram frangos de corte com suplementação de vitamina A na dose de 15.000 UI/kg e estresse calórico, durante 42 dias, observaram sinais de intoxicação através do aumento das concentrações de ferro, zinco, cobre e cromo no soro sanguíneo e fígado. Latshaw (2002), quando estudou o efeito da vitamina A no sistema imune das aves, observou que deficiência de vitamina A em frangos de corte, proporcionou uma diminuição da resposta celular imune (linfócitos T). Suínos quando submetidos a retirada total de suplementação de vitamina A apresentaram significativa redução no crescimento e consumo. Albers et al. (2002), descrevem em seus trabalhos que a vitamina A apresenta como efeito principal a proteção dos epitélios, mas possui um efeito adicional no sistema reprodutivo e imune dos animais, quando submetidos a doses corretas.

Analisando amostras de “premixes” de sete indústrias avícolas americanas, McNaughton (1990) constatou que 100% apresentavam concentrações de vitamina A acima do valor recomendado pelo NRC (1994). Baseado nestes resultados, estas sete empresas avícolas estariam aumentando seus custos de alimentação animal. Marques, (1999), quando avaliou a concentração de vitamina A em 9 amostras de multivitamínicos encontrou um coeficiente de variação inferior a 10% entre o valor encontrado e o descrito no rótulo das embalagens dos “premixes”.

6. CONCLUSÕES

1 - As alterações realizadas na técnica de extração do método demonstraram-se eficientes e exeqüíveis, devido a sua precisão, sendo representada por um coeficiente de recuperação de 85,96%.

2 - As condições cromatográficas do método como fase móvel de MeOH:H₂O (98:2 v / v), comprimento de onda de 325 nm e temperatura de coluna de 40° C demonstraram apropriadas pela linearidade e sensibilidade apresentadas.

3 - 66,67 % dos “premixes” analisados apresentam concentrações de vitamina A fora dos requerimentos nutricionais ideais para alimentação de aves e suínos.

4 - O método demonstra-se uma importante ferramenta para controle de qualidade da nutrição de aves e suínos.

5 - Conforme os resultados obtidos neste trabalho, demonstra que é de fundamental importância a implantação de um sistema de monitoria das concentrações de vitamina A , nas fábricas de rações das agroindústrias brasileiras.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAMS, C.R. In Vitamins – The Life Essentials. Nutr. Int. NFIA, Des Moines, Iowa. 1982.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Guia para qualidade em química analítica, v.1, p.60, 2004.

AIELLO, R. Especifications for vitamin “premix” ingredientes. In: “Vitamin Nutrition Update – Seminar Series 2”. p.80, 1978.

ALBERS, N. et al. Vitamins and their biological functions. **Vitamins in Animal Nutrition**. Alemanha. 2002.Cap. 2, p. 9-31.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, (AOAC), “Official Methods of Analysis”, 15th ed., Washington, D.C., 1990, p.1068-1070.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, (AOAC), Quality assurance principles for analytical laboratories, 3rd ed, 2000.

BAIN, S.D. Biotin deficiency may alter tibiotarsal bone growth and modeling in broiler chicks. **Poultry Science**, v.67, p.590-595, 1988.

BALLA, J. **Vitaminas – Consideraciones Generales**. Capturado em 10 de Fevereiro de 2004. *on line*. Disponível em www.cspp.com.br.

BARTOV, I. Moderate excess of dietary vitamin E does not exacerbate cholecalciferol deficiency in young broiler chicks. **Poultry Science**, v.38, p.442-444, 1997.

BIOMANIA. **Vitaminas**. Capturado em 9 de Fevereiro de 2004. *on line*. Disponível em www.biomania.com.br.

BONJOUR, J.P. In **Handbook of Vitamins**. Publ. Dekker, N.Y.,1984. 195p.

BRESSOLE, F. Validation of liquid chromatographie and gas chromatographic methods-applications for pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, v.686, p.3-10, 1996.

CHASIN,A. et al., Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Ver. Farm. Bioquim.** Univ. São Paulo, v.30, n.2, p.49-52, 1994.

COLLINS, C., CHOW, C.K., Determination of vitamin A acetate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v.317, p.349-354, 1984.

COLLINS, C. et al., **Introdução a métodos cromatográficos**. 6 ed. Campinas, SP: Unicamp, 1995. 279p. Cap IX, p.183-238: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

COOPER, K. H. Revolução Antioxidante, Capturado em 10 de Fevereiro de 2004. *on line*. Disponível em www.copacabanarunners.net.

EDMONDS, M.S., ARENTSON, B.E. Effect of supplemental vitamins and trace mineral on performance and carcass quality in finishing pigs. **Journal Animal Science**, v.79, p.141-147, 2001.

GOODMAN & GILMAN'S. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9.ed., Rio de Janeiro: Mc GRAW-HILL, 1996, p.1147-1150, 1165-1178, 1436p.

HEUDI, O. et al., Simultaneous quantification of vitamins A, D₃ and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.1022, p.115-123, 2004.

HORWITZ, W. **Desing conduct and interpretation of method performance studies**, IUPAC, 1994.

HUAN, J. et al. Dietary pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids and tissue distribution of copper and vitamin A in broiler chickens. **Toxicology Letters**, v.62, p.139-153, 1992.

KATEMAN,G., BUYDENS,L. **Quality control in analitical chemistry**. 2º ed. New York: Wiley,1993.274p.

KOROKOLVAS, A., BURCKALTER, J.H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. p.783, p.657-668. parte 6.

KRAUSE, M. V. & MAHAN, L. K. **Vitaminas. Alimento, Nutrição e Dietoterapia**. 8. ed. São Paulo: ROCA, 1995. 1052 p. cap. 6, p. 77-110:

LATSHAW, J.D. Nutrition – Mechanisms of immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.30, p.111-120, 1991.

LAURIDSEN, C., JENSEN, S.K. Influence of supplementation of all-rac- α -tocopheryl acetate preweaning and vitamin C postweaning on α -tocopherol and immune responses of piglets. **Journal of Animal Science**, V.83, p.1274-1286, 2005.

LEESON, S., SUMMERS, J.D. **Nutrition of the Chicken**, 4th ed. Ontario, Canada, 2001.p.179-320.

LEHNINGER, A. L. Vitaminas e Microelementos na função de enzimas. In **Princípios de Bioquímica**. 8 ed. São Paulo: Sarvier, 1993. , p. 185-202: Cap. 10

LEITE, F. **Validação em análise química**, 4º ed. São Paulo: Atomo, 2002, cap.13-14 p.53-69.

LOPEZ, L.B. et al., Development and validation of an HPLC method for the quantification of vitamin A in human milk. Its application to a rural population in Argentina. **Arch Latinoam Nutr**, V.55, p.140-143, 2005.

MAHAN, L.K., ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 9 ed., São Paulo: Roca LTDA, 1998, p.78-94, p.1177.

MARQUES, R.R. **Controle de qualidade de vitamina A em multivitamínicos para rações animais utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.** 1999. 86p.Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêutica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 1999.

MAVROMCHALIS, I. et al. Effects of omitting vitamin and trace mineral “premixes” and (or) reducing inorganic phosphorus additions on growth performance, carcass characteristics, and muscle quality in finishing pigs. **Journal Animal Science**, v.77, p.270-278, 1999.

Mc NAUGHTON, J.L., MURRAY, R. Effect of 25-hydroxycholecalciferol and Vitamin D₃, on phosphorus requirement of broilers. **Poultry Science** (in press). Presented at the Southern Poultry Science Meeting. Atlanta, B.A., 1990.

Mc. DOWELL, L.R. Vitamins in Animal Nutrition. Publ. Academic Press, N.Y. 1989.

MILLER, J.C., MILLER, J.N. Statistics for analytical chemistry, 4^o ed., Ellis Horwood, 1998.

MORENO, P. SALVADÓ, V. Determination of eight water and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 870, p.207-215, 2005.

PAIXÃO, J. A., STAMFORD, T. L. M. Vitaminas Lipossolúveis em Alimentos – Uma Abordagem Analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 96-105, 2004.

PARRISH, D.B., PATTERSON, K. Effects of grinding and storage for one month on retention of vitamin A in “premixes” and mineral supplements. **J. Assoc. off Anal Chem**, v.66, p.1306-1308, 1983.

PATEL, S.L., MCGINNIS, J. The effect of vitamin B₁₂ on the tolerance of chicks for high levels of dietary fat and carbohydrate. **Poultry Sci**, v.59, p.2279, 1980.

PESCE, A.J. & KAPLAN, L.A. **Química Clínica: Métodos.** 1 ed. Buenos Aires: Panamericana, 1990. 1830p.p.562-568: cap.72.Vitamina A.

QUIAN, H., SHENG, M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A,D and E and pro-vitamin D₂ in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. **J. Chromatography A**, v.825, p.127-133, 1998.

RICKER, R., SCHELLENBERGER, T. **Rapid analysis of water-soluble vitamins with extraction from cat food.** Agilent Technologies, 2002.

RIZZOLO, A., POLESELLO, S. Chromatographic determination of vitamins in foods. **Journal of chromatography** , v. 624, p.103-152, 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 5, p. 191-225, 1989.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais.** 2 ed. Viçosa (UFV). Minas Gerais. Departamento de zootecnia, 2000. p. 47-49.

SAHIN, K., et al. Effects of vitamins E and A supplementation on lipid peroxidation and concentration of some mineral in broilers reared under heat stress (32°C). **Nutrition Research**, v.22, p.723-731, 2002.

SHA, V.P. et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetics studies. **Pharm. Res.**, v.9, n.4, p.588-592, 1992.

SHURSON, J. and JOHNSTON, L. Swine nutrition and health connections examined. **Nutrition and Health/Swine**, p. 22-24, 1998.

STEFANON, E.B.C. **Determinação simultânea das vitaminas A, D₃, E e da vitamina K₃ em multivitamínicos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêutica) – Universidade Federal de Santa Maria, 2001.

TAYLOR, J.K. Quality assurance of chemical measurements. **Anal. Chem.**, v.53, n.14, p.1588-1596, 1981.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP 28). THE NATIONAL FORMULARY (NF 23) (2004). **The United States Pharmacopeia Convention Inc.** 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852. p.2353-2354.

VALENTE, A. et al., **Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência**. Quimica nova, julho, p.103-109, 1983.

WISS, R. Chromatography of retinoids. **Journal of Chromatography**, v. 531, p. 481-508, 1990.

ZHUGE, G., KLOPFENSTEIN, C.F. Factors affecting storage stability of vitamin A riboflavin e niacin in a broiler diet "premix". **Poultry Science**, v.35. p.65-987, 1986.