



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição

Determinação e padronização da vitamina E e seus isômeros: comparação entre o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o método espectrofotométrico por redução de íons cúpricos.

Tese de Mestrado em Ciência da Nutrição
Área de concentração: Nutrição Aplicada a Tecnologia de Alimentos
Linha de Pesquisa: Bioquímica Nutricional de Lípidos

PARECER

Andréa Scabora Boix Caro
Zootecnista

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **André Scabora Boix Caro**, aprovada pela Comissão Julgadora em 11 de novembro de 2002.

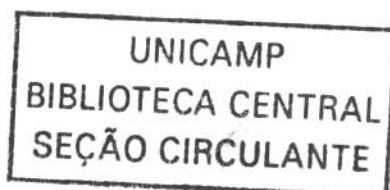
Prof.Dr. Admar Costa de Oliveira
Orientador

Campinas, 11 de novembro de 2002.


Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Presidente da Banca

Campinas – São Paulo
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



UNIDADE BC
 Nº CHAMADA 117 UNICAMP
C22d
 EX
 COMBO BC/ 51914
 PROC. 16-837-0
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA
 Nº CPD

CM00176269-7

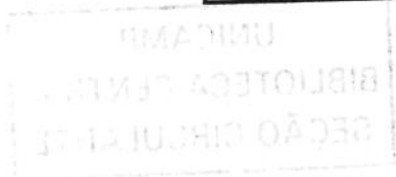
BIBID - 275742

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

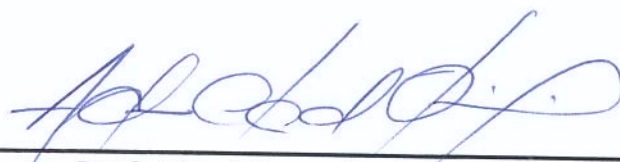
C22d Caro, Andréa Scabora Boix
 Determinação e padronização da vitamina E e seus isômeros: comparação entre o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o método espectrofotométrico por redução de íons cúpricos / Andréa Scabora Boix Caro. - Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Admar Costa de Oliveira
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

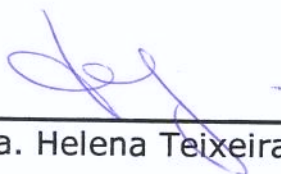
1.Vitaminas. 2.Espectrofotometria. 3.Antioxidantes. 4.Tocoferol. 5.Cromatografia líquida de alta eficiência. I.Oliveira, Admar Costa de. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.III.Título.



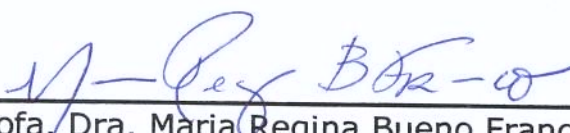
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
(Orientador)



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
(Membro)



Profa. Dra. Maria Regina Bueno Franco
(Membro)

Prof. Dr. Jayme Amaya-Fárfan
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA pela sua orientação prestada e pelo incentivo permanente na realização deste meu trabalho acadêmico.

À Dra. SOELY MARIA PISSINI MACHADO REIS, amiga e técnica do Laboratório de Lípidos que, com segurança e dedicação, possibilitou a análise das amostras, contribuindo com inúmeras sugestões para a concretização deste Programa de Mestrado.

Ao Sr. FRANCISCO CARRARO, técnico do Laboratório de Instrumentação, que com sua experiência e dedicação ao trabalho permitiu as alterações necessárias ao método de análise em cromatografia, com isto introduzindo novas adaptações e permitindo análises rápidas e precisas. Muito obrigada.

À Sra. MARIA SUZANA CORRÊA ALVES DA CUNHA, técnica do Laboratório de Ensaaios Biológicos pela sua ajuda, que com sua experiência evitou erros e problemas na condução do ensaio biológico.

À FLÁVIA QUEIROGA ARANHA DE ALMEIDA, amiga e companheira de trabalho onde juntas pudemos realizar nossos trabalhos científicos.

Agradeço à minha família e a todos os meus amigos, Flávia Auler, Marconi Almeida, Karla Silva, Renata, Carolline Rosaneli, Ana Silvia, Vítor Negrete, Karina, Cristina, Helenice, Cristina Yoshie, Yara, Maria

Inês, Lucia, Gustavo, Márcia Braga, enfim a todos que me acompanharam nesta fase de minha vida, onde com seu apoio incondicional pude realizar o Mestrado.

Dedico este trabalho a meus pais, Vicente e Iolanda, pelo exemplo de vida e incentivo constante em cada etapa de minha vida, por mais difícil que tenha sido, o apoio nunca me faltou. A meus irmãos, cunhados e sobrinha, Vicente, Lucilliam, Lyn, Edson e Paulinha pelo carinho e atenção que me deram e ao Rogério que com amor e paciência me acompanhou nesta fase final do Mestrado e que a nossa intimidade seja cada vez maior e mais respeitada.

SUMÁRIO

Índice Geral.....	VIII
Índice de Figuras.....	X
Índice de Anexos.....	XII
Resumo	XIII
Abstract.....	XIV
Introdução.....	1
Objetivos.....	3
Revisão Bibliográfica.....	4
Materiais e Métodos.....	18
Princípios Gerais dos Métodos.....	25
Resultados	29
Discussão.....	41
Conclusões.....	50
Anexos.....	52
Referências Bibliográficas.....	63

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras.....	X
Índice de Anexos.....	XI
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XIV
1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivo Específico.....	3
3 Revisão Bibliográfica.....	4
3.1 Introdução.....	4
3.2 Mecanismo de ação da vitamina E.....	13
3.3 Fontes de vitamina E.....	14
3.4 Principais formas ativas da vitamina E.....	15
4 Material e Métodos	18
4.1 Amostras.....	18
4.1.1 Suplementos vitamínicos.....	18
4.1.2 Óleos vegetais alimentares.....	18
4.1.3 Destilado da desodorização do óleo de soja.....	18
4.1.4 Farinha de germe de trigo.....	18
4.1.5 Fígados dissecados e liofilizados de ratos	18
4.2 Equipamentos necessários para as análises.....	19
4.2.1 Para o método clássico modificado.....	19
4.2.2 Para a cromatografia líquida de alta eficiência.....	19

4.2.2.1	Método Gimeno.....	19
4.2.2.2	Método Hung.....	19
4.3	Curvas de calibração dos equipamentos	20
4.3.1	Curva de calibração para o método clássico.....	21
4.3.2	Curvas de calibração para a CLAE.....	22
4.4	Reagentes necessários para as análises.....	23
4.4.1	Reagentes necessários para o método clássico modificado.....	23
4.4.2	Reagentes necessários para o método por CLAE.....	23
4.5	Soluções necessárias para as análises.....	23
4.5.1	Soluções necessárias para o método clássico modificado.....	23
4.5.2	Soluções necessárias para o método por CLAE.....	24
5	Métodos.....	25
5.1	Método clássico por redução de íons cúpricos.....	25
5.2	Método por cromatografia líquida de alta eficiência...	27
6	Resultados.....	29
6.1	Resultados por espectrofotometria.....	29
6.2	Resultados e cromatogramas por CLAE.....	31
7	Discussão	41
8	Conclusões.....	50
9	Anexos.....	52
10	Referências Bibliográficas.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Fotomicrografia eletrônica da vitamina E	4
FIGURA 2	Estrutura química do tocoferol	16
FIGURA 3	Estrutura química dos isômeros da vitamina E tocoferóis e tocotrienóis.....	17
FIGURA 4	Curva de absorvância a 545 nm em função da concentração, para a solução de alfa-tocoferol	21
FIGURA 5	Curvas de calibração para a CLAE.....	22
FIGURA 6	Reação entre o alfa-tocoferol e a cuproína.....	25
FIGURA 7	Cromatograma padrão da vitamina E.....	31
FIGURAS 8A e 8B	Cromatogramas dos óleos de soja e milho.....	32
FIGURAS 9A e 9B	Cromatogramas dos óleos de girassol e canola.....	33
FIGURAS 10A e 10B	Cromatogramas dos óleos de gergelim e dendê misto com óleo de soja.....	34
FIGURAS 11A e 11B	Cromatogramas da gordura de côco e do óleo extraído da farinha de germe de trigo.....	35
FIGURAS 12A e 12B	Cromatogramas do destilado da desodorização do óleo de soja bruto e neutralizado.....	36
FIGURAS 13A e 13B	Cromatogramas dos suplementos de Ephynal® e Vita Gold®.....	37

FIGURA 14	Cromatograma do óleo de germe de trigo.....	38
FIGURAS 15A e 15B	Cromatogramas dos fígados liofilizados de ratos sem suplementação e com suplementação de óleo de soja por 45 dias.....	39
FIGURAS 16A e 16B	Cromatogramas dos fígados liofilizados de ratos suplementados com ômega-3 sem vitamina E e com ômega-3 com vitamina E.....	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Equipamentos necessários para as análises- para método clássico modificado.....	53
Anexo 2	Equipamentos necessários para as análises- para método Gimeno <i>et al</i>	53
Anexo 3	Equipamentos necessários para as análises- para método Hung <i>et al</i>	54
Anexo 4	Reagentes necessários para o método do clássico modificado.....	55
Anexo 5	Reagentes necessários para o método por CLAE.....	55
Anexo 6	Soluções necessárias para o método clássico modificado.....	56
Anexo 7	Soluções necessárias para o método por CLAE.....	57
Anexo 8	Procedimento analítico para o método clássico modificado para amostras de óleos vegetais, suplementos vitamínicos e DDOS.....	58
Anexo 9	Procedimento analítico para o método clássico modificado para amostras de farinha de germe de trigo e fígados liofilizados.....	59
Anexo 10	Procedimento analítico para o método por CLAE, para amostras de óleos vegetais, suplementos vitamínicos, gordura de côco e DDOS – Método GIMENO.....	60
Anexo 11	Procedimento analítico para o método por CLAE, para amostras de farinha de germe de trigo e fígados liofilizados – Método HUNG.....	61

RESUMO

A presente Tese visou estudar a determinação da vitamina E, estabelecendo uma comparação entre o método clássico modificado com um outro método de determinação, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para efeito de comparação foram utilizados cinco tipos de amostras diferentes: suplementos vitamínicos, óleos vegetais, DDOS, farinha de germe de trigo e fígados liofilizados de ratos. Os resultados encontrados nos métodos avaliados diferiram quanto ao tipo de isômero encontrado e a quantidade total da vitamina E encontrada. Pelo método clássico modificado os resultados foram em mg Tocoferóis totais/100g de amostra e não houve diferenciação quanto ao isômero. Na CLAE, houve a separação dos isômeros alfa, beta + gama e delta-tocoferóis e do acetato de alfa-tocoferol, sendo cada um deles quantificado. Para todas as amostras analisadas foram encontradas diferenças significativas em termos de tocoferóis totais como por exemplo, no método clássico modificado e pela CLAE respectivamente: óleo de girassol 68 e 1.426 mg T/100g; DDOS neutralizado 12.540 e 43.475 mg T/100g; Suplemento vitamínico Ephynal® 264 e 298.832 mg T/100g e para os fígados de ratos liofilizados suplementados com vitamina E foi 16,1 contra 68,79 mg T/100g. Ficou então evidenciado que a CLAE forneceu resultados mais completos em termos de isômeros da vitamina E, e que os métodos propostos não foram comparáveis, pois não forneceram resultados compatíveis.

ABSTRACT

The present study aimed to study the determination of the tocopherols (vitamin-E), establishing a comparison between the modified classic method of metallic ion reduction, (more particularly cupric ions, following by complexation with specific reagents and reading of the detection of tocopherols at 292 nm) with a more recent method of separation, the high performance liquid chromatography (HPLC). To attain this objective, five types of different samples had been used: vitaminic supplements, vegetables oils, by-product of the refining of the soy oil (DDOS), wheat germ flour and liophilized rats' livers supplemented or not with vitamin-E. The results found in the two methods were different depending on the type of the found isomer and on the quantity of vitamin E. The method of ions cupric reduction show results in terms of total tocopherols and do not distinguish the tocopherol isomers. In the HPLC, the separation of the isomers alpha, beta + gamma and delta tocopherols and the alpha-tocopherol acetate did occurs, being each one of them quantified. For all analyzed samples significant differences were found in terms of total tocopherols, as for example for modified classic method: sunflower oil 68 and 1426 mg T/100g; DDOS neutralized 12540 and 43475 mg T/100g; Ephynal® 264 and 298832 mg T/100g and the livers of the rats that received supplementation from the vitamin-E 16,1 against 68,79 mg T/100g. It was then concluded that high performance liquid chromatography (HPLC) allowed a more detailed and accurate analysis in terms of isomers of vitamin E and the results were not comparable with the classic method.

1 INTRODUÇÃO

A presente Tese visou estudar a determinação da vitamina E, estabelecendo uma comparação entre o método clássico modificado de redução de íons metálicos, mais particularmente íons cúpricos, e posterior complexação por reagentes específicos e leitura da absorbância dos complexos formados (o qual determina tocoferóis totais), com método moderno de separação, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A determinação de vitamina E foi realizada durante anos pelo método original de Emmerie & Engel (1938), que se tornou, por sua simplicidade e rapidez, o mais empregado durante muito tempo para a determinação de vitamina E, mais particularmente do DL-alfa-tocoferol (forma sintética do α -tocoferol). Posteriormente, Contreras-Guzmán & Strong (1982) introduziram modificações substanciais no método, que proporcionaram maior estabilidade aos complexos formados, permitindo trabalhar com vidraria comum e iluminação normal, além de apresentar uma velocidade de reação maior para o gama e delta tocoferol, sendo a determinação expressa como "tocoferóis totais".

Mais recentemente, a determinação de vitamina E vem sendo feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que é uma técnica cromatográfica que se baseia na separação físico-química de componentes de uma amostra em coluna na qual a fase estacionária pode ter um enchimento sólido de partículas de reduzidas dimensões (5-10 micra), uma fase móvel líquida que é bombeada para a coluna e

sistema de detecção contínua do eluato. A CLAE tem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade, necessitando apenas que a amostra seja solúvel na fase móvel. Como toda técnica, a CLAE tem algumas limitações: alto custo da instrumentação, alto custo de operação, difícil análise qualitativa, falta de detector universal sensível e necessidade de experiência no seu manuseio. Por outro lado, apresenta as vantagens de um menor tempo de análise, alta resolução, resultados quantitativos, boa sensibilidade, versatilidade e automatização, e por isso, a técnica tem sido cada vez mais empregada (Collins *et al.*, 1995).

As amostras para a comparação dos métodos acima citados foram os suplementos comerciais comumente utilizados como o Ephinal®, Vita★Gold e óleo de germe de trigo e diversos tipos de óleos vegetais comestíveis, como: soja, milho, canola, girassol, gergelim, dendê com óleo de soja, germe de trigo, gordura de côco; destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS) bruto e neutralizado, que é uma fonte riquíssima de vitamina E (Augusto, 1988), farinha de germe de trigo, além de fígados de ratos liofilizados suplementados com ácidos graxos ω -3 contendo ou não a vitamina E, que representariam as amostras de tecidos animais, visto que as demais amostras são alimentares. Os animais para experimentação foram ratos albinos da linhagem Wistar SPF, recém-desmamados, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas. Após período de ensaio foram abatidos e seus fígados foram dissecados e liofilizados para posterior análise.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Padronizar a metodologia de determinação de vitamina E, com vistas à obtenção de resultados mais exatos e precisos.

2.2 Objetivo Específico

Estabelecer uma comparação entre o método de determinação de "tocoferóis totais" por redução do íon cúprico, com aqueles que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Introdução

A vitamina E tem sido reconhecida como a vitamina antiesterilidade, desde sua descoberta por Evans e Bishop em 1922. Também denominada de tocoferol, a vitamina E, cuja forma mais prevalente e ativa é o alfa-tocoferol, possui um papel importante na manutenção da integridade e estabilidade das membranas biológicas, exercendo ação antioxidante eficaz.

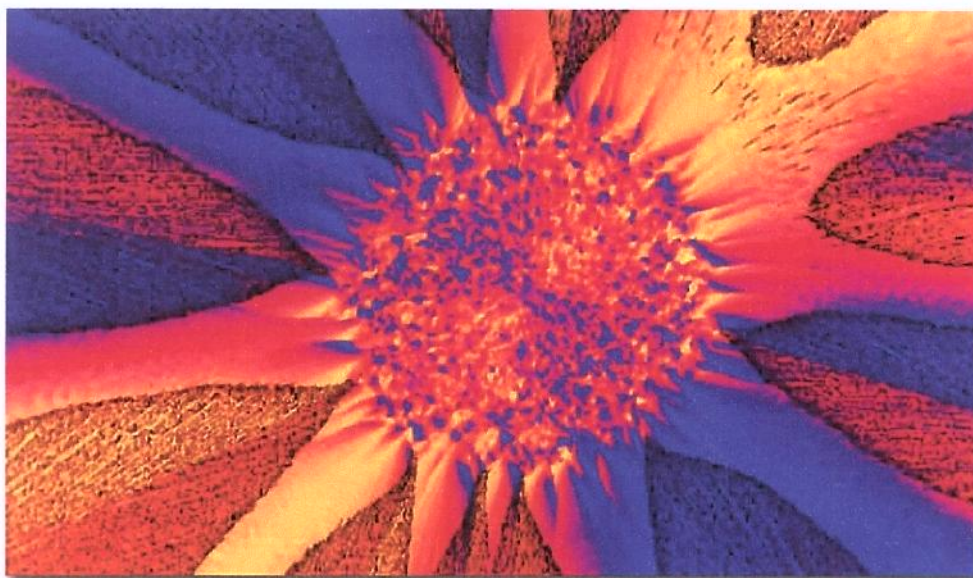


Figura 1 - Fotomicrografia eletrônica da vitamina E.

A vitamina E (Figura 1) é essencial para o crescimento e sobrevivência. Entretanto, o corpo humano não sintetiza esta vitamina, que deve ser provida pela dieta ou por um suplemento vitamínico.

A rota principal de excreção é através das fezes. O tecido adiposo, o fígado e o músculo são as principais áreas para o depósito da vitamina E. O consumo de quantidades elevadas desta vitamina aumenta seu nível em todos os tecidos. Sabe-se agora que a vitamina E sofre uma degradação muito pequena no corpo. Os produtos principais da degradação da vitamina E são quinonas e hidroquinonas do tocoferol, dímeros, trímeros e algumas substâncias solúveis.

Estudos *in vitro* mostraram que a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) somente se inicia após o estresse oxidativo haver depletado o conteúdo de antioxidante celular (Jessup *et al.*,1990). *In vivo*, é provável que a magnitude do processo oxidativo e mesmo a ocorrência ou não de oxidação de LDL (LDL-OX) dependa do balanço entre a intensidade da agressão oxidativa e a capacidade das defesas antioxidantes (Witztum ,1994).

A hipótese de que a peroxidação lipídica desempenha importante papel na patogênese da aterosclerose despertou crescente entusiasmo sobre o uso de antioxidantes como agentes antiaterogênicos. Os antioxidantes mais investigados, tanto em experimentação animal, como no homem, têm sido o alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (precursor da vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), flavonóides e probucol. A vitamina E é o antioxidante lipossolúvel predominante nos tecidos e nas LDL (Esterbauer *et al.*,1989). Estudos laboratoriais demonstraram que a vitamina E é um antioxidante extremamente potente, que captura os radicais peroxila, interrompendo a cadeia de peroxidação lipídica. Protege os lípidos poliinsaturados da lesão pelos radicais livres e parece essencial à proteção das lipoproteínas circulantes e ao funcionamento adequado das

membranas celulares. Adicionada ao plasma, a vitamina E aumenta a resistência das LDL e da Lp (a) à oxidação (Esterbauer *et al.*,1991). A LDL em seu estado natural não é formadora de placas de aterosclerose. A LDL para se tornar aterogênica, deverá sofrer a ação dos radicais livres e ser peroxidada. Além de prevenir a peroxidação lipídica, a vitamina E parece exercer outros efeitos nos fatores de risco cardiovasculares. Reduz a adesão e a agregação plaquetária (Steiner,1991), inibe os fatores de coagulação dependentes de vitamina K pela porção oxidada da vitamina E2-quinona (Dowd & Zheng,1995), bem como a estimulação da produção de endotelina e atenua a inibição da produção de óxido nítrico mediada pela LDL-OX (Boulanger *et al.*, 1992). Uma propriedade da vitamina E, compartilhada pelo probucol, é a inibição da secreção de interleucina-1 (IL-1) pelos monócitos, inibindo a proteína quinase C, enzima importante nos eventos precoces da ativação celular (Jackson *et al.*,1993). IL-1 está envolvida na proliferação de células musculares lisas e na diferenciação de monócitos, e seus níveis estão acentuadamente aumentados nas lesões ateroscleróticas (Ross,1993).

A vitamina E ingerida requer solubilização intestinal pelos ácidos biliares nas micelas mistas para que possa atravessar o meio ambiente aquoso da luz intestinal e alcançar a superfície do enterócito (Sokol *et al.*,1983). Antes da absorção intestinal, a maioria dos ésteres da vitamina E é hidrolisada pelas esterases que são ou secretadas pelo pâncreas ou encontradas na mucosa intestinal. A vitamina E é absorvida para dentro da mucosa intestinal por um processo de difusão passiva. Uma vez dentro do enterócito, α e γ -tocoferol são incorporados com os outros produtos da digestão lipídica aos quilomícrons recém-sintetizados e das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs), e são

transportadas através dos canais linfáticos mesentéricos e do ducto torácico para dentro da circulação sistêmica. Chegando ao sangue, a vitamina E é transportada predominantemente nas lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL e LDL). Os tocoferóis α e γ que permanecem nos resíduos dos quilomícrons são transportados para o fígado. No fígado, o alfa-tocoferol é secretado novamente como um componente das VLDLs de derivação hepática e talvez como lipoproteínas de alta densidade (HDLs). O gama-tocoferol é metabolizado ou excretado pelo fígado. A proteína hepática fixadora do tocoferol (TBP- *tocopherol-binding protein*) parece desempenhar algum papel no processo de discriminação hepática, pelo qual o alfa-tocoferol é incorporado dentro das lipoproteínas e o gama-tocoferol não. A distribuição da vitamina E aos tecidos periféricos envolve a hidrólise dos quilomícrons pela enzima lipase-lipoprotéica e ligação do LDL ao receptor celular (Traber & Kayden, 1984).

Alguns estudos em animais mostraram que a vitamina E pode também inibir a progressão da aterosclerose (Simon, 1992; Verlengieri & Bush, 1992). Em cobaias alimentadas com colesterol, o grupo que recebeu suplemento dietético de vitamina E desenvolveu lesões ateroscleróticas em menor número, quando comparado com o grupo controle (Quiao *et al.*, 1992). O exame histoquímico das aortas indicou que os animais do grupo controle, em comparação com os tratados com vitamina E, tinham concentração de proteoglicanas aumentada, glicocálix reduzido na superfície endotelial e aumento da permeabilidade endotelial. Como o glicocálix é responsável pelas propriedades de superfície das células endoteliais, essas alterações podem ser consideradas pró-aterogênicas, pois induzem à retenção de LDL na parede arterial (Elinder & Walldius, 1994).

Em primatas, a suplementação de vitamina E associou-se à redução da progressão das lesões ateroscleróticas da carótida, num período de três anos, embora sem alterar a histologia das lesões (Gaziano *et al.*,1992). Outros experimentos mostraram redução da área de infarto do miocárdio (IM) em coelhos alimentados com altas doses de vitamina E por 10 dias (Axford-Gatley & Wilson, 1991), e em porcos que receberam o produto por via endovenosa, sete dias antes da indução da isquemia (Klein *et al.*,1989). Em contraste, num modelo canino de isquemia-reperfusão, embora a vitamina E houvesse prevenido as arritmias letais associadas à isquemia e reperfusão, a área de infarto nos animais tratados com vitamina E foi maior do que nos animais controle (Sebbag *et al.*,1994). Embora existam evidências de que a vitamina E, em dose adequada, reverta a disfunção endotelial e reduza a porcentagem da área de aterosclerose da aorta de coelhos hipercolesterolêmicos, doses elevadas agravariam estas situações. Um ponto, entretanto, que merece melhor elucidação, é a falta de correlação entre a redução da peroxidação lipídica das partículas de LDL quando da administração de vitamina E e a prevista melhora da função endotelial.

A pele possui um elaborado sistema antioxidante de defesa para lidar com o stress oxidativo induzido pelo UV. No entanto, a exposição excessiva à radiação ultravioleta pode sobrecarregar a capacidade antioxidante cutânea, levando a danos oxidativos e conseqüentemente câncer de pele, imunossupressão e envelhecimento precoce. Embora seja relativamente fácil criar uma carência em vitamina E em animais, por exemplo, em coelhos e cobaias ocorre creatinúria e distrofia muscular; em aves observa-se anomalia vascular,

distrofia muscular e encefomalácia, é extremamente raro observar-se tal carência em humanos (Sgarbieri, 1987).

As síndromes carênciais foram recentemente descritas no homem e reproduziram certas lesões experimentais. Uma doença neuromuscular progressiva hipo ou arreflexia aparece aproximadamente entre 18 e 24 meses de vida em crianças com colestase prolongada. Colestase é uma síndrome clínica caracterizada pela diminuição do fluxo biliar e que pode ser causada por diferentes doenças intra e extra-hepáticas. Colestase extra-hepática resulta da obstrução de ductos biliares de maior calibre fora do fígado, enquanto que colestase intra-hepática (CIH) desenvolve-se a partir da alteração no fluxo biliar tanto em hepatócitos quanto na árvore biliar intra-hepática. Aos três ou quatro anos de idade, as crianças desenvolvem gradualmente quadro de ataxia, oftalmoplegia e neuropatia periférica, surgindo a ataxia apendicular ao redor dos seis anos de idade (ataxia é um termo médico que indica desordem ou falta de coordenação nos movimentos voluntários, contrastando com a integridade da força muscular). Entre oito e dez anos, outras alterações neurológicas adicionais, tais como ptose (queda da pálpebra, podendo ocasionar até a dificuldade de visão. Pode ser congênita ou adquirida (secundária à traumas, doenças sistêmicas ou até involucional), fraqueza muscular proximal, parestesias (sensação anormal de formigamento, ferroadas ou queimação ao toque); e pés cavos podem aparecer. Durante a colestase, elevados níveis de lípidos circulantes permitem a participação de vitamina E em sua fase não polar e ocorre um falso aumento da concentração sérica de vitamina E. Os elementos da síndrome neurológica são múltiplos: alteração periférica, com degenerescência das membranas axonais sob efeitos dos lipoperóxidos, sobretudo nas fibras do sistema lemniscal;

comprometimento muscular; comprometimento do sistema nervoso central e comprometimento retiniano (Guilland & Lequeu, 1995).

Em consumidores de dietas contendo níveis altos de ácidos graxos poliinsaturados, o requerimento de vitamina E fica aumentado. No caso de dietas pobres em proteínas, especialmente em aminoácidos sulfurados, mais particularmente a cistina, ocorre o aparecimento de necrose hepática intensa nos animais em experimentação. A deficiência de vitamina E aumenta o efeito deletério destas dietas, enquanto a adição da vitamina exerce ação preventiva da necrose. Esta necrose hepática é tão intensa que, após um período latente assintomático de 45 dias em média, os ratos desenvolvem a lesão necrótica fatal subitamente, dentro de poucas horas ou dias. No caso da suplementação com vitamina E, tanto as lesões metabólicas quanto as histológicas serão prevenidas, ainda dentro do período assintomático (Harper *et al.*, 1982; Pike & Brown, 1984). Não obstante ao exposto, o papel primário da vitamina E é interromper a cadeia de propagação de radicais livres, na fase inicial da autoxidação lipídica (Machlin & Bendich, 1987) pela doação de seu hidrogênio aos radicais livres peróxidos.

Toda atividade celular requer energia. Esta energia provém de certos alimentos que a célula obtém, como é o caso dos açúcares. A "queima" celular de açúcares em presença de oxigênio é chamada de respiração celular aeróbia. Este processo é realizado pela maioria dos seres vivos, animais ou vegetais, e fornece à célula a energia necessária às suas atividades. Esta energia é proveniente da "desmontagem" da glicose, que pode ser, simplificada, resumida na quebra gradativa das ligações entre carbonos, saindo o CO₂; e remoção dos hidrogênios

da glicose, em vários momentos do processo; e por fim sua oxidação na cadeia respiratória, com liberação de energia. Nessa cadeia respiratória, 98% do O_2 é reduzido à água. Às vezes, porém, a mitocôndria deixa escapar um elétron solitário, que é logo roubado pelo oxigênio (os 2% restantes de oxigênio). Com um elétron a mais, o oxigênio escapa - ele agora é o radical superóxido (O_2 com um elétron extra). Mas logo encontra uma enzima protetora, a superóxido dismutase, que lhe doa um de seus elétrons. Com dois elétrons a mais reagindo com o hidrogênio, a molécula se transforma na inofensiva água oxigenada, que normalmente vira água ao encontrar certas enzimas (catalase, peroxidase) e vitaminas do complexo B. Um radical livre é, portanto, uma molécula ou um átomo que possui um elétron livre em sua camada externa e, por serem instáveis e com elevada reatividade, tendem a acoplar o elétron não pareado em estruturas próximas, realizando processos de oxidação ou atuando como redutores de elétrons e, portanto, os antioxidantes (vitaminas A, C e E) diminuem este processo. Os radicais livres têm geralmente uma curta duração de vida e sua recombinação é quase imediata. Eles têm uma forte tendência para estabilizar sua órbita externa, a captar um elétron de um outro átomo ou molécula que se torna uma forma radicalar. Portanto, eles são muito reativos e difíceis de serem estudados. A principal fonte de energia das células aeróbias é a respiração celular ou a oxidação enzimática de nutrientes pelo O_2 (Hennekens & Gaziano, 1993). O resultado desta reação é a formação de H_2O conforme a reação seguinte:



Contrariamente à reação normal, um certo número de reações enzimáticas ou não podem causar transferências elétricas monovalentes, formando radicais tóxicos. Podendo ser:

- ✓ $O_2^{\bullet}$ íon superóxido;
- ✓ H_2O_2 peróxido de hidrogênio;
- ✓ $OH^{\bullet}$ radical hidroxila.

Os radicais livres são formados na mitocôndria, que pode ser considerada o motor das células. É nas mitocôndrias que a célula produz energia a partir da glicose e do O_2 . É neste processo que os radicais livres são formados imediatamente neutralizados pelas enzimas existentes dentro da mitocôndria. Essas enzimas têm vários minerais na sua composição como: ferro, manganês e selênio. No caso de deficiência na síntese dessas enzimas por falta dos minerais necessários, ou no excesso de O_2 a ser metabolizado, teremos um aumento dos radicais livres que podem escapar da mitocôndria atingindo a célula e a corrente sanguínea, sendo então combatidos pelas vitaminas antioxidantes, como a vitamina C, A, E onde o seu sítio ativo se localiza no grupo -OH na posição 6 do anel cromano (Gilligan *et al*,1994), riboflavina e por outras enzimas que têm cobre, zinco e selênio na sua composição. Os radicais livres não neutralizados pelas substâncias antioxidantes causam danos ao organismo. Várias condições causam aumento dos radicais livres: cigarro (100 mil novos radicais livres por tragada), drogas, álcool, infecções, asma, câncer, diabetes, hipoglicemia, hipertensão arterial, exercício intenso em pessoas sem condicionamento físico apropriado, stress profissional, escolar ou familiar, alimentação inadequada, poluição ambiental, radiações solares, entre outras. A ingestão adequada dos minerais e das vitaminas que atuam no sistema antioxidante do organismo contribuem para que os radicais livres permaneçam dentro dos limites fisiológicos não causando danos (envelhecimento e patologia) ao organismo (Hennekens & Gaziano,1993).

3.2 Mecanismo de ação da vitamina E.

Pela ação da enzima cicloxigenase, o ácido araquidônico (ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos, adquirido através da dieta ou da quebra do ácido linoleico, um ácido graxo essencial. É o precursor dos leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos, através da via cicloxigenase, que pode ser inibida pelo ácido acetil salicílico, indometacina e outros antiinflamatórios não hormonais, ou pela via lipoxigenase. Os derivados do ácido araquidônico têm papel importante em vários processos fisiológicos, como na reação inflamatória, agregação plaquetária, tônus e permeabilidade vascular) dá origem a várias substâncias vasoativas e geradoras de respostas sobre estas moléculas. Alguns deste compostos como a prostaglandina E2 (PGE2) desempenham ações importantes no sistema imunológico. A PGE2 suprime a produção de citocinas (proteínas secretadas pelos leucócitos que cumprem diversas funções como: inibir a replicação de vírus, ativação do complemento, etc), entre elas se encontra a interleucina. Igualmente são inibidos pela PGE2 as substâncias de proliferação de linfócitos antígeno induzida, a geração de anticorpos e a atividade citolítica da célula T. A PGE2 interfere também no sistema de sinais celulares, inibindo o fluxo intracelular do cálcio e a expressão da mensagem para a IL-2. Existem evidências que a PGE2 e outros produtos da cascata da ciclooxigenase, aumentam com o envelhecimento, e se têm observado em idosos um aumento da inibição proliferativa dos linfócitos na presença de PGE2. A vitamina E contribui, de forma especial, para a estabilização das membranas lisossomiais, mitocondriais e dos capilares e, conseqüentemente, para a manutenção da resistência normal dos eritrócitos. Ainda baseada nessa ação, a vitamina E promove um aumento da atividade fagocitária. A vitamina E intervém em diferentes fases da síntese do ácido araquidônico e,

portanto, atua no metabolismo das prostaglandinas e com isto ela pode contratacar estas ações já que sua função antioxidante reduz a formação de hidroperóxidos que constituem o substrato da ciclooxygenase. Outro mecanismo de ação da vitamina E consiste na proteção das membranas e componentes citoplasmáticos das células por inibição não enzimática da lipoperóxidação (Machlin & Bendich, 1987).

3.3 Fontes de vitamina E.

A vitamina E é encontrada principalmente em plantas e, em altas concentrações, em sementes oleaginosas como soja, algodão, milho e girassol, e no germe de trigo. Os tecidos animais, bem como frutas e hortaliças em geral, contém pequenas quantidades da vitamina. Uma fonte não convencional e de notável conteúdo de vitamina E é o destilado da desodorização do óleo de soja, obtido no processo de refino do óleo, também conhecido por DDOS. Na verdade, o DDOS consiste de uma mistura complexa de ácidos graxos livres, acilgliceróis, aldeídos insaturados de elevado peso molecular, hidrocarbonetos, esteróis, lípidos oxidados não identificados, além de todos os isômeros do tocoferol (Naudet & Cecchi, 1970). Devido ao alto conteúdo de tocoferóis totais, de 8,5 a 12,4% (Augusto, 1988), sendo que no Laboratório de Lípidos do DePAN/FEA da Unicamp, tem-se encontrado teores que vão de 5,8 a 9,9%, o DDOS já vem sendo estudado no sentido de ser utilizado como antioxidante natural em alimentos (Hassan El-Mallah, 1990).

3.4 PRINCIPAIS FORMAS ATIVAS DA VITAMINA E

Os compostos que compreendem o grupo da vitamina E dividem-se em duas classes distintas, ambas derivadas de um anel cromanol. A primeira série, os tocoferóis, derivam do tocol (2-metil-2-(4,8,12-trimetiltridecil) cromanol (I, $R^1 = R^2 = R^3 = H$), que contém uma cadeia lateral isoprenóide saturada de 16 carbonos (cadeia de fitilo) exemplificada na Figura 2; a segunda série, os tocotrienóis (2-metil-2-(4,8,12-trimetiltrideca-3,7,11, trienil) cromanol, contém uma cadeia lateral com tripla insaturação nos carbonos das posições 4, 8 e 12 da cadeia lateral. Dentro de cada série, os compostos somente diferem no número e na posição de grupos metil na estrutura anelar. Os tocoferóis são isômeros designados alfa (5, 7, 8-trimetiltocol), beta (5,8-dimetiltocol), delta (7,8-dimetiltocol) e gama (8-metiltocol) como demonstrado na Figura 3. A estrutura anelar dos tocotrienóis é similar àquela dos tocoferóis. A denominação tocoferol é derivada das palavras gregas "tokos" (parto) e "phero" (suportar a dificuldade), mas a importância biológica dos tocoferóis é muito maior do que a etimologia da palavra pode estar indicando (Pike & Brown, 1984).

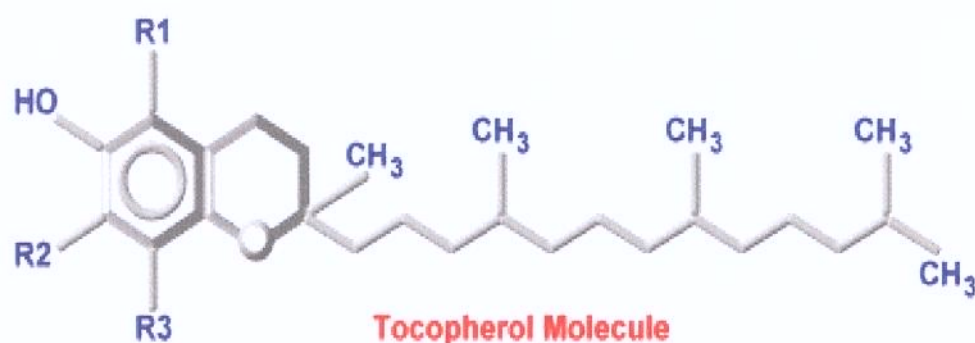
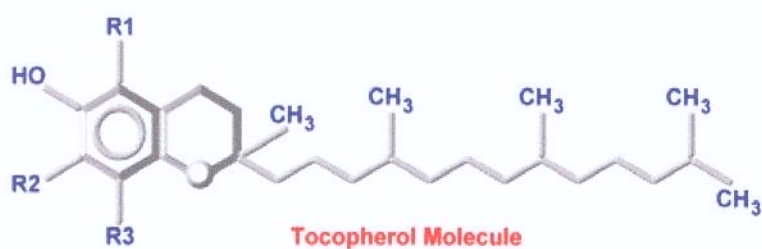


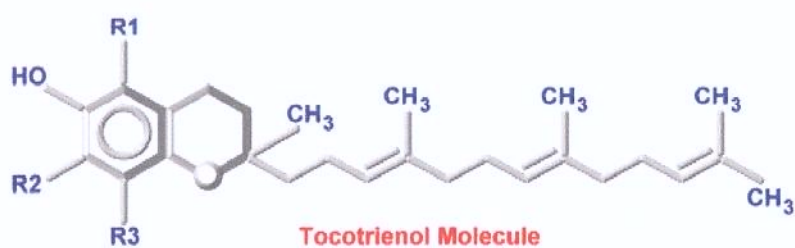
Figura 2 – Estrutura química do tocoferol.

O *RRR*- α -tocoferol é o isômero mais largamente distribuído na natureza e é o mais biologicamente ativo de todos os compostos com atividade vitamínica E. A atividade antioxidante e biológica dos vários isômeros dos tocoferóis são diferentes, sendo que o δ -tocoferol tem somente 50% da atividade antioxidante do α -tocoferol, apesar de ser a principal forma existente na dieta humana (Kayden & Traber, 1993). O β e o γ -tocoferol possuem respectivamente 40% e 10% de atividade em relação ao α -tocoferol. O γ -tocoferol existe em maior quantidade nos óleos vegetais e, conseqüentemente, é absorvida em maior quantidade do que o α -tocoferol (Sgarbieri, 1987).

A maior importância dos tocotrienóis está na inibição da biossíntese do colesterol, reduzindo o risco de radicais livres em doenças degenerativas, como potente antioxidante com propriedades multiterapêuticas na prevenção e tratamento de várias doenças e estados patológicos. A estrutura dos tocoferóis e tocotrienóis é a seguinte:

TOCOFEROL

	R1	R2	R3
alfa-tocoferol	CH₃	CH₃	CH₃
beta-tocoferol	CH₃	H	CH₃
gama-tocoferol	H	CH₃	CH₃
delta-tocoferol	H	H	CH₃

TOCOTRIENOL

	R1	R2	R3
alfa-tocotrienol	CH₃	CH₃	CH₃
beta-tocotrienol	CH₃	H	CH₃
gama-tocotrienol	H	CH₃	CH₃
delta-tocotrienol	H	H	CH₃

Figura 3 - Estrutura química dos isômeros da vitamina E – tocoferóis e os tocotrienóis.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. 1 Amostras

4.1.1 Três tipos de suplementos vitamínicos comerciais comumente utilizados, mais particularmente: O Ephynal® 400 mg – (acetato de DL- α -tocoferol), proveniente da Roche; Vit☆Gold ômega-3 EPA, proveniente do Laboratório Vitagold® e o Óleo de germe de trigo, da Bionatus Laboratório Botânico Ltda.

4.1.2 Óleos vegetais alimentares: Óleos especiais Liza®: óleo de canola com ômega-3, óleo de milho com ômega-6, óleo de girassol com vitamina E e óleo de soja; óleo de gergelim, da Indústria Alimentícia Istambul Oriente Nasser Zacharias Ankara; óleo de dendê misto com óleo de soja, da ICPA Cepêra Ltda; gordura de côco, proveniente do Refino de Óleos Brasil;

4.1.3 Destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS) bruto e neutralizado, proveniente da Granol Indústria Comércio e Exportação S/A;

4.1.4 Farinha de germe de trigo, da Pro Natura, Minori Alimentos Naturais Ltda;

4.1.5 Fígados dissecados e liofilizados de ratos Wistar suplementados com ácidos graxos ω -3, contendo ou não vitamina E.

Tanto no método por redução de íons cúpricos utilizando a espectrofotometria (método clássico modificado) como na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizados 4 lotes de cada produto com duplicata. Foram excluídos o maior e o menor valor e assim foi obtida a média das seis análises com o mesmo perfil (n=6).

4.2 EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS PARA AS ANÁLISES

4.2.1 Para o método clássico modificado

Balança analítica; espectrofotômetro; tubos de ensaio de 30 a 70 ml com tampa protegida internamente com teflon ou p.v.c.; pipetas graduadas de 1,5, 5 e 10 ml e volumétricas de 3, 5, 10, 20 e 25 ml; balões volumétricos de 25, 50 e 100 ml (ANEXO 1).

4.2.2 Equipamentos para a CLAE

4.2.2.1 Método Gimeno *et al*

CLAE; coluna C18 (4,6 mm x 25 cm); microseringa 20 μ L; Centrífuga 3000 g/ 5 min; Ependorf com 1,5 ml de volume e transparente; micro/macropipeta e filtro com poro de 0,45 μ m (ANEXO 2).

4. 2. 2. 2 Método Hung *et al*

CLAE; coluna C18 (4,6 mm x 25 cm); microseringa 20 μ L; centrífuga 10000 rpm/ 5 min; rotavapor à vácuo, temperatura do banho entre 30 - 50°C (ANEXO 3).

4. 3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS

As curvas de calibração são os mais conhecidos sistemas lineares na representação de dados experimentais. Nestes casos, os desvios da linearidade são geralmente atribuídos a efeitos químicos e físicos que não foram preliminarmente levados em conta e que se tornam agentes complicadores na análise matemática dos dados. A natureza da medida efetuada depende da técnica empregada, tal como a luz absorvida ou emitida (métodos espectrofotométricos) e a área ou altura de picos cromatográficos (métodos cromatográficos). Para a comparação entre os métodos propostos tornou-se imprescindível realizar uma curva de calibração nos equipamentos utilizados.

Não existe uma definição universal para o estabelecimento correto da faixa linear, e muito menos um procedimento sistemático bem estabelecido para sua determinação. Sua avaliação é geralmente baseada em dois parâmetros, calculados a partir dos pontos experimentais disponíveis para construção da curva: resíduos de interpolação e razões (Sinal / Massa) ou (Sinal / Concentração).

4.3.1 Curva de calibração para o método clássico modificado

Para o método clássico modificado foi realizada apenas a curva de calibração para o alfa-tocoferol, visto que no método utiliza-se como padrão apenas o alfa-tocoferol (Figura 4).

Alfa-tocoferol

Coefficiente Regressão = 0,9908

Tipo da curva: linear

$$Y = 0,0188x + 0,2949$$

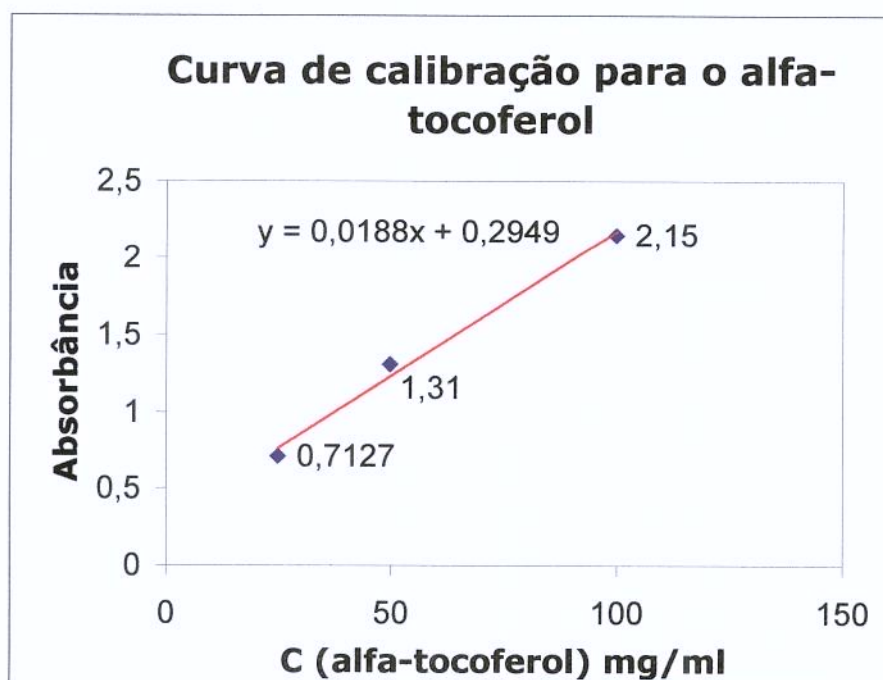
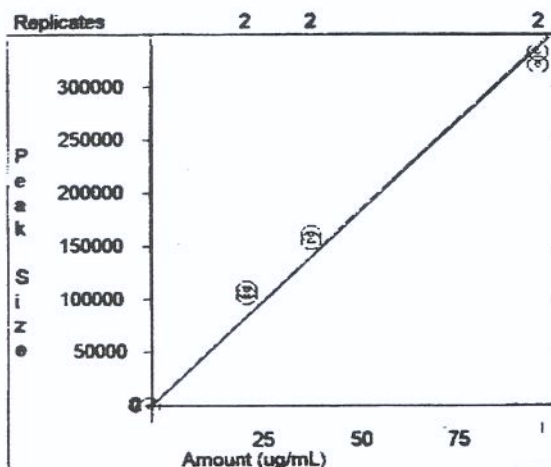


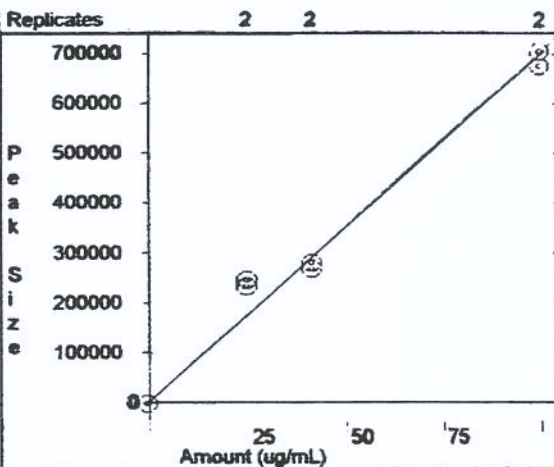
Figura 4 – Curva de absorbância a 545 nm em função da concentração, para solução de alfa-tocoferol.

4.3.2 Curvas de calibração para a CLAE

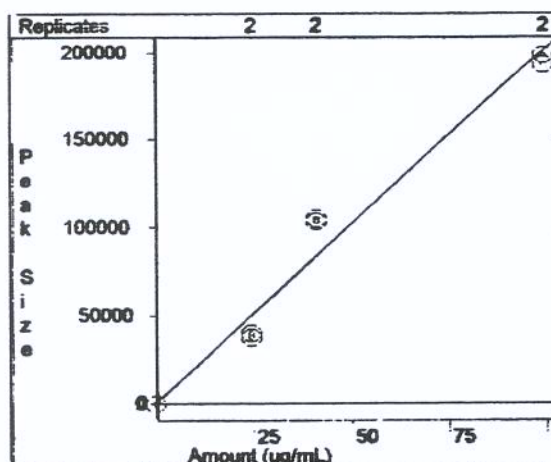
Delta-tocoferol
External Standard Analysis
Resp. Fact. RSD: 12.22%
Curve Type: Linear
Origin: Force (Edited)
Corr. Coef.(R²): 0.990061
y = +3.3940e+003x



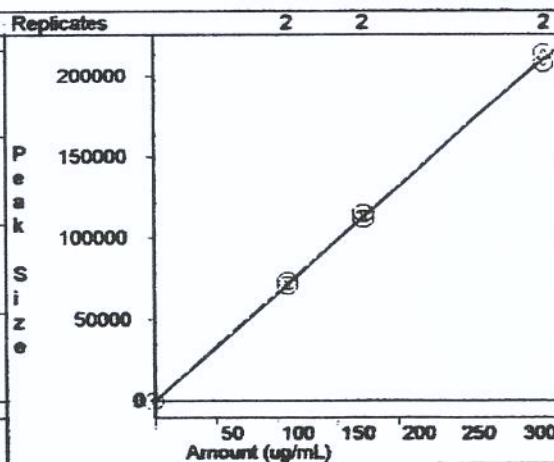
Beta-tocoferol
External Standard Analysis
Resp. Fact. RSD: 19.47%
Curve Type: Linear
Origin: Force (Edited)
Corr. Coef.(R²): 0.981057
y = +7.0162e+003x



Alfa-tocoferol
External Standard Analysis
Resp. Fact. RSD: 20.82%
Curve Type: Linear
Origin: Force (Edited)
Corr. Coef.(R²): 0.968104
y = +2.0177e+003x



Acetato
External Standard Analysis
Resp. Fact. RSD: 1.923%
Curve Type: Linear
Origin: Force (Edited)
Corr. Coef.(R²): 0.998933
y = +6.5398e+002x



Print Date: 25 Sep 2001 14:12:18

FIGURA 5- Curvas de calibração da esquerda para a direita de cima para baixo: delta-tocoferol, beta-tocoferol, alfa-tocoferol e o acetato de alfa-tocoferol, obtidas através da altura do pico em função da concentração do isômero a ser analisado (µg/mL) em uma absorvância de 292 nm.

4.4 REAGENTES NECESSÁRIOS PARA AS ANÁLISES

4.4.1 Reagentes necessários para o método clássico modificado

Solução padrão estoque *RRR* - α - tocoferol; cuproína (2'2 biquinolina)– $C_{18}H_{12}N_2$; acetato cúprico di-hidratado; uréia para análise; ácido ascórbico; hidróxido de potássio; etanol absoluto; sulfato de sódio anidro e o ácido acético glacial (ANEXO 4).

4.4.2 Reagentes necessários para o método por CLAE

Todos os solventes são de grau analítico para CLAE: Água ultrapura proveniente do sistema Milli-Q; padrões de tocoferóis com grau de pureza $\geq 95\%$ para CLAE, dissolvidos em etanol e estocados em frascos de cor âmbar numa temperatura de $-20^\circ C$; hexano; metanol e etanol absoluto (ANEXO 5).

4.5 SOLUÇÕES NECESSÁRIAS PARA AS ANÁLISES:

4.5.1 Soluções necessárias para o método clássico modificado

Solução padrão estoque *RRR* - α - tocoferol, 0.1% em heptano; solução padrão de trabalho; cuproína (2'2 biquinolina), solução a 0,5% em tolueno; acetato cúprico di-hidratado, solução a 0,5% em água destilada; uréia, solução a 2,5% em etanol absoluto; ácido ascórbico, solução a 5% em água destilada; hidróxido de potássio, solução a 50% em água destilada; hidróxido de potássio alcoólico (fazer na hora); etanol

70%; sulfato de sódio, solução a 1.25% em água destilada e etanol absoluto (ANEXO 6).

Os solventes heptano, tolueno e o etanol absoluto foram purificados com acetato cúprico para evitar interferentes na análise das amostras.

4.5.2 Soluções necessárias para o método por CLAE

Dioxano P.A. A.C.S.; isooctano (2,2,4, trimetilpentano) P.A.-A.C.S.; éter de petróleo (bp 30-60°C); acetonitrila comum; metanol para CLAE (ANEXO 7).

5 MÉTODOS

5.1 Método clássico por redução de íons cúpricos

O método é baseado na redução de íons cúpricos e posterior complexação dos íons cuprosos com 2,2'-biquinolina (cuproína) ou com 2,9'-dimetil, 4,7'-difetil, 1,10 fenantrolina (batocuproína), e tem como principal vantagem a excepcional estabilidade de ambos os complexos, o que permite trabalhar com vidraria comum e iluminação normal, além de apresentar uma velocidade de reação maior para o gama e delta-tocoferóis, sendo a determinação expressa em "tocoferóis totais". A reação entre o α -tocoferol e a cuproína (Oliveira & Reis, 2001) está demonstrada na Figura 6 a seguir:

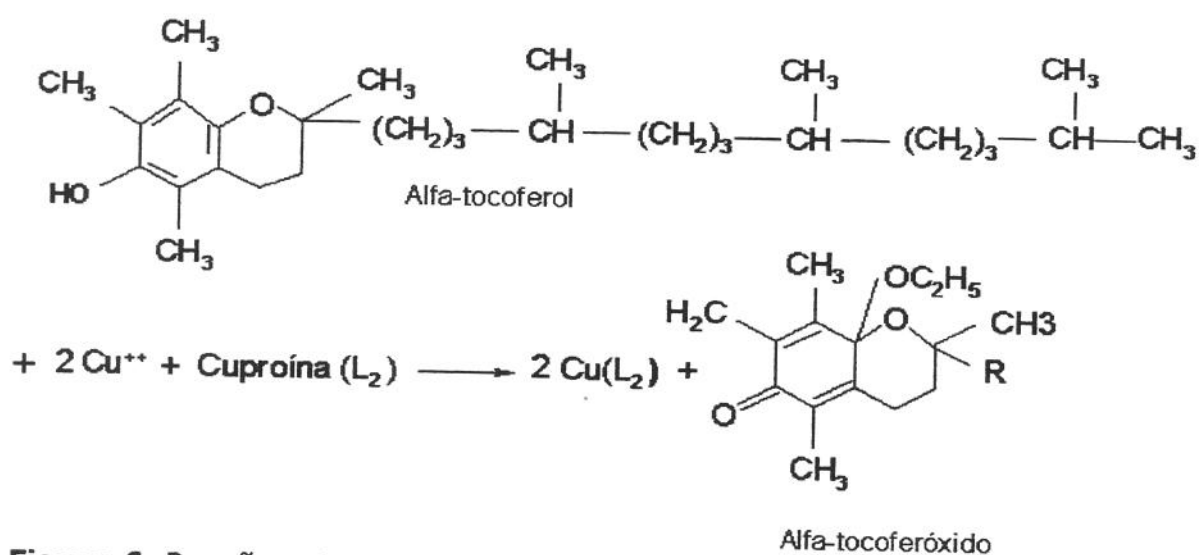


Figura 6. Reação entre o α -tocoferol e a cuproína.

O complexo Cu (L2)+ é determinado espectrofotometricamente a 545 nm (cuproína) ou a 478 nm (batocuproína). Um equivalente de tocoferol reduz dois equivalentes de cobre, ou seja, 1 mol de alfa-tocoferol reduz dois átomos de cobre e esta reação se completa em 10 segundos, assim como para beta e gama-tocoferóis, já para o delta-tocoferol a reação se completa entre 60-90 segundos. A seqüência de etapas deste método tem como objetivo eliminar a interferência das plastoquinonas e outros compostos terpênicos que apresentam alguma atividade redutora. A metodologia fica bastante simplificada, pois a determinação completa é realizada em tubos com tampa rosqueada, sendo eliminada a saponificação das amostras, condição que é absolutamente necessária nos outros métodos descritos na literatura. O espectrofotômetro utilizado foi o DU - 70 Spectrophotometer da Beckman. Os cálculos necessários para a quantificação das amostras seguem o Manual de Aulas Práticas desenvolvido no Laboratório de Lípidos do DEPAN da UNICAMP. O procedimento analíticos para as análises das amostras encontram-se no Anexo.

CÁLCULO:

$$\text{Tocoferóis totais (mgT/100g)} = \frac{\mu\text{g T totais no padrão} \times \text{Abs. amostra} \times f \text{ (mL)} \times 100}{1000 \times \text{Abs. do Padrão} \times \text{peso da amostra (g)}}$$

Onde: f (fator de diluição) = para óleos e gorduras = 25 ml

f = para farinha de germe de trigo e fígados = 10 ml

f = para o DDOS = 500 ml

5.2 Método por cromatografia líquida de alta eficiência

O método oficial da "Sociedade Americana dos Químicos de Óleos" - AOCS Official Method Ce 8-89 (AOCS, 1993) vem sendo muito utilizado para a análise da vitamina E, utilizando-se uma coluna de sílica em fase normal e detector de fluorescência. Atualmente, os métodos que utilizam fase reversa têm tido grande desenvolvimento, constituindo em mais de 70% dos procedimentos recentemente publicados.

A metodologia aplicada à análise de óleos e gorduras foi uma adaptação do método de Gimeno *et al.* (2000), que é um método direto e rápido, sem prévia saponificação, de medida de tocoferóis (α , β + γ e δ) em óleos vegetais por CLAE em fase reversa com detecção por ultravioleta (UV). Os óleos vegetais foram diluídos em hexano e uma alíquota (200 μ L) é retirada e adicionada ao metanol (600 μ L). Os tocoferóis foram detectados a 292 nm e a eluição ocorreu em menos de 8 minutos após a injeção. Foram realizadas adaptações ao método para adequação da coluna cromatográfica utilizada, fase móvel, tempo de corrida e volume de injeção. Seu procedimento analítico encontram-se no Anexo. As adaptações foram as seguintes:

	MÉTODO ORIGINAL	MÉTODO ADAPTADO
TIPO DE COLUNA	ODS-2 (4,4 mm x 15 cm)	C 18 (4,6 mm x 25 cm)
FASE MÓVEL	Metanol – água (96 + 4, v/v)	Metanol (100%)
VOLUME DE INJEÇÃO	50 μ L	20 μ L
TEMPO DE CORRIDA	6 minutos	8 minutos
SOLUÇÃO STANDARD	300 μ g/ml de acetato de α - tocoferol em etanol)	Não utilizada

A metodologia para farinha de germe de trigo e fígado liofilizado foi a mesma utilizada por Hung *et al* (1980), também com algumas adaptações a seguir e seu procedimento analítico encontra-se no Anexo:

	MÉTODO ORIGINAL	MÉTODO ADAPTADO
FASE MÓVEL	Metanol – água (90 + 10, v/v)	Metanol (100%)
ABSORB. PARA α - TOC.	280 nm	292 nm
VOLUME DE INJEÇÃO	10 μ L	20 μ L
TEMPO DE CORRIDA	25 minutos	10 minutos
COLUNA	C18 (3,9 mm x 30 cm)	C18 (4,6 mm x 25 cm)
TIPOS DE FÍGADOS	Fígados de peixes frescos	Fígados de ratos liofilizados

6 RESULTADOS

6. 1 Resultados por espectrofotometria

Para efeito de comparação os resultados por cromatografia líquida de alta eficiência foram convertidos convenientemente de mg Tocoferóis totais/100g. Foram encontrados os seguintes resultados:

Óleos vegetais:

- Óleo de canola = $62 \pm 4,3$ mg T/100g;
- Óleo de milho = $86 \pm 5,7$ mg T/100g;
- Óleo de girassol = $68 \pm 4,9$ mg T/100g;
- Óleo de dendê com óleo de soja = $83 \pm 5,7$ mg T/100g;
- Óleo de soja = $116 \pm 1,7$ mg T/100g;
- DDOS bruto = 9720 ± 490 mg T/100g;
- DDOS neutralizado = 12540 ± 2138 mg T/100g;
- Óleo extr.da farinha de germe de trigo = $30 \pm 0,35$ mg T/100g;
- Óleo de gergelim = $48 \pm 0,13$ mg T/100g e
- Gordura de côco = $16 \pm 0,88$ mg T/100g.

Suplementos vitamínicos:

- Ephynal® = 264 ± 21 mg T/100g,
- Vita Gold® = 129 ± 16 mg T/100g,
- Óleo de germe de trigo = 119 ± 16 mg T/100g;

Fígados de ratos liofilizados:

- Fígados de ratos sem suplementação = $1,4 \pm 0,2$ mg T/100g;
- Fígados de ratos suplementados com óleo de soja = $4,1 \pm 0,5$ mg T/100g;
- Fígados de ratos suplementados com ω -3 sem vitamina E = $3,4 \pm 0,2$ mg T/100g;
- Fígados de ratos suplementados com ω -3 com vitamina E por um período de 15 dias = $16,1 \pm 0,65$ mg T/100g.

6.2 Resultados e cromatogramas por CLAE

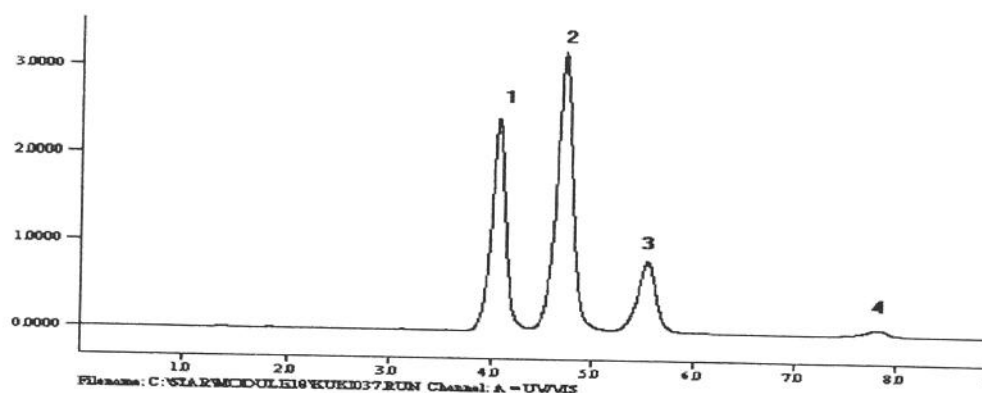


Figura 7. Cromatograma padrão da vitamina E, utilizando apenas os tocoferóis. Condições da análise: separação em fase reversa com detecção em UV 292 nm, fase móvel 100% metanol (MeOH), fluxo de 2,0 mL/min, temperatura de 45°C, coluna C18-varian (4,6 mm x 25 cm), volume de injeção de 20µL e eluição em 10 minutos.

Tabela:

Número 1 = Delta – tocoferol;

Número 2 = Gama e Beta – tocoferóis , onde ambos os isômeros possuem o mesmo tempo de retenção para esta coluna utilizada e esta fase móvel,

Número 3 = Alfa-tocoferol;

Número 4 = Acetato de alfa-tocoferol.

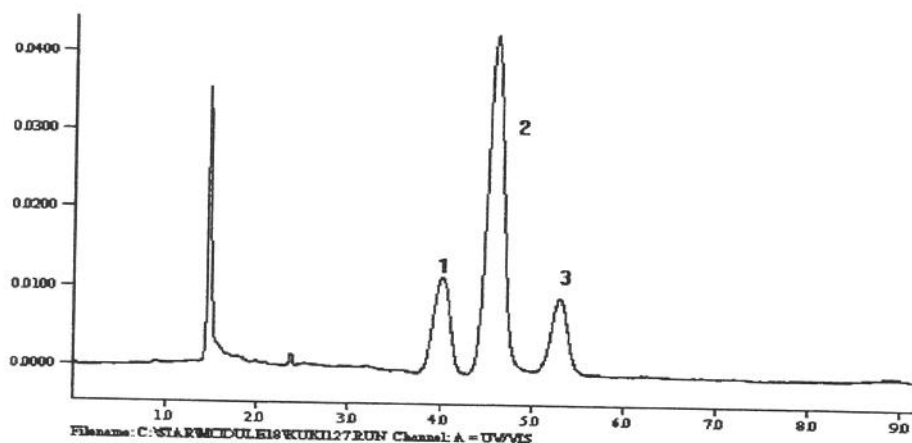
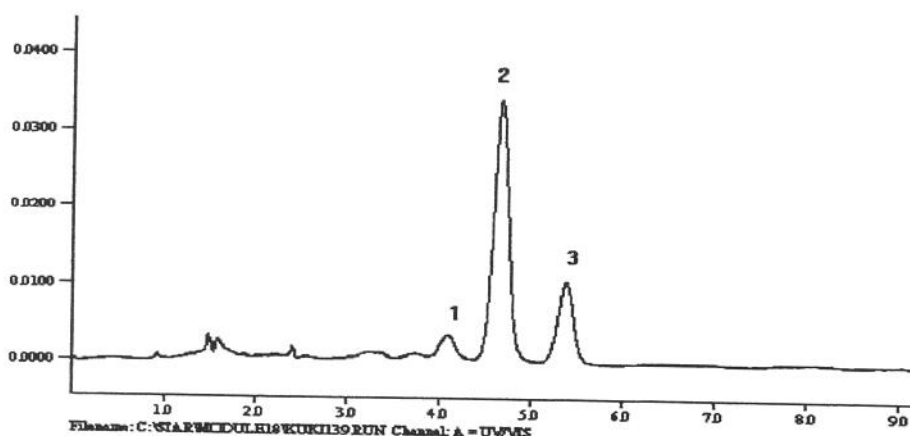
A**B**

Figura 8A e 8B- Cromatogramas dos óleos de soja (8A) e milho(8B) da marca comercial Liza®. Condições da análise: separação em fase reversa com detecção em UV 292 nm, fase móvel 100% metanol (MeOH), fluxo de 2,0 mL/min, temperatura de 45°C, coluna C18-Varian (4,6 mm x 25 cm), volume de injeção de 20µL e eluição em 10 minutos.

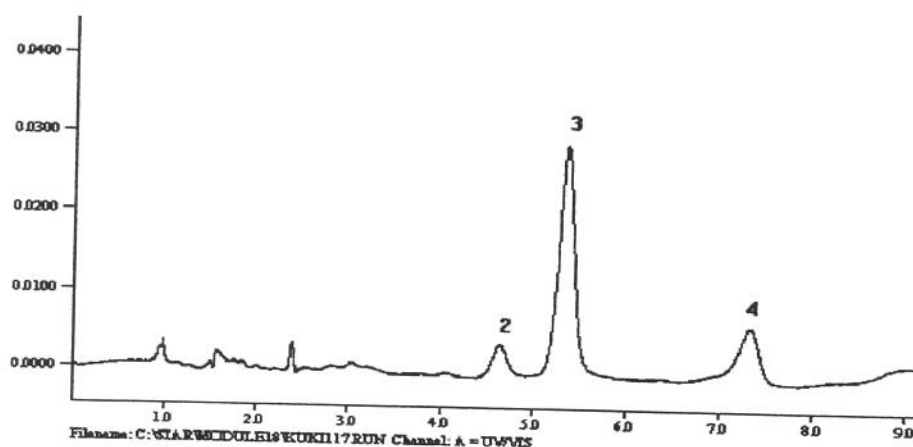
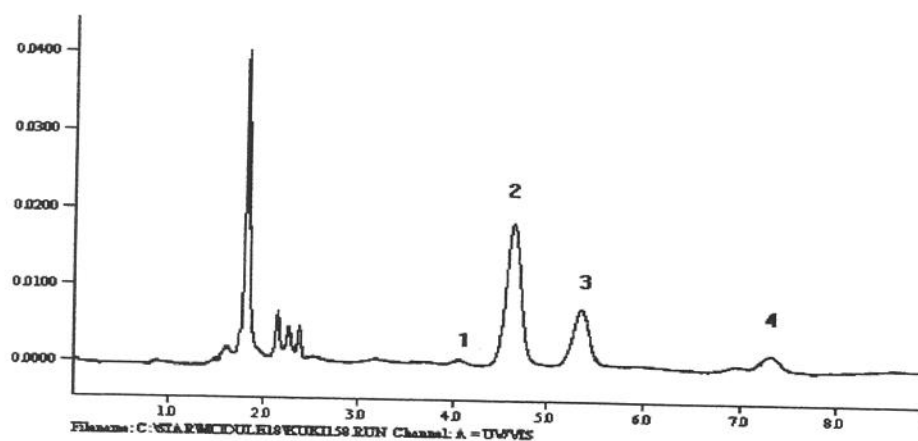
A**B**

Figura 9A e 9B - Cromatogramas dos óleos de girassol(9A) e canola (9B) da marca comercial Liza®. Condições da análise: separação em fase reversa com detecção em UV 292 nm, fase móvel 100% metanol (MeOH), fluxo de 2,0 mL/min, temperatura de 45°C, coluna C18-Varian (4,6 mm x 25 cm), volume de injeção de 20µL e eluição em 10 minutos.

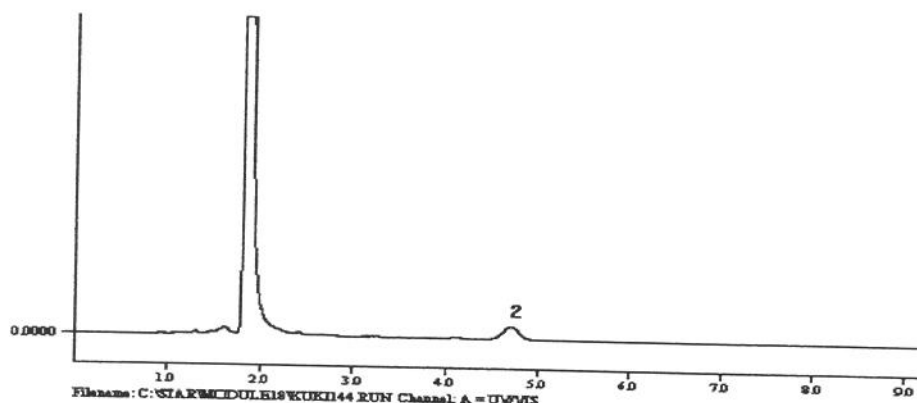
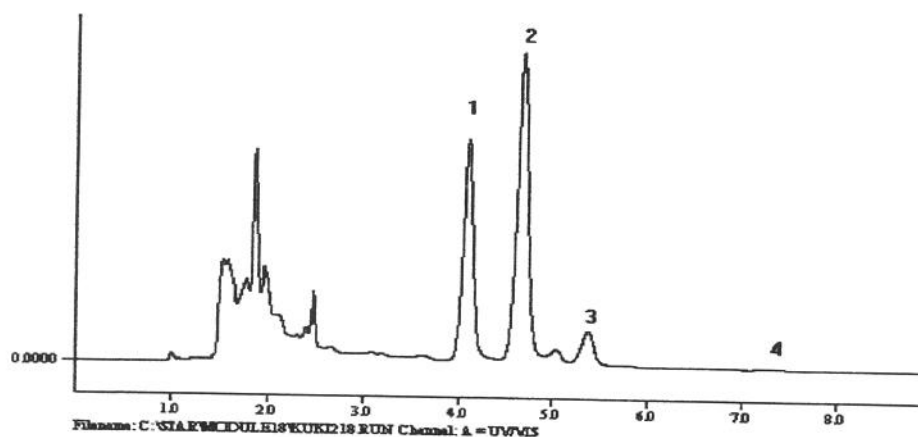
A**B**

Figura 10A e 10B- Cromatogramas dos óleos de gergelim (10 A) e de dendê misto com óleo de soja (50/50) (10 B). Condições da análise: separação em fase reversa com detecção em UV 292 nm, fase móvel 100% metanol (MeOH), fluxo de 2,0 mL/min, temperatura de 45°C, coluna C18-Varian (4,6 mm x 25 cm), volume de injeção de 20 μ L e eluição em 10 minutos.

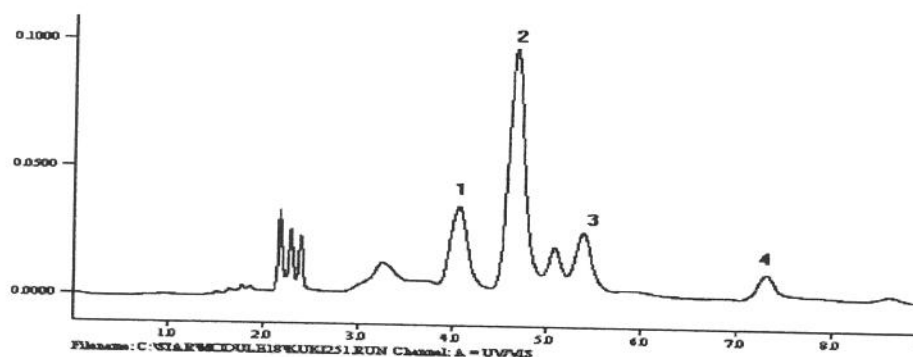
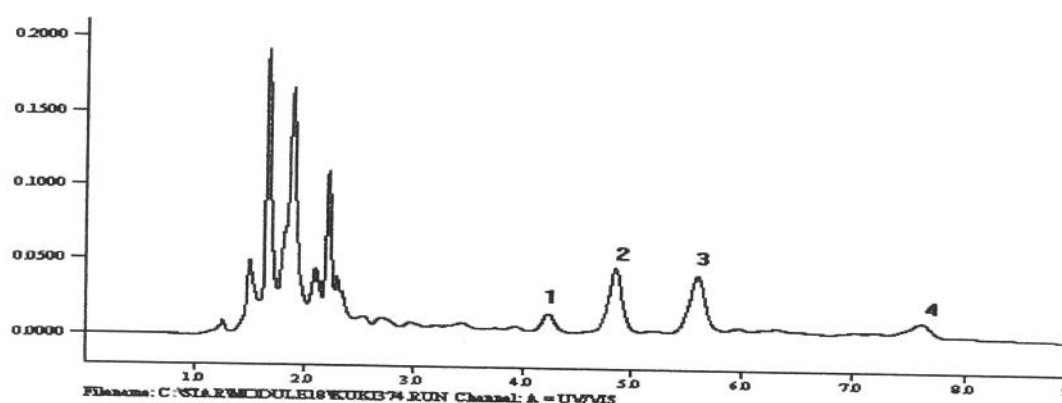
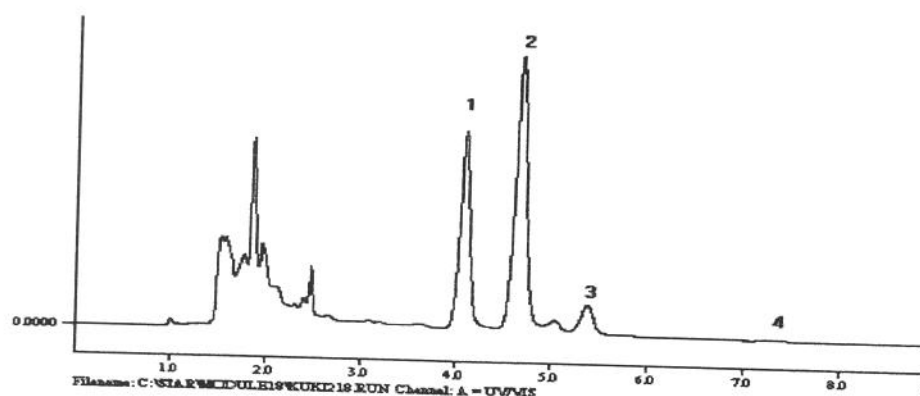
A**B**

Figura 11A e 11B - Cromatogramas da gordura de côco (11 A) e do óleo extraído da farinha de germe de trigo (11 B). Condições da análise: separação em fase reversa com detecção em UV 292 nm, fase móvel 100% metanol (MeOH), fluxo de 2,0 mL/min, temperatura de 45°C, coluna C18-Varian (4,6 mm x 25 cm), volume de injeção de 20 μ L e eluição em 10 minutos.

A



B

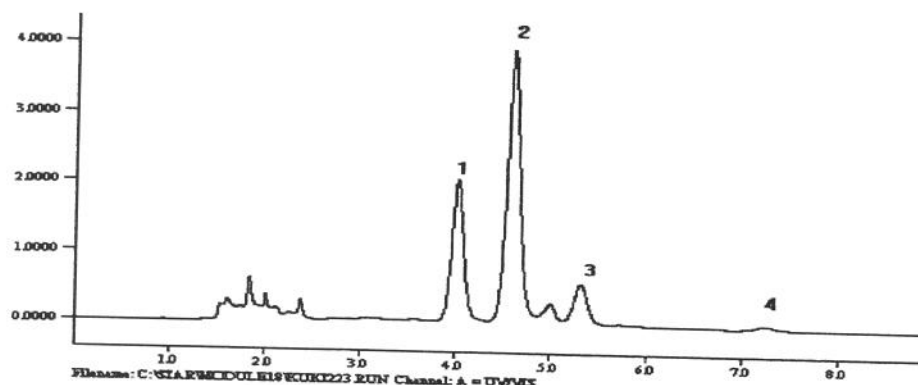


Figura 12A E 12B - Cromatogramas do Destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS) na forma bruta (12 A) e neutralizada (12 B). Condições da análise: separação em fase reversa com detecção em UV 292 nm, fase móvel 100% metanol (MeOH), fluxo de 2,0 mL/min, temperatura de 45°C, coluna C18-Varian (4,6 mm x 25 cm), volume de injeção de 20 μ L e eluição em 10 minutos.

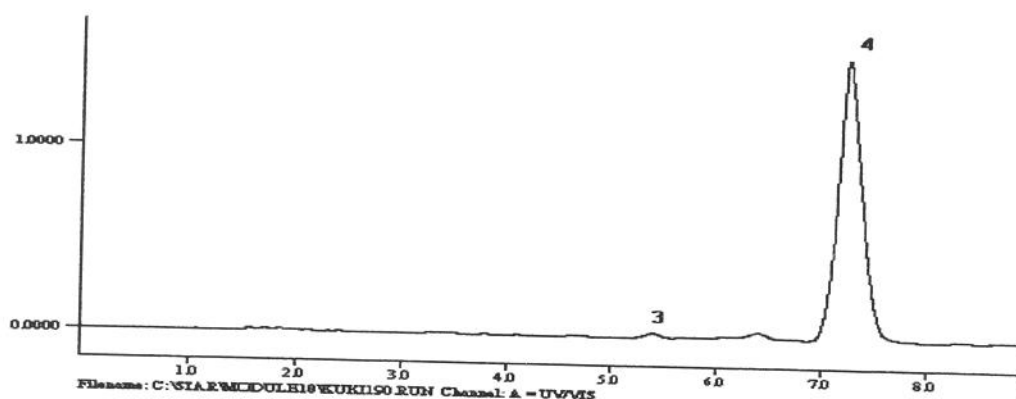
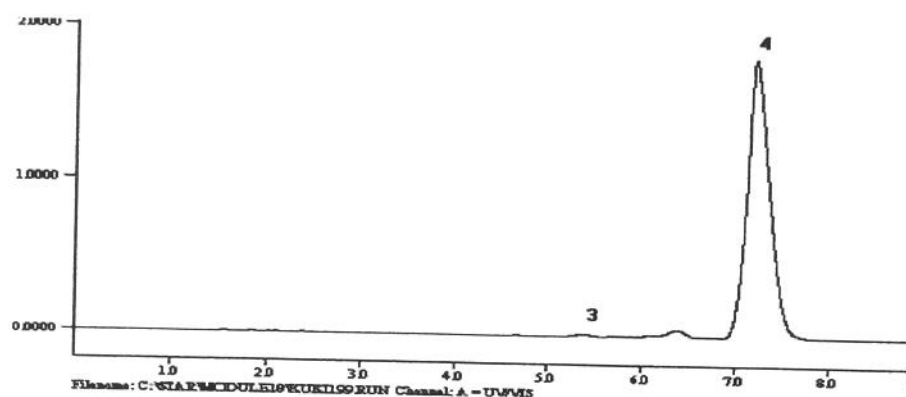
A**B**

Figura 13A e 13B- Cromatogramas dos suplementos Ephynal® (13 A) e Vita Gold® (13 B). Condições da análise: separação em fase reversa com detecção em UV 292 nm, fase móvel 100% metanol (MeOH), fluxo de 2,0 mL/min, temperatura de 45°C, coluna C18-Varian (4,6 mm x 25 cm), volume de injeção de 20µL e eluição em 10 minutos.

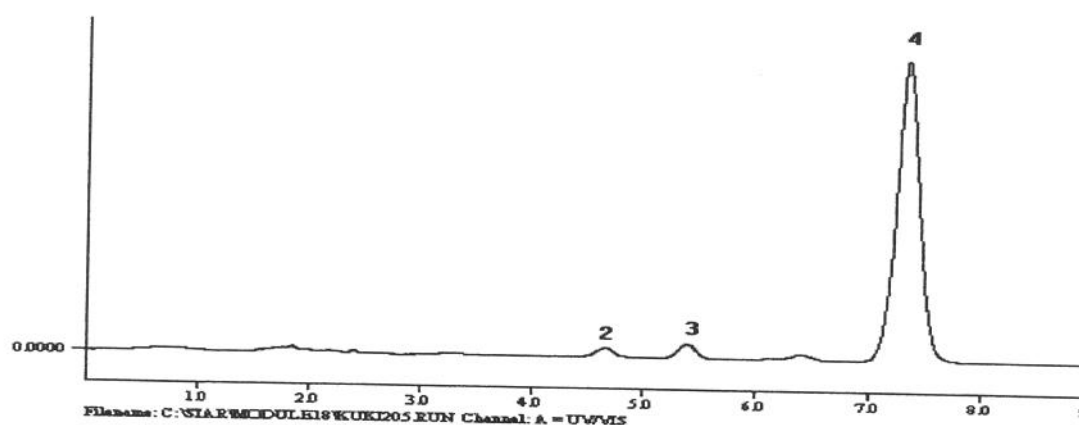


Figura 14 - Cromatograma do óleo de germe de trigo. Condições da análise: separação em fase reversa com detecção em UV 292 nm, fase móvel 100% metanol (MeOH), fluxo de 2,0 mL/min, temperatura de 45°C, coluna C18-Varian (4,6 mm x 25 cm), volume de injeção de 20 μ L e eluição em 10 minutos.

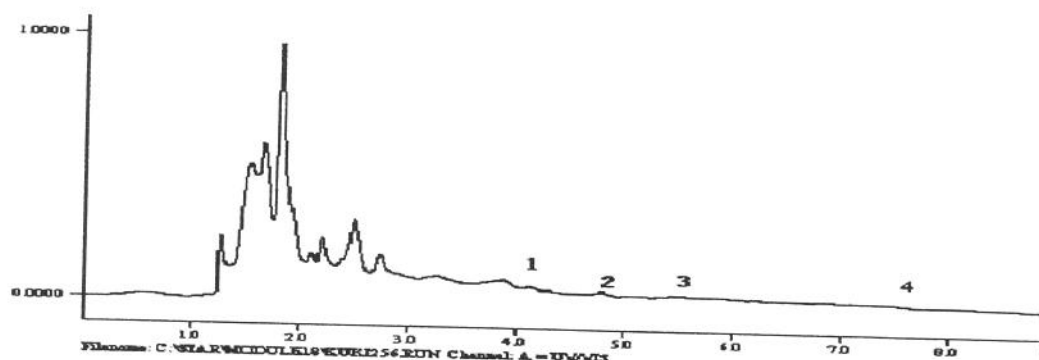
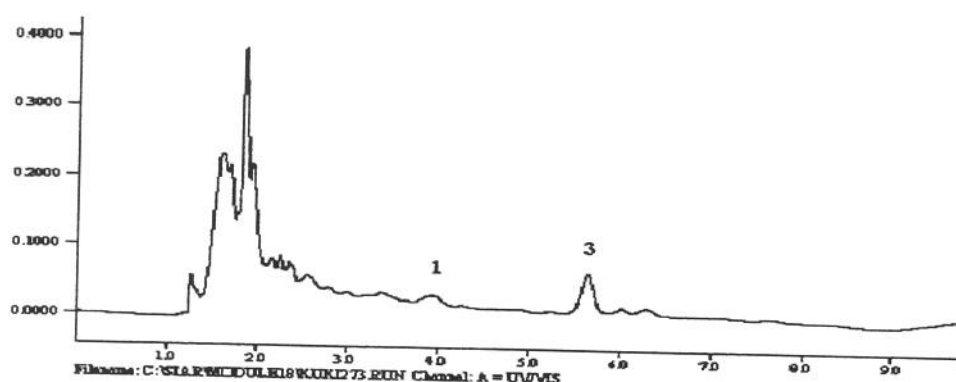
A**B**

Figura 15A e 15B- Cromatogramas dos fígados de ratos sem suplementação com vitamina E (15 A) e suplementados com óleo de soja por um período de 45 dias (15 B). Condições da análise: separação em fase reversa com detecção em UV 292 nm, fase móvel 100% metanol (MeOH), fluxo de 2,0 mL/min, temperatura de 45°C, coluna C18-Varian (4,6 mm x 25 cm), volume de injeção de 20µL e eluição em 10 minutos.

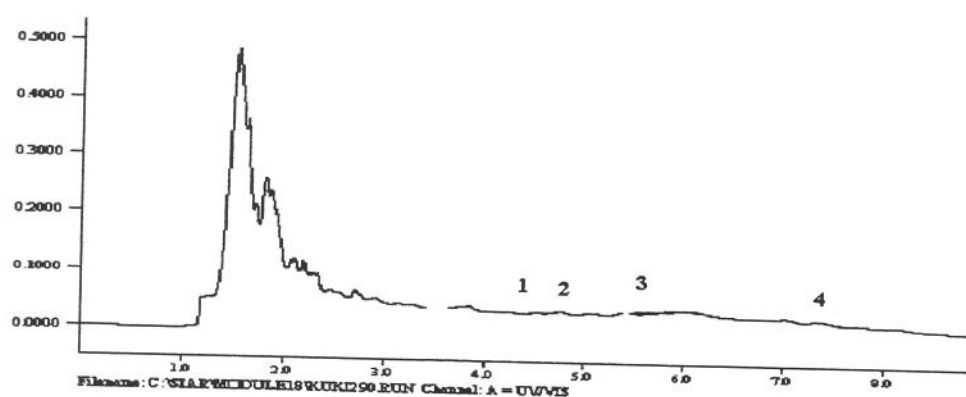
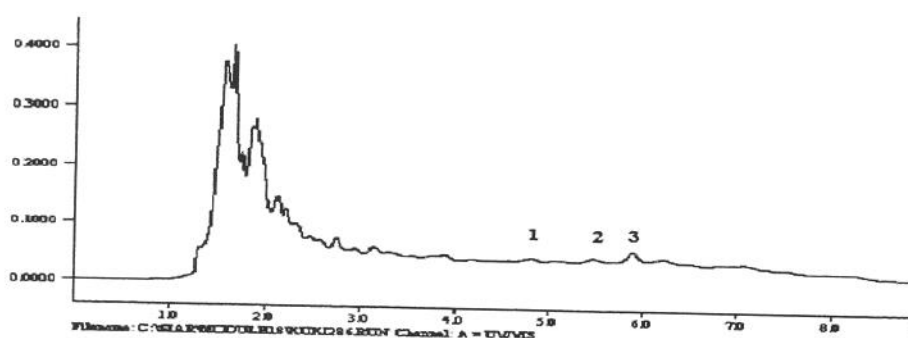
A**B**

Figura 16A e 16B - Cromatogramas dos fígados de ratos suplementados com ômega -3 sem vitamina E (16 A) e com vitamina E (16 B). Condições da análise: separação em fase reversa com detecção em UV 292 nm, fase móvel 100% metanol (MeOH), fluxo de 2,0 mL/min, temperatura de 45°C, coluna C18-Varian (4,6 mm x 25 cm), volume de injeção de 20µL e eluição em 10 minutos.

7 DISCUSSÃO

Cada isômero da vitamina E (alfa, beta, gama e delta) possui um índice de absorbância diferente. Para o alfa-tocoferol, o comprimento da onda, é de 292 nm, beta-tocoferol 296 nm, gama e delta-tocoferóis 298 nm; assim, optou-se em utilizar a absorbância do alfa-tocoferol 292 nm como a absorbância padrão, uma vez que este isômero está presente em quantidades superiores em relação aos demais isômeros e possui maior atividade biológica.

Os dois métodos, de Gimeno, *et al.* e Hung, *et al.*, utilizados pela cromatografia líquida de alta eficiência foram adaptados às condições do laboratório não interferindo significativamente na qualidade da análise. No método clássico modificado os resultados obtidos foram em mg de tocoferóis totais/100g de amostra e na CLAE $\mu\text{g/mL}$. Para efeito de comparação todos os resultados pelo método da CLAE foram convertidos convenientemente em mg de tocoferóis totais/100g.

Os fígados dos ratos utilizados passaram por um processo de liofilização a fim de manterem a integridade da vitamina E possibilitando assim a sua conservação e facilidade no manejo para a execução das análises.

As análises transcorreram num período de quatro meses e as amostras foram conservadas em locais secos e ausentes de luz uma vez que a vitamina E é altamente reativa e de fácil oxidação. Foi utilizada a cor vermelha, nos resultados obtidos pelos dois métodos,

para evidenciar o método que mais se destacou em cada amostra analisada.

Nos óleos vegetais analisados, por serem produtos de prateleira, foram encontradas quantidades satisfatórias de vitamina E. A Food and Nutrition Board (2000), através da "Ingestão Alimentar de Referência" (DRI), recomenda uma ingesta diária de 15 mg/dia para homens e mulheres adultos saudáveis. Baseado nesta recomendação os dois métodos são satisfatórios. Eles conseguem quantificar na amostra o mínimo necessário para se determinar a vitamina E. Isto é conseguido também nos suplementos vitamínicos, no óleo extraído da farinha de germe de trigo e nos fígados liofilizados dos ratos.

Ao compararmos o quanto cada método quantifica, a CLAE quantifica mais tocoferóis que o método clássico. A CLAE consegue separar e quantificar cada isômero da vitamina E, no caso os tocoferóis, e o acetato de alfa-tocoferol. Já o método por redução de íons cúpricos (método clássico modificado) o resultado foi obtido em termos de tocoferóis totais (soma de todos os tocoferóis), impossibilitando assim não só que tipo de isômero a amostra possui, mas a sua quantificação também.

Análise dos resultados

Ao comparar os óleos vegetais quanto aos resultados encontrados verifica-se que os valores obtidos pelo método Clássico em nenhum momento foram superiores aos obtidos pelo método por CLAE. Este fato pode ser observado no quadro a seguir:

ÓLEOS	MÉTODO POR REDUÇÃO DE	MÉTODO POR CROMATOGRAFIA
	ÍONS CÚPRICOS (mg T/100 g)	LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (mg T/100 g)
Canola	62	526
Milho	86	557
Girassol	68	1426
Dendê + soja	83	382
Soja	116	790
Gergelim	48	202
Gordura de côco	16	2939
Óleo extraído da Farinha de Germe de trigo (método Hung)	30	579

Analisando o perfil dos tocoferóis nos óleos vegetais e gordura temos que:

	Alfa- tocoferol (mgT/100g)	Beta-Gama- tocoferóis (mgT/100g))	Delta- tocoferóis (mgT/100g)	Acetato de alfa-tocoferol (mgT/100g)
Canola	184	127	Tr.	215
Milho	272	244	41	n.d.
Girassol	778	48	n.d	600
Dendê+soja	107	114	69	92
Soja	256	335	199	n.d.
Gergelim	n.d.	202	n.d.	n.d.
Gordura de côco	707	719	500	1013
Óleo extraído da farinha de Germe trigo	251	207	76	45

Tr. – traços n.d.- não detectado

A partir da análise deste perfil conclui-se que:

✓ O método clássico modificado detecta com certeza beta e gama-tocoferóis, comprovado através da CLAE pelo cromatograma do óleo de gergelim;

✓ Através do perfil do óleo de soja constata-se que é o detentor da mais alta carga de delta-tocoferol em relação aos óleos de canola, milho, girassol e dendê + soja. Portanto o método clássico modificado detecta também o delta-tocoferol;

✓ O óleo de girassol possui mais alfa-tocoferol que o óleo de soja e de milho o que é comprovado pela CLAE. Verificou-se também que possui beta e gama-tocoferol em pouca quantidade e não possui delta-tocoferol. Portanto o método clássico modificado determina o alfa-tocoferol;

✓ Os óleos de milho, soja e gergelim não possuem acetato de alfa-tocoferol, e a gordura de côco possui o maior índice das amostras analisadas. Ao verificarmos os valores encontrados pelo método clássico (p. 51), esta amostra possui a menor quantidade de tocoferóis totais. Isto aponta para um indicativo que para análise de óleos, o método clássico modificado é falho na determinação do acetato de alfa-tocoferol.

Com relação ao DDOS bruto e neutralizado, ambos os métodos avaliaram o DDOS neutralizado como o mais rico em termos de tocoferóis. Fica evidente que a CLAE quantificou maior quantidade de

tocoferóis que o método clássico modificado. Quando o DDOS é neutralizado ocorre uma concentração dos lipídios e com isto uma concentração da vitamina E. Por isso os dados encontrados foram condizentes com o esperado:

DDOS	MÉTODO POR REDUÇÃO DE ÍONS CÚPRICOS (mgT/100g)	MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (mgT/100g)
Bruto	9720	21634
Neutralizado	12540	43475

Analisando o perfil dos tocoferóis no DDOS bruto e neutralizado temos:

	Alfa-tocoferol (mgT/100g)	Beta-Gama tocoferóis (mgT/100g)	Delta-tocoferol (mgT/100g)	Acetato de alfa-tocoferol (mgT/100g)
Bruto	3548	8114	9569	403
Neutralizado	7774	15811	17848	2042

Analisando o perfil dos isômeros encontrados por CLAE temos que tanto o DDOS bruto como o neutralizado possuem quantidades de acetato de alfa-tocoferol bem menores em relação aos demais tocoferóis. Sendo assim os valores encontrados pelo método clássico modificado devem-se somente aos tocoferóis.

Quanto aos suplementos vitamínicos, pode-se observar no quadro a seguir que ambos métodos mostraram uma ordem quanto aos valores de tocoferóis totais assemelhada, mas a quantidade determinada pelos métodos foi muito diferente.

SUPLEMENTOS VITAMÍNICOS	MÉTODO POR REDUÇÃO DE ÍONS CÚPRICOS (mgT/100g)	MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (mgT/100g)
Ephynal®	264	298832
Vita Gold®	243	249722
Óleo de germe de trigo	119	14729

Perfil dos tocoferóis nos suplementos vitamínicos:

	Alfa- tocoferol (mgT/100g)	Beta-Gama tocoferóis (mgT/100g)	Delta- tocoferóis (mgT/100g)	Acetato de alfa- tocoferol (mgT/100g)
Ephynal®	815	n.d.	n.d.	298017
Vita Gold®	548	28	20	249126
Óleo de germe de trigo	430	109	n.d.	14190

n.d.- Não detectado

Por outro lado, analisando-se o perfil dos suplementos, traçando-se um perfil dos tocoferóis, dados estes fornecidos pela CLAE, pôde-se observar que os suplementos vitamínicos Ephynal® e Vita Gold® possuem a maior quantidade de acetato de alfa-tocoferol de todas as amostras analisadas. Possuem também alfa-tocoferol em quantidades pequenas quando comparadas ao acetato da amostra, mas mostram-se satisfatórias quando comparadas aos óleos. Com este fato pôde-se ser inferido que o método clássico modificado detectou o alfa-tocoferol mas não o acetato de alfa-tocoferol.

Com os fígados liofilizados de ratos, no tocante aos tocoferóis totais, foi observado que:

FÍGADOS LIOFILIZADOS DE RATOS	MÉTODO POR REDUÇÃO DE ÍONS CÚPRICOS (mgT/100g)	MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (mgT/100g)
Sem suplementação	1,5	19,0
Suplementação com óleo de soja	4,1	57,4
Suplementação com ω-3 sem vitamina E	3,4	23,68
Suplementação com ω-3 com vitamina E	16,1	68,79

Apesar das diferenças em termos das quantidades encontradas, os dois métodos demonstraram que os fígados de ratos suplementados com vitamina E apresentaram maior quantidade de vitamina E em relação aos demais fígados analisados.

Perfil dos tocoferóis nos fígados de ratos:

Fígados de ratos	Alfa- tocoferol (mgT/100g)	Beta-Gama tocoferóis (mgT/100g)	Delta- tocoferol (mgT/100g)	Acetato de alfa- tocoferol (mgT/100g)
Sem suplementação	4,8	2,9	8,6	2,7
Suplementados com óleo de soja	40,6	n.d.	16,8	n.d.
Suplementados com ω -3 sem vitamina E	3,33	2,58	11,02	6,75
Suplementados com ω -3 com vitamina E	35,55	7,38	25,86	n.d.

n.d.- Não detectado

Uma das referências utilizadas no desenvolvimento desta Tese foi o livro do MacCance & Widdowson's the Composition of Foods (MacCance, 1997), onde alguns teores de vitamina E dispostos estão de acordo com aqueles determinados pelo método clássico modificado por

Contrerás-Guzmán & Strong (1982), mas inferiores àqueles determinados por CLAE. É digno de nota o fato de que só foram encontradas três citações na literatura, de 1945 a 2002 (Sanchez-Moreno, 2002; Gutkoski *et al*, 1997; Yeransian *et al*, 1985), do método clássico modificado por Contrerás-Guzmán & Strong (1982), fora do âmbito da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

8 CONCLUSÕES

Pelo desenvolvimento desta Tese de Mestrado, na qual utilizou-se a comparação de dois métodos de análise de vitamina E; de um lado a cromatografia líquida de alta eficiência e de outro a utilização do método clássico modificado, através da redução de íons cúpricos e espectrofotometria, pôde-se concluir que:

1. Os métodos não apresentaram resultados compatíveis, portanto não são métodos comparáveis;
2. Ficou evidente que a CLAE quantifica maiores quantidades de tocoferóis do que o método clássico modificado;
3. A CLAE consegue separar e quantificar os isômeros da vitamina E, no caso os tocoferóis, à diferença do método clássico modificado, onde esta separação não ocorre, sendo sua determinação expressa em mg de tocoferóis totais/ 100 g da amostra;
4. A CLAE permitiu demonstrar que o método clássico modificado determina: alfa, beta, gama e delta tocoferóis;
5. Há fortes indicativos que, o método clássico modificado é falho na determinação do acetato de alfa-tocoferol e este fato pode ser explicado com base nas amostras que possuíam o acetato de alfa-tocoferol, pois quando o isômero (alfa-tocoferol) da vitamina E,

encontrava-se sob forma de sal, o acetato de alfa-tocoferol, o método clássico modificado, o qual pela sua metodologia não realiza saponificação nas amostras, é falho na sua detecção, o que é um fato importante, pois é particularmente esta forma de isômero, a mais estável e prevalente na maioria dos alimentos, tecidos animais e especialmente nos suplementos vitamínicos.

ANEXOS

ANEXO 1- Equipamentos necessários para as análises - para o método clássico modificado.

Os suplementos vitamínicos, óleos, gordura de côco, farinha de germe de trigo e os fígados liofilizados com e sem suplementação da vitamina E foram preparados de acordo com a metodologia a seguir:

- ✓ Balança analítica da marca Ohaus Analytical Standard AS200;
- ✓ Banho-maria modelo 102 da Fanem;
- ✓ Espectrofotômetro DU - 70 Spectrophotometer da Beckman.;
- ✓ Tubos de ensaio de 30 a 70 ml com tampa protegida internamente com teflon ou p.v.c. da Pyrex®;
- ✓ Pipetas graduadas de 1.5, 5 e 10 ml e volumétricas de 3, 5, 10, 20 e 25 ml da Pyrex®;
- ✓ Balões volumétricos de 25, 50 e 100 ml da Schott Duran

ANEXO 2 Equipamentos necessários para as análises - para a CLAE - Método Gimeno *et al.*

- ✓ A Coluna utilizada: C₁₈ Bondapak (4,6 mm x 25 cm);
- ✓ Centrífuga: 3.000g por 5min;
- ✓ Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE, equipamento utilizado foi da marca Varian 9012 com forno

da Varian Mistral e detector Varian 9050 variable wavelength UV/VIS.

- ✓ Fase móvel: metanol = 100% MeOH da Mallinckrodt AR®;
- ✓ Fluxo: 2.0 ml/min/ 10 min
- ✓ Temperatura: 45°C
- ✓ Detecção: UV 292 nm;
- ✓ Volume de injeção: 20 µL;
- ✓ Eluição em 10 minutos;
- ✓ Ependorf da PLASTIBRAND® com 1,5 ml de volume e transparente;
- ✓ Micro/Macropipeta da Socorex ISBA S.A;
- ✓ Filtro com poro de 0,45 µm.

ANEXO 3 - Equipamentos necessários para as análises - para a CLAE - Método Hung *et al.*

- ✓ CLAE, equipamento utilizado: marca Varian 9012 com forno da Varian Mistral e detector Varian 9050 variable wavelength UV/VIS;
- ✓ Coluna: C18;
- ✓ Fase móvel: metanol = 100% MeOH;
- ✓ Fluxo: 2.0 mL/min/ 10 minutos;
- ✓ Temperatura: 45°C;
- ✓ Detecção : UV 292 nm;
- ✓ Volume de injeção: 20 µL;

- ✓ Eluição completa em 10 minutos
- ✓ Centrífuga 10.000 rpm / 5 min;
- ✓ Rotavapor à vácuo, temperatura do banho entre 30 - 50°C;

ANEXO 4- Reagentes necessários para o método clássico modificado.

- ✓ Solução padrão estoque RRR - α - tocoferol da Calbiochem-Novabiochem Corporation;
- ✓ Cuproína (2'2 biquinolina) - $C_{18}H_{12}N_2$ - Sigma Chemical Corporation;
- ✓ Acetato cúprico di-hidratado;
- ✓ Uréia para análise - Merck S.A;
- ✓ Ácido ascórbico da Merse;
- ✓ Hidróxido de potássio da Chemco;
- ✓ Etanol absoluto da Ecibra;
- ✓ Sulfato de sódio anidro da Vetec Química Fina Ltda;
- ✓ Ácido acético glacial da Mallinckrodt Chrom AR.

ANEXO 5 - Reagentes necessários para o método por CLAE

Todos os solventes são de grau analítico para CLAE:

- ✓ Água ultrapura proveniente do sistema Milli-Q;
- ✓ Padrões de tocoferóis com grau de pureza $\geq 95\%$ para CLAE, proveniente da Calbiochem-Novabiochem Corporation

(San Diego, CA - EUA), dissolvidos em etanol e estocados em frascos de cor âmbar numa temperatura de -20°C ;

- ✓ Hexano: Merck S.A.;
- ✓ Metanol: Mallinckrodt Chrom AR®;
- ✓ Etanol absoluto: Ecibra.

ANEXO 6 - Soluções necessárias para o método clássico modificado.

- ✓ Solução padrão estoque *RRR* - α - tocoferol, 0.1% em heptano;
- ✓ Solução padrão de trabalho: diluir 1 ml da solução padrão estoque com 20 ml de heptano;
- ✓ Cuproína (2'2 biquinolína), solução a 0,5% em tolueno: pesar 25 mg de cuproína e dissolver em 5 ml de tolueno;
- ✓ Acetato cúprico di-hidratado, solução a 0,5% em água destilada;
- ✓ Uréia, solução a 2,5% em etanol absoluto;
- ✓ Ácido ascórbico, solução a 5% em água destilada;
- ✓ Hidróxido de potássio, solução a 50% em água destilada;
- ✓ Hidróxido de potássio alcoólico: medir 30 ml da solução de KOH 50% em água destilada e completar a 100 ml de etanol absoluto;
- ✓ Reagente de complexação: 4 ml da solução de cuproína + 20 ml da solução de acetato cúprico, completar com solução de uréia e adicionar 2-3 gotas de ácido acético * (fazer na hora);
- ✓ Etanol 70% (70 ml de etanol + 30 ml de água destilada);
- ✓ Sulfato de sódio, solução a 1.25% em água destilada
- ✓ Etanol absoluto.

ANEXO 7 - Soluções necessárias para o método por CLAE.

- ✓ Dioxano P.A. A.C.S., ISO da Merck;
- ✓ Isooctano (2,2,4, trimetilpentano) P.A.-A.C.S. - Nuclear;
- ✓ Éter de petróleo (bp 30-60°C) da Chemco;
- ✓ Acetonitrila comum da Synth;
- ✓ Metanol para CLAE da Mallinckrodt AR®.

ANEXO 8 – Procedimento Analítico para o Método Clássico modificado para amostras de óleos vegetais, suplementos vitamínicos e DDOS.

Amostra: Pesar 0,4 - 0,5g + 25 ml heptano (homogeneizar)
↓

Amostra: Transferir 8 ml da camada superior (heptano) + 2,5 ml ácido ascórbico + 2,5 ml KOH alcoólico

Padrão: Transferir 8 ml da solução padrão de trabalho + 2,5 ml ácido ascórbico + 2,5 ml KOH alcoólico

Branco: Transferir 8 ml de heptano puro + 2,5 ml ácido ascórbico + 2,5 ml KOH alcoólico

↓
Agitar vigorosamente por 2 minutos

↓
Transferir 5 ml da camada superior (heptano) + 5 ml de etanol 70%
agitar por 1 minuto

↓
Transferir 3 ml da camada superior (heptano) + 5 ml do reagente de complexação
e agitar vigorosamente por 2 minutos

↓
Deixar sedimentar

↓
Transferir 3 ml da camada inferior + 0,5 ml de etanol puro

↓
Ler a absorbância a 545 nm.

ANEXO 9 – Procedimento Analítico para o Método Clássico modificado para amostras de farinha de germe de trigo e fígados liofilizados.

Amostra: Pesar entre 2,0-2,5 g em tubos de ensaio de 70 ml



Adicionar 20 ml de etanol absoluto, tampar hermeticamente



Aquecer em banho-maria a 85°C por 30 min., agitando ocasionalmente



Esfriar e adicionar 10 ml de heptano, misturar bem e agitar por 2 minutos



Adicionar 20 ml de sulfato de sódio a 1,25% e agitar durante 2 minutos



Deixar separar as camadas, os tocoferóis ficam na camada superior



Amostra: Transferir 8 ml da camada superior (heptano) + 2,5 ml ácido ascórbico + 2,5 ml KOH alcoólico

Padrão: Transferir 8 ml da solução padrão de trabalho + 2,5 ml ácido ascórbico + 2,5 ml KOH alcoólico

Branco: Transferir 8 ml de heptano puro + 2,5 ml ácido ascórbico + 2,5 ml KOH alcoólico



Agitar vigorosamente por 2 minutos



Transferir 5 ml da camada superior (heptano) + 5 ml de etanol 70% e agitar por 1 minuto



Transferir 3 ml da camada superior (heptano) + 5 ml do reagente de complexação e agitar vigorosamente por 2 minutos



Deixar sedimentar



Transferir 3 ml da camada inferior + 0,5 ml de etanol puro



Ler a absorbância a 545 nm.

ANEXO 10 - Procedimento Analítico para o Método por CLAE, para amostras de óleos vegetais, suplementos vitamínicos, gordura de côco e DDOS - Método Gimeno *et al.*

Diluir o óleo com hexano (1+10, v/v)



Transferir 200 μL da solução para o Ependorf



Adicionar 600 μL de metanol



Centrifugar (3.000g por 5 min)



Filtrar a solução com um filtro de poro de 0,45 μm



Injetar na CLAE

ANEXO 11 - Procedimento Analítico para o Método por CLAE, para amostras de farinha de germe de trigo e fígados liofilizados - Método Hung *et al.*

Pesar 2,0-2,5 da amostra



Homogeneizar com 15 ml de Dioxano-Isooctano (20+80, v/v)



Centrifugar a 10.000 rpm por 5 min a 25° C



Retirar 5 ml do sobrenadante e descartar num béquer



O sobrenadante é homogeneizado com 15 ml de Dioxano-Isooctano
por 1 min



Centrifugar novamente a 10.000 rpm por 5 min a 25° C



Retirar 5 ml do sobrenadante e descartar num béquer



Secar a vácuo no rotavapor com temperatura $\leq 50^{\circ} \text{C}$



Extrair com 5 ml de acetonitrila comum, usando filtro de vidro



O filtrado é extraído com 15 ml de Isooctano



Adição de 5 ml de acetonitrila comum, usando filtro de vidro



O filtrado é extraído com 10 ml de Isooctano



Adição de 5 ml de acetonitrila comum, usando filtro de vidro



O filtrado é extraído com 5 ml de Isooctano



Secar a vácuo



O resíduo é dissolvido em éter de petróleo



Transferir tudo para um tubo de ensaio



Secar com nitrogênio



Dissolver com 1 – 2 ml de metanol – 100% MeOH



Injeção na CLAE

Referências Bibliográficas

ABIDI, S.L.; MOUNTS, T.L. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of tocopherols. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1, n.782, p.25-32, 1997.

ANALYTICAL OIL CHEMISTS SOCIETY. **Determinations of tocopherols and tocotrienols in vegetables oils and fats by HPLC**. Saint Louis: AOCS, 1993. 5p. (AOCS Official Method Ce 8-89).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16^a.ed. CUNIFF P.A.(ed). Washington, D.C.: AOAC, 1995, v.2, p.1-2, 15-16, 21-22.

AUGUSTO, M.M.M. **Obtenção e caracterização de um concentrado de tocoferóis (vitamina E) a partir do destilado da desodorização do óleo de soja**. Campinas, 1988. 125p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

AXFORD-GATLEY, R.A.; WILSON, G.J. Reduction of experimental myocardial infarct size by oral administration of alpha-tocopherol. **Cardiovascular Research**, Amsterdam, v.2, n.25, p.89-92, 1991.

BOURLANGER, C.M.; TANNER, F.C.; BEA, M.L.; HAHN, A.W.; WERNER, A.; LUSCHER, T.F. Oxidized low density lipoprotein induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. **Circulation Research**, Dallas, v.6, n.70, p.1191-1197, 1992.

CONTRERAS-GUZMÁN, E.S.; STRONG III, F.C. Determination of dl- α -tocopherol by reduction of cupric ion. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, D.C., v.5, n.65, p. 1215-1221, 1982.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6ªed. Campinas: UNICAMP, 1995, p.183-238.

DOWD, P.; ZHENG, Z.B. On the mechanism of the anticlotting action of vitamin E quinone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.18, n.92, p.8171-8175, 1995.

ELINDER, L.S.; WALLDIUS, G. Antioxidants and atherosclerosis progression: unresolved questions. **Current Opinion Lipidology**, n.5, p. 265-268, 1994.

EMMERIE, A.; ENGEL, C. Colorimetric determination of dl- α -tocopherol (vitamine E). **Nature**, London, v.142, p.873, 1938.

ESTENBAUER, H.; STRIEGL, G., PUHL, H.; OBERRUTHER, S.; ROTHENEDER, M.; ELSAADANIM, G., JURGENS, G. The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low-density lipoprotein. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.570, p. 254-267, 1989.

ESTENBAUER, H.; DIEBER-ROTHENEDER, M.; STRIEGL, G.; WALG, G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.1, n. 53, p. S314- S321, 1991.

FOOD AND NUTRITION BOARD. INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes**. Washington, D.C.: National Academic Press, 2000.

GAZIANO, J.M.; MANSON, J.E.; BURING, J.E.; HENNEKENS, C.H. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. **Annals of New York Academy of Science**, New York, v.669, p. 249-259, 1992.

GIMENO, E.; CASTELLOTE, A.I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; De LA TORRE, M.C.; LOPEZ-SABATER, M.C. Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, n.1-2, p. 251-254, 2000.

- GODFRIED, S.L.; COMBS, G.F.; SAROKA, J.M.; DILLINGHAM, L.A. Potentiators of atherosclerotic lesions in rabbits by a higher diet level of vitamin E. **British Journal of Nutrition**, New York, v.61, n.3, p. 607-617, 1989.
- GILLIGAN, D.M.; SACK, M.N.; GUETTA, V.; CASINO, P.R.; QUYYUMI, A.A.; RADER, D.J. Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v.7, n.24, p.1611-1617, 1994.
- GUILAND, J.C.; LEQUEU, B. **As vitaminas, do nutriente ao medicamento**. 1ª ed. São Paulo, 1995.p.48-49.
- GUTKOSKI, L.C.; EL-DASH, A.A.; PEDO, I. Chemical and nutritional characterization of oat milling products. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba-Paraná, vol.40, n. 1, p. 121-134, 1997.
- HARPER, H.A., RODWELL,V.W., MAYES, P.A. **Manual de química fisiológica**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 1982.p.160-163.
- HASSAN EL-MALLAH, M.; EL-SHAMI, S.M.; ZAHER, F.A. Studies on desodorization of soybean oil as potencial sources of natural tocopherols. **Seifen-ole-fette-wachse**, Ausburg, v.116, n.6, p.199-201, 1990.

HENNEKENS C.; GAZIANO, J.M. Antioxidants and heart disease: epidemiology and clinical evidence. **Clinical Cardiology**, Easton, v.16, n.4, p. 10-15, 1993.

HUNG, S.S.O.; CHO, Y.C.; SLINGER, S.J. High performance liquid chromatographic determination of α -tocopherol in fish liver. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, D.C., v.63, n.4, p. 889-893, 1980.

JACKSON, R.L.; KU, G.; THOMAS, C.E. Antioxidants: A biological defense mechanism for the prevention of arteriosclerosis. **Medical Research Review**, New York, v.13, n.2, p.161-182, 1993.

JESSUP, W.; RANKIN, S.M.; De WHALLEY, C.V.; HOULT, J.R.; SCOTT, J.; LEAKE, D.S. Alpha-tocopherol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. **Biochemical Journal**, London, v. 265, n.2, p.399-405, 1990.

KAYDEN H.; TRABER, M. Absorption, lipoprotein transport and regulations of plasma concentrations of vitamine E in humans. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.34, n.1, p.343-58, 1993.

KEANEY, J.F.; GAZIANO, J.M.; XU, A.; CURRANCELENTANO, J.; SHWAERY, G.T.; LOSCALZO, J.; VITA, J.A. Low-dose alfa-tocoferol improves and higher-dose alfa-tocoferol worsens endothelium vasodilatador function in cholesterol-fed rabbits. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.93, n. 2, p.844-851, 1994.

KLEIN, H.H.; PICH, S.; LINDERT, S.; NIEBENDAHL, K.; NIEDMANN, P.; KREUZER, H. Combined treatment with vitamins E and C in experimental myocardial infarction in pigs. **American Heart Journal**, Saint Louis, v. 118, n. 4, p. 667-673, 1989.

JACKSON, R.L.; KU, G.; THOMAS, C.E. Antioxidants: A biological defense mechanism for the prevention of artherosclerosis. **Medical Research Review**, New York, v.13, n.2, p. 161-182, 1993.

LANG J.K.; SCHILLACI M.; IRVIN, B. Vitamin E. 2^aed., In LEENHEER A.P.; LAMBERT W.E., NELIS. **Modern chromatographic analysis of vitamins**. v. 60, p. 153-195, 1992.

MACHLIN, L.J; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v.1, n.6, p.441-445, 1987.

MACCANCE, R.A. **MacCance & Widdowson's the Composition of Foods**. London: HMSO, 4^o ed., 1997. 418p.

MOSSÉ, J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseed; a reappraisal of its definition and determination; variation according to species and to seed protein content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.38, n.1, p.18-24, 1990.

NAUDET, M.; CECCHI, G. Sur la nature et la composition des produits éliminés au cours de la desodorisation II. **Revue Française des Corps Gras**, Paris, v.17, n.8/9, p.529-535, 1970.

OLIVEIRA, A.C; REIS, S.M.M. **TP242 Lípidos em alimentos e implicações nutricionais. Manual de aulas práticas**. Campinas: UNICAMP, 1997. p.13.

PELLET, P.L.; YOUNG, V.R. **Nutritional evaluation of protein foods**. Tokyo: The United Nations University, 1980. 154p.

PIKE, R.; BROWN; M.L. **Nutrition: an integrated approach**. 3^aed. New York: Macmillan, 1984. p.150-157.

QIAO, Y.; YOKOYAMA, M.; KAMEYAMA, K.; ASANO, G. Effect of vitamin-E on vascular integrity in cholesterol fed-guinea pigs. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, Dallas, v. 13, n.12, p.1885-1892, 1993.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR.; G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

RIBEIRO, J.P.A ; OSAKI, M.; ALMEIDA, E.; NETO, L.C.; METZE, K. Effects of vitamin E on endothelium-dependent coronary flow in hipercholesterol dogs. **Atherosclerosis**, v. 126, p. 43-51, 1996.

RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; ASCHIERO, A.; GIOVANNUCI, E.; COLDITZ, G.A.; WILLET, C. Vitamin E consupcion and the risk of coronary heart disease in men. **New England Journal of Medicine** , Boston, v.328, n.20, p.145-156, 1993.

ROSS, R. The pathogenesis of artherosclerosis: A perpesctive for the 1990s. **Nature**, London, v.362, n.6423, p. 801-809, 1993.

RUPÉREZ, F.J.; BARBAS, C.; CASTRO, M.; MARTÍNEZ S.; HERRERA, E. Simplified method for vitamin E determination in rat adipose tissue and mammary glands by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 823, n.1-2, p. 483-487, 1998.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, London, vol. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SEBBAG, L.; FORRAT, R. CANET, E.; RENAUD, S.; DELAYE, J. De LORGERIL, M. Effects of dietary supplementation with alpha-tocopherol on myocardial infarct size and ventricular arrhythmias in a dog model of ischemia- reperfusion. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 24, n.6, p. 1580-1585, 1994.

SGARBIERI,V.C. **Alimentação e nutrição**: fator de saúde e desenvolvimento. Campinas:UNICAMP, São Paulo: Almed, 1987, p.160-161.

SIMON, J.A. Vitamins C and cardiovascular disease: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 11, n.2, p.107-125, 1992.

SINNHBER, R.O. ; YU; T.C. 2- Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products: II – the quantitative determination of malonaldehyde. **Food Technology**, Chicago, v.12, n.1, p.9-12, 1958.

SOKOL, R.J.; HEUBI, J.E.; IANNAcone, B.; BOVE, K.E.; BALISTRERI, W.F. Mechanisms causing vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.85, n.5, p.1172-1182, 1983.

STAMPFER, M.J.; HENNEKENS, C.H.; MASON, G.A.; ROSNER, B.; WILLETT, W.C. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.328, n.20, p.1444-1449, 1993.

STEINER, M. Influence of vitamin E on platelet function in humans. **Journal American College of Nutrition**, New York, v.10, p.466-473, 1991.

STEWART-LEE, A.L.; FORSTER, L.A.; NOUROOZ-ZADEH, J.; FERNS, G.A.A.; ANGAARD, E.E. Vitamin E protects against impairment of endothelium-mediated relaxations ins cholesterol-fed rabbits. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, Dallas, v.14, n.3, p. 494-499, 1994.

TIRMENSTEIN, M.A.; WATSON, B.W.; HAAR, N.C.; FARISS, M.W. Sensitive method for measuring tissue α -tocopherol and α -tocopheryloxybutyric acid by high-performance liquid chromatography with flourimetric detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.707, n.1-2, p.308-311, 1998.

TRABER, M.G; KAYDEN, H.J. Vitamin E is delivered to cells via the high affinity receptor for low density lipoprotein. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.40, n. 4, p.747-751, 1984.

VERLANGIERI, A.J.; BUSH, M.J. Effects of d-alpha-tocopherol supplementation on experimentally induced primate atherosclerosis. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 11, n.2, p. 131-138, 1992.

WITZTUM, J.L. The oxidation hypothesis of artherosclerosis. **Lancet**, London, v.344, n.8925, p. 793-795, 1994.

YERANSIAN, J.A.; SLOMAN, K.G.; FOLTZ, A.K. Food. **Analytical Chemistry**, Washington, D.C, vol.57, n.5, p.R278-R315, 1985.

p. XIII e XIV
Trocar 298832 por 99611

p.2
2º parágrafo, após "...posterior análise", acrescentar (Sinnhber & Yu, 1958; Pellet & Young, 1980; Mossé, 1990; Reeves *et al.*, 1993).

p.27
1º parágrafo, após "...recentemente publicados", acrescentar (AOAC,1995).

p.40
Trocar os valores

298832	por	99611
249722	por	83241
815	por	272
298017	por	99339
548	por	183
28	por	9
20	por	7
249126	por	83042

p.44
Trocar "(p.51)" por (p.29).