

Validação de método analítico para o monitoramento de vitamina A em leites do Programa Viva Leite

Validation of analytical method for monitoring of vitamin A in milks from *Programa Viva Leite*

Lucile Tiemi Abe-Matsumoto^{1,*}

Angela Sueko Mikaro¹

Simone Alves da Silva^{II}

Fabiana Dognani Castro¹

Meiry Mayumi Takeda¹

Miriam Solange Fernandes Caruso^{III}

RESUMO

Introdução: A ocorrência de hipovitaminose A é evidente em determinadas populações. Com o intuito de combater essa deficiência no estado de São Paulo, foi criado um programa governamental com distribuição gratuita de leite pasteurizado enriquecido com vitaminas A, D e ferro para a população de baixa renda, com a finalidade de oferecer um complemento alimentar de alto valor nutritivo. **Objetivo:** Otimizar e validar uma metodologia analítica para determinação de vitamina A em leites fluidos, utilizando metodologia oficial da *Association of Official Analytical Chemistry (AOAC)* com modificações. **Método:** Foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para avaliar os teores de vitamina A em 261 amostras de leites distribuídos pelo programa. **Resultados:** O método analítico validado se mostrou adequado para a determinação de vitamina A em leites fluidos na rotina do laboratório. Os resultados indicaram que 52% das amostras apresentaram concentrações de vitamina A acima do valor declarado na informação nutricional da rotulagem, enquanto 11% apresentaram teores abaixo do valor declarado. **Conclusões:** O monitoramento dos teores de vitamina A nestes leites deve ser contínuo para garantir a quantidade de micronutriente declarada no rótulo e atender os objetivos do programa.

PALAVRAS-CHAVE: Vitamina A; Validação; Leite; Programa Governamental

ABSTRACT

Introduction: There is an evidence of hypovitaminosis A in certain populations. In order to combat this deficiency in Sao Paulo State, a government program was created for free distribution of pasteurized milk enriched with vitamins A, D, and iron for the low income population for the purpose to offer a food supplement with high nutritional value. **Objective:** Optimization and validation of a methodology for the determination of vitamin A in fluid milk, using modified methodology of Association of Official Analytical Chemists (AOAC). **Method:** The high performance liquid chromatography with fluorescence detection was used to evaluate vitamin A contents in 261 milks of the program. **Results:** The validated analytical method was adequate for the determination of vitamin A in fluid milks in the laboratory routine. The results showed that 52% of the samples had vitamin A concentrations above the declared value in the nutrition facts label, while 11% presented lower content in comparison to the declared value. **Conclusions:** Monitoring of vitamin A levels in these milks should be continuous to ensure the amount of micronutrient declared on the label and to meet the objectives of the program.

KEYWORDS: Vitamin A; Validation; Milk; Governmental Program

^I Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

^{II} Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

^{III} Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

* E-mail: lucileabe@ial.sp.gov.br



INTRODUÇÃO

A vitamina A é um nutriente essencial para o funcionamento normal da visão, para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da integridade das células epiteliais, função imune e reprodução¹.

De acordo com o Ministério da Saúde (MS), a ingestão diária recomendada (IDR) de vitamina A é de 600 µg para adultos, entre 375 µg e 500 µg para lactentes e crianças, de acordo com a faixa etária, e de 800 µg e 850 µg, respectivamente, para gestantes e lactantes².

A deficiência de vitamina A é considerada uma das principais deficiências nutricionais dos países subdesenvolvidos, sendo a principal causa de cegueira evitável no mundo, estando também associada a 23% das mortes por diarreia em crianças³. No Brasil, a população infantil do Nordeste é a mais vulnerável ao problema, porém existem indicações da ocorrência de hipovitaminose A também em bolsões de pobreza na Região Sudeste^{4,5}. Com o intuito de reduzir essa deficiência, o Governo do Estado de São Paulo criou, em 1999, o Programa Viva Leite para distribuição gratuita de leite pasteurizado enriquecido com ferro e vitaminas A e D para a população de baixa renda. O programa fornece anualmente 75 milhões de litros de leite para crianças e idosos em situação de insegurança alimentar e vulnerabilidade social, atendendo atualmente cerca de 420 mil famílias⁶.

A Organização Mundial da Saúde recomenda o aleitamento materno exclusivo até os 6 meses de idade; após essa fase, alimentos complementares devem ser incluídos, mantendo o aleitamento materno pelo menos até os 2 anos de idade. O leite materno contém todas as proteínas, açúcares, gorduras, vitaminas e água que o lactente necessita para ser saudável⁷; além disso, apresenta determinados anticorpos e glóbulos brancos que oferecem imunidade neste período. Na fase adulta, o consumo de leite de vaca fornece parte desses nutrientes essenciais, suprimindo o organismo com energia, proteínas de alta qualidade e uma variedade de vitaminas e minerais, porém, o processamento térmico pode levar a perdas nutricionais, principalmente, a de vitaminas⁸.

O enriquecimento do leite com vitaminas está se tornando uma prática cada vez mais comum, e pode ser aplicado tanto para compensar as perdas nutricionais decorrentes do processamento ou para aumentar o seu valor nutritivo. O processo de enriquecimento do leite deve ser bem controlado, uma vez que a vitamina A pode ser facilmente degradada, pois é foto e termossensível, de fácil oxidação e instável em pH abaixo de 4,5. Assim, para a fortificação de alimentos, as vitaminas nas formas de ésteres, como o acetato ou o palmitato de retinol, são as mais utilizadas por serem mais estáveis em relação à sua forma livre⁹.

A padronização de metodologia analítica para a quantificação de vitaminas em alimentos é dificultada devido à diversidade de procedimentos descritos na literatura e à complexidade das matrizes existentes. Atualmente, as técnicas mais utilizadas são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores ultravioleta/visível (UV-VIS), detector de arranjo de diodos (DAD) e de fluorescência (FLU), com fases normal ou reversa^{10,11}. Nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas como a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro

de massas tem apresentado diversas vantagens como redução no tempo de análise, utilização de menor quantidade de solventes e maior eficiência, porém, para a maioria dos laboratórios públicos, ainda é uma técnica de alto custo¹².

A análise dos teores de vitamina A nos leites do Programa é de extrema importância para comprovar se as usinas de beneficiamento estão realizando o enriquecimento adequado do produto. Entretanto, para que os resultados sejam confiáveis, o método analítico deve ser validado seguindo uma norma oficial como a estabelecida pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro)¹³.

Os objetivos deste trabalho foram apresentar as etapas da otimização e validação da metodologia para a determinação de vitamina A em leite fluido por CLAE-FLU, bem como aplicar o método para avaliação dos leites enriquecidos do Programa Viva Leite.

MÉTODO

Amostras

As amostras de leite pasteurizado integral e leite *ultra high temperature* (UHT) desnatado utilizadas na validação do método foram adquiridas no comércio local da cidade de São Paulo.

O monitoramento do Programa Viva Leite foi realizado em 261 amostras colhidas pela Vigilância Sanitária em 12 municípios do estado de São Paulo. Os resultados de vitamina A obtidos nas análises foram comparados com os valores declarados na informação nutricional da rotulagem.

Padrões e reagentes

Para a validação da metodologia foram utilizados padrões de *all-trans*-retinol e palmitato de retinol, marca Sigma-Aldrich (St Louis, EUA), e os seguintes reagentes (grau PA): éter de petróleo e álcool etílico (96%), de marca Synth (Rio de Janeiro, Brasil); hidróxido de potássio (KOH), ácido ascórbico, pirogalol e butil hidroxil tolueno (BHT), de marca Merck (Darmstadt, Alemanha). Metanol e isopropanol, ambos de grau cromatográfico, foram obtidos da marca Carlo Erba (Milão, Itália).

Otimização da metodologia

Inicialmente, foram avaliadas as condições cromatográficas de separação e de detecção do padrão de *all-trans*-retinol por CLAE-FLU. O método da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC)¹⁴ estabelece o sistema de cromatografia líquida em fase normal, porém optou-se pelo sistema de fase reversa devido à utilização de solventes menos tóxicos. Assim, foram testadas fases móveis compostas de metanol com diferentes proporções de água até a obtenção de um pico com boa resolução. As condições de saponificação também foram otimizadas, avaliando-se diferentes temperaturas e tempos de saponificação na tentativa de redução deste tempo estabelecido pelo método da AOAC (18 h). Foi ainda otimizado o processo de extração, utilizando-se menor volume de amostra e, conseqüentemente,



menor consumo de solventes orgânicos em relação ao método da AOAC. Além disso, verificou-se o uso dos antioxidantes BHT, pirogalol e ácido ascórbico com o objetivo de selecionar o mais eficiente, avaliando-se a porcentagem de recuperação do padrão de *all-trans*-retinol adicionado na amostra de leite pasteurizado integral.

Metodologia proposta

A metodologia utilizada fundamentou-se na descrita pela AOAC¹⁴, com as modificações descritas anteriormente, de acordo com as seguintes etapas:

Saponificação e extração: Em tubos de polietileno com capacidade para 25 mL, foram pipetados 2 mL de amostra, 3 mL de KOH (3,8 mol.L⁻¹), 2 mL de álcool etílico e 1 mL de BHT (0,1% em álcool etílico). Os tubos foram agitados por 2 min em agitador do tipo vórtex (modelo QL-901, marca Biomixer, Ribeirão Preto, Brasil) e colocados em repouso por 16 h ao abrigo da luz, para completa saponificação dos ésteres. Após a saponificação, adicionou-se 10 mL de éter de petróleo, 10 mL de água, agitou-se por 30 s em agitador tipo vórtex; após a agitação, 1 mL de etanol foi acrescentado. Os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm por 10 min (centrífuga modelo NT 812, marca Novatécnica, Piracicaba, Brasil), a fase etérea foi transferida para um frasco de vidro com auxílio de micropipeta e o processo de extração foi repetido por mais duas vezes, com exceção da adição de água. O solvente foi completamente evaporado em concentrador de amostras (modelo TE-019-E3, marca Tecnal, São Paulo, Brasil) com aquecimento máximo até 45°C sob fluxo de nitrogênio. As amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol, filtradas em membranas PTFE de 0,45 µm (Millipore Corp., Bedford, MA, EUA), transferidas para *vial* âmbar e analisadas no mesmo dia por CLAE.

Análise cromatográfica: A determinação de vitamina A foi realizada em cromatógrafo a líquido marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto de bomba LC-20AT, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e detector de fluorescência RF-10AXL (comprimentos de onda de excitação 325 nm e de emissão 480 nm). Foi utilizada coluna de fase reversa LiChrospher 5 RP18 (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm) com coluna de guarda LiChrospher 5 RP18 (25 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), marca Varian (Palo Alto, EUA); como fase móvel foi empregado 100% de metanol, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático; o volume de injeção foi de 20 µL e temperatura do forno (coluna) de 28°C.

Uma solução estoque do padrão foi preparada na concentração aproximada de 5.000 ng.mL⁻¹ em isopropanol; a correção do valor da concentração foi realizada por análise espectrofotométrica, com leitura da absorbância a 324,5 nm (Espectrofotômetro UV/Vis modelo 8453, Hewlett Packard, Palo Alto, EUA), utilizando a Lei de Lambert-Beer, representada pela seguinte fórmula:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Onde:

A = absorbância da vitamina A no comprimento de onda de 324,5 nm
ε = absorvidade molar da vitamina A (ε = 5.460 L.mol⁻¹.cm⁻¹)¹⁴
b = caminho óptico (1 cm)
c = concentração molar da vitamina A na solução (mol.L⁻¹)

Validação da metodologia

A validação da metodologia foi realizada de acordo com o documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos, da Coordenação Geral de Acreditação, Inmetro¹³. Foram determinados os seguintes parâmetros de desempenho:

Seletividade: Amostras de leite pasteurizado e leite UHT desnatado foram fortificadas com o padrão de *all-trans*-retinol em três níveis de concentração: 594,3; 1.816,4; 3.527,3 ng.mL⁻¹ (leite pasteurizado) e 284,3; 1.137,1; 3.411,5 ng.mL⁻¹ (leite UHT). Foram comparados os resultados obtidos das matrizes fortificadas com a solução padrão de *all-trans*-retinol preparada em metanol. As curvas analíticas dos três grupos foram construídas e o efeito das matrizes leite pasteurizado e leite UHT desnatado foram verificados através da comparação visual da inclinação das retas e pelo teste t de Student.

Linearidade e faixa de trabalho: O estudo da linearidade foi realizado com seis níveis de concentração, entre 200 e 5.000 ng.mL⁻¹, utilizando-se padrão de *all-trans*-retinol. As soluções padrão foram preparadas em metanol, em triplicata, para a obtenção da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Foi aplicado o teste de Grubbs em cada nível para verificar valores aberrantes e o teste de Cochran para avaliar a homogeneidade das variâncias ou homocedasticidade dos resíduos.

Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ): O primeiro ponto da curva de calibração foi estabelecido como o limite de quantificação. Uma vez estabelecido o LQ, esse valor foi confirmado por meio da análise de amostras independentes no mesmo nível de concentração, com seis replicatas de leite UHT desnatado fortificadas com padrão de *all-trans*-retinol. O teste de Grubbs foi aplicado para avaliar resultados aberrantes. O LD foi estabelecido a partir do LQ utilizando-se a fórmula: LD = LQ/3,3.

Exatidão: A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação dos padrões adicionados nas matrizes leite integral pasteurizado e leite UHT desnatado. As análises foram realizadas em triplicata com o padrão de *all-trans*-retinol, em três níveis de concentração: 594,3; 1.816,4; 3.527,3 ng.mL⁻¹ (leite pasteurizado) e 284,3; 1.137,1; 3.411,5 ng.mL⁻¹ (leite UHT). O critério de aceitação para a recuperação foram valores entre 95% e 105%.

Precisão: Para a repetitividade, foram utilizados os resultados obtidos no ensaio de exatidão para amostras fortificadas, calculando-se o desvio-padrão para cada nível de concentração e o desvio-padrão relativo (RSD). Valores de RSD inferiores a 10% atenderam ao critério de repetibilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização da metodologia

A otimização foi iniciada pelas condições cromatográficas de separação e de detecção do padrão de *all-trans*-retinol por CLAE-FLU. Inicialmente, utilizou-se fase móvel metanol:água



(95:5, v/v), porém, nestas condições, o pico cromatográfico do retinol apresentou uma cauda. Ao utilizar 100% de metanol como fase móvel, os resultados mostraram-se satisfatórios, com boa eficiência do pico cromatográfico (Figura 1). Para manter a eficiência da coluna, foi realizada semanalmente uma limpeza no sistema cromatográfico utilizando solução composta por metanol:acetonitrila:ácido acético 2% (35:35:30, v/v/v), com fluxo de 1 mL.min⁻¹ durante 45 min.

A extração de vitamina A em alimentos normalmente requer uma etapa adicional de saponificação antes da extração com solvente orgânico. O processo de saponificação permite o rompimento das ligações dos ésteres na matriz lipoproteica, com liberação de ácidos graxos, glicerol, fosfolipídeos e outras moléculas. As vitaminas lipossolúveis como a vitamina A encontram-se nas frações insaponificáveis e, com este procedimento, as formas esterificadas da vitamina A são convertidas em formas alcoólicas livres, permitindo a quantificação. Por outro lado, pode ocorrer degradação destas vitaminas, dependendo das condições de saponificação, ou ainda, pela presença de impurezas nos solventes utilizados na extração¹⁵. De acordo com o método descrito na AOAC¹⁴, recomenda-se 18 h, à temperatura ambiente, para a saponificação dos ésteres de vitamina A. Por ser um período de tempo relativamente longo, foram realizadas tentativas de redução do tempo com o aumento

da temperatura: foram avaliados cinco diferentes tempos (30, 45, 60, 90 e 120 min) a 45°C, utilizando-se amostras de leite pasteurizado integral enriquecidos com padrão de palmitato de retinol. Os resultados de vitamina A foram comparados com os valores obtidos pela saponificação em temperatura ambiente durante 16 h. Quanto maior a área do pico cromatográfico do palmitato de retinol, menor a conversão deste para a sua forma livre, ou seja, menor a eficiência da condição estabelecida para a saponificação. Comparando-se as áreas dos picos cromatográficos de retinol livre e do palmitato de retinol, verificou-se que apenas na amostra saponificada por 16 h houve conversão do palmitato para a forma livre numa proporção superior a 99%.

Foram ainda avaliados os antioxidantes BHT, pirogalol e ácido ascórbico, ao se realizar análises de recuperação do padrão de *all-trans*-retinol adicionado na amostra de leite pasteurizado integral, após 16 h de saponificação, e verificar a atividade de proteção da vitamina A. A maior recuperação foi observada no ensaio utilizando-se o BHT (98%), seguido do ácido ascórbico (85%) e, por último, o pirogalol (80%). O uso do ácido ascórbico ocasionou efervescência da amostra durante a agitação, favorecendo a perda do analito e, assim como o pirogalol, ambos não ofereceram proteção adequada da vitamina A, provavelmente por apresentarem características hidrossolúveis¹⁵.

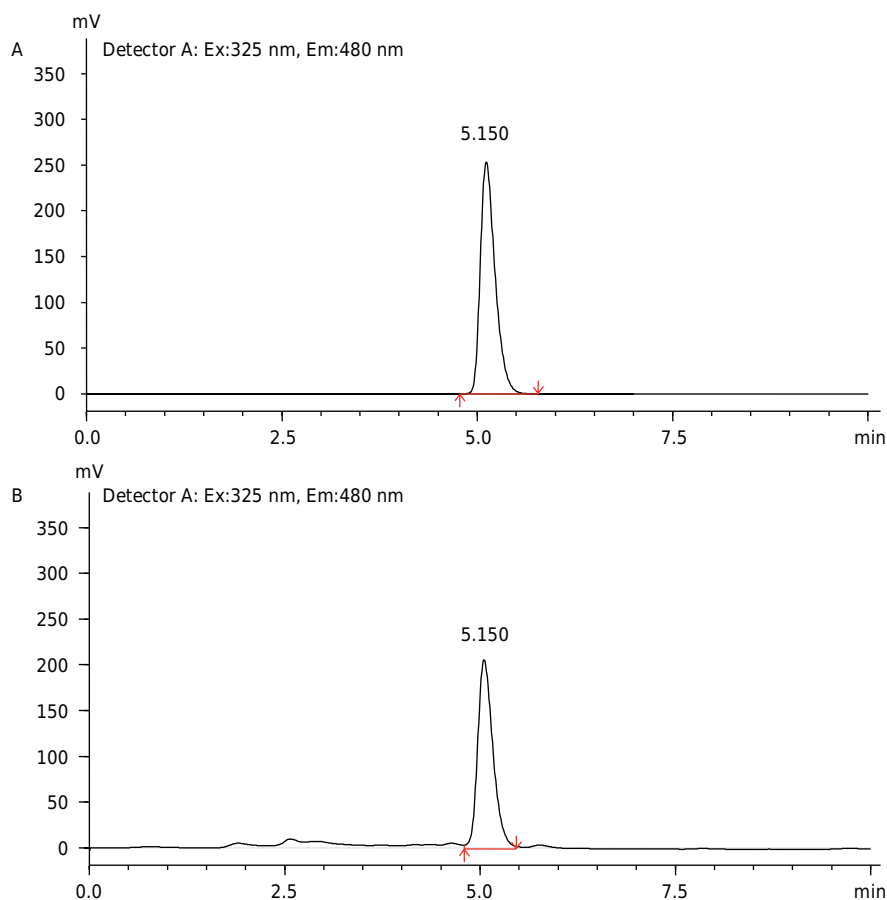


Figura 1. Cromatogramas da solução padrão de *all-trans*-retinol a 1.800 ng.mL⁻¹ em metanol (A) e do extrato de amostra de leite pasteurizado enriquecido com vitamina A em metanol (B). Condições cromatográficas: coluna C18 (250 mm x 4,6 mm; 5µm); fase móvel: 100% metanol; fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático.



Validação

Seletividade: A análise visual das inclinações das retas dos resultados obtidos com as matrizes (leite pasteurizado e leite UHT desnatado) fortificadas com o padrão de *all-trans*-retinol indicou que, aparentemente, não havia interferência de matriz; isto foi confirmado estatisticamente pelo teste *t* de *Student* para os coeficientes angulares. Os valores de *t* calculados ($t_{\text{calc leite UHT}} = 0,362$ e $t_{\text{calc leite pasteurizado}} = 1,014$) foram menores do que os tabelados ($t_{\text{tab leite UHT e pasteurizado}} = 2,069$), com confiança de 95%.

Como os resultados mostraram que não existia interferência de matriz, os cálculos para estudos de linearidade, LD e LQ, precisão e exatidão foram realizados usando a curva de calibração sem a matriz.

Linearidade e Faixa de Trabalho: Em cada nível de concentração, foi aplicado o teste de *Grubbs* e foi verificada a ausência de valores aberrantes.

Na curva de calibração, foi possível avaliar a dispersão das medidas em função da concentração; uma vez que a condição de variância seja uniforme, é chamada homocedasticidade. Para verificar se o sistema é homocedástico (variâncias iguais) ou heterocedástico (variâncias diferentes), foi aplicado o teste de *Cochran*. O valor de C_{calc} foi de 0,50 para um C_{tab} de 0,61 (triplicata em seis níveis de concentração, com confiança de 95%), confirmando que o sistema é homocedástico, ou seja, possui variâncias semelhantes ao longo da faixa de trabalho. O gráfico de resíduos da curva analítica de calibração apresentou distribuição aleatória, livre de tendências.

O coeficiente de determinação (R^2) forneceu um indicativo de quanto a reta pode ser considerada como modelo matemático, uma vez que o valor encontrado foi de 0,9997, próximo de 1, indicando que o método foi linear dentro da faixa de trabalho proposta.

LD e LQ: O primeiro ponto da curva de calibração ($215,0 \text{ ng.mL}^{-1}$) foi estabelecido como o limite de quantificação. Os resultados das análises das seis replicatas de leite UHT desnatado fortificadas com padrão de *all-trans*-retinol neste nível de concentração não apresentaram valores aberrantes, pois, no teste de *Grubbs*, valores de *G* calculados (1,685 e 1,045) foram menores do que o tabelado (2,126, com 95% de confiança). O RSD foi inferior a 10%, indicando que o método possui precisão adequada, ou seja, é repetitivo. O limite de detecção foi calculado pela fórmula $LD = LQ/3,3$, resultando em um valor de $65,1 \text{ ng.mL}^{-1}$.

Exatidão: Os resultados dos ensaios de recuperação de vitamina A adicionada nas matrizes estão apresentados na Tabela, e as porcentagens de recuperação da adição de *all-trans*-retinol em todos os níveis apresentaram-se dentro do critério estabelecido, com valores entre 95% e 110%, indicando uma recuperação adequada.

Precisão: Para o estudo da repetibilidade, foram utilizados os resultados obtidos no teste de recuperação de amostras fortificadas, calculando-se o desvio-padrão para cada nível de

concentração e o desvio-padrão relativo. Concluiu-se que o método atende ao critério de repetibilidade estabelecido em toda a faixa de trabalho, apresentando RSD inferiores a 10% (Tabela).

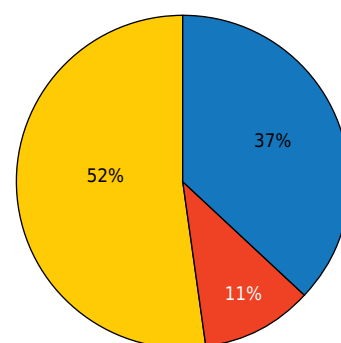
Análise de vitamina A em leites enriquecidos

O teor de vitamina A declarado na informação nutricional da rotulagem das amostras de leite pasteurizado é $120 \mu\text{g}$ equivalentes de retinol (ER) em 200 mL, porção correspondente a um copo. Segundo a Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/MS (Anvisa/MS), referente à informação nutricional de alimentos embalados, admite-se uma tolerância de 20% com relação aos valores declarados no rótulo, tornando aceitáveis resultados analíticos de vitamina A entre 96 e $144 \mu\text{g}$ ER na porção¹⁶. A Figura 2 representa as porcentagens das amostras com teores de vitamina A em conformidade, acima e abaixo dos valores declarados na informação nutricional da rotulagem.

Tabela. Ensaios de recuperação e desvio-padrão relativo (RSD) da vitamina A em leites pasteurizado integral e ultra high temperature (UHT) desnatado.

Matriz (Vitamina A em ng.mL^{-1})	Padrão adicionado (ng.mL^{-1})	Recuperação (%)	RSD (%)
Leite pasteurizado integral (768,9)*	594,3	101,1	5,2
	1.816,4	100,3	5,6
	3.527,3	104,5	5,1
Leite UHT desnatado (53,7)*	284,3	107,9	2,4
	1.137,1	105,3	3,3
	3.411,5	100,2	6,2

* Concentrações de vitamina A analisadas nas matrizes sem adição de padrão; análises realizadas em triplicata, em cada nível de fortificação, com adição de padrão de *all-trans*-retinol.



- Amostras em conformidade com a legislação 37%
- Amostras com teores de vitamina A abaixo dos valores declarados 11%
- Amostras com teores de vitamina A acima dos valores declarados 52%

Figura 2. Porcentagens das amostras de leite pasteurizado analisadas, com teores de vitamina A em conformidade, acima e abaixo dos valores declarados na informação nutricional da rotulagem.



Das 261 amostras analisadas, 136 (52%) apresentaram teores de vitamina A acima do valor declarado, sendo que, em 51% delas, os valores estavam entre 144 e 200 µg ER, em 48% entre 200 e 300 µg ER e uma amostra apresentou teor acima de 300 µg ER na porção.

Observou-se uma quantidade significativa de amostras com teores de vitamina A acima do valor declarado, o que provavelmente ocorre porque o leite já possui naturalmente uma quantidade da vitamina. Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo (TBCA-USP)¹⁷, a concentração de vitamina A em leite integral pasteurizado situa-se entre 42 e 54 µg ER em 100 mL. Essas concentrações podem variar de acordo com a alimentação, raça e qualidade genética dos animais, além das condições ambientais em que os animais se desenvolvem¹⁸. Muitas usinas beneficiadoras provavelmente ignoram a quantidade de vitamina pré-existente no leite e adicionam o micronutriente com o intuito de obter um valor próximo ao declarado na rotulagem.

A Resolução RDC nº 360/2003 da Anvisa/MS estabelece que, para produtos que contenham micronutrientes em quantidade superior à tolerância de 20%, a empresa responsável deve manter a disposição os estudos que justifiquem tal variação¹⁶. A mesma observação em relação à sobredosagem de micronutrientes é verificada na Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998, da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do MS: Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais¹⁹. Sendo assim, seria permitida uma sobredosagem de vitamina A, pois esta é suscetível à degradação quando exposta à luz, a altas temperaturas e ao oxigênio¹⁵. Esta sobredosagem de vitamina A encontrada nas amostras analisadas provavelmente tem como objetivo garantir as concentrações do micronutriente declaradas até o prazo final de validade do produto, prevenindo sua possível degradação.

A RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005, da Anvisa/MS, estabelece os valores de ingestão diária recomendada considerando a necessidade de orientar consumidores e produtores de alimentos sobre os valores recomendados de proteínas, vitaminas e minerais². A IDR corresponde à quantidade de nutrientes a serem consumidos diariamente para atender as necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia e foram estabelecidos com base nas referências da *Food and Agriculture Organizations of the United Nations* (FAO) e do *Institute of Medicine* (IOM)^{2,20,21}. Além das recomendações de ingestão, o IOM estabelece ainda o limite superior tolerável de ingestão (*tolerable upper intake level* - UL) para alguns micronutrientes. O UL é o valor mais alto de ingestão diária continuada de um nutriente que aparentemente não oferece risco de efeito adverso à saúde para a maioria dos indivíduos de um determinado grupo²¹.

Os níveis de vitamina A acima do valor declarado observados nestes leites provavelmente não representam riscos à saúde, pois o limite superior tolerável de vitamina A é de 3.000 µg ER por dia para um adulto saudável, de acordo com o IOM²¹. Dificilmente se alcançaria esta dose limite de vitamina A com o consumo dos leites pasteurizados, pois a população que se beneficia deste Programa é de baixa renda, na maioria dos casos, sem acesso a uma alimentação nutricionalmente adequada.

A quantidade de vitamina A estabelecida para os leites deste Programa (120 µg ER por porção) corresponde a 20% da IDR de vitamina A para um adulto saudável e cerca de 24% para crianças¹⁹. O intuito deste Programa é oferecer um alimento nutritivo para uma população com tendência à desnutrição, portanto a vitamina A deve ser adicionada no leite na quantidade mínima estabelecida.

Em relação às amostras que apresentaram concentrações de vitamina A abaixo do valor declarado, o menor valor encontrado foi de 63,0 µg ER na porção. Baixos teores de vitamina A podem ser decorrentes da falta de homogeneização durante o processo de incorporação do *mix* de nutrientes, ou pela ausência de enriquecimento do produto, ou mesmo pela sua degradação.

CONCLUSÕES

O método analítico otimizado e validado estabelecido para a determinação de vitamina A em leites fluidos demonstrou possuir seletividade, precisão e exatidão, permitindo obter resultados confiáveis nas análises laboratoriais de rotina.

A aplicação do método na análise dos leites pasteurizados enriquecidos indicou que 52% das amostras apresentaram sobredosagem de vitamina A, porém, estes níveis não representam riscos à saúde do consumidor, tendo em vista que este leite é distribuído para a população de baixa renda com tendência à desnutrição.

Os resultados das análises de vitamina A abaixo do valor declarado observados nas amostras podem indicar ausência de enriquecimento ou falta de controle durante o processo. A falta de enriquecimento por parte das usinas é um fato alarmante e deve ser tratado com atenção pelos órgãos de Vigilância Sanitária, pois isto compromete o objetivo do programa do governo, que visa reduzir a deficiência de vitamina A na população carente.

A vitamina A é essencial ao sistema imunológico, visual e para a manutenção das funções celulares. Logo, o monitoramento dos teores desta vitamina em leites enriquecidos deve ser constante, incluindo ações corretivas para sanar as eventuais falhas no processo de enriquecimento e garantir a oferta de um produto adequado para a população beneficiada pelo Programa.

REFERÊNCIAS

1. Mahan LK, Escott-Stump S. Krause alimentos, nutrição e dietoterapia. 12a ed. São Paulo: Elsevier; 2010.
2. Ministério da Saúde (BR). Resolução RDC Nº 269, de 22 de setembro de 2005. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Diário Oficial União. 23 set 2005.



3. Queiroz D, Paiva AA, Pedraza DF, Cunha MA, Esteves GH, Luna JG et al. Deficiência de vitamina A e fatores associados em crianças de áreas urbanas. *Rev Saúde Pública*. 2013;47(2):248-56. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047002906>
4. Pedraza DF, Rocha ACD. Deficiências de micronutrientes em crianças brasileiras assistidas em creches: revisão da literatura. *Cienc Saúde Coletiva*. 2016;21(5):1525-44. <https://doi.org/10.1590/1413-81232015215.20712014>.
5. Chiu M, Dillon A, Watson S. Vitamin A deficiency and xerophthalmia in children of a developed country. *J Paediatr Child Health*. 2016;52(7):699-703. <https://doi.org/10.1111/jpc.13243>
6. Secretaria de Desenvolvimento Social (São Paulo). Programas da Secretaria de Desenvolvimento Social: Viva leite. 2017[acesso 25 ago 2017]. Disponível em: <http://www.desenvolvimentosocial.sp.gov.br/portal.php/vivaleite>
7. World Health Organization - WHO. The optimal duration of exclusive breastfeeding: Report of the expert consultation. Geneva: World Health Organization; 2001.
8. Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. A importância do consumo de leite no atual cenário nutricional brasileiro. [S.l.]: Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição; 2015[acesso 22 ago 2017]. Disponível em: <http://bit.ly/2k4gyZ6>
9. Marques MF, Marques MM, Xavier ER, Gregório EL. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. *HU Revista*. 2012;38(1-2):29-36.
10. Yeh EB, Barbano DM, Drake M. Vitamin fortification of fluid milk. *J Food Sci*. 2017;82(4):856-64. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13648>
11. Woolard DC, Bensch A, Indyk H, McMahon A. Determination of vitamin A and vitamin E esters in infant formulae and fortified milk powders by HPLC: use of internal standardization. *Food Chem*. 2016;197(Pt A):457-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.077>
12. Plozza T, Trenerry VC, Caridi D. The simultaneous determination of vitamins A, E and B-carotene in bovine milk by high performance liquid chromatography: ion trap mass spectrometry (HPLC-MSⁿ). *Food Chem*. 2012;134(1):559-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.121>
13. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro. DOQ-CGCRE-008 revisão 05: Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; 2016[acesso 06 mar 2018]. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf
14. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 18 ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists; 2005.
15. Ball GFM. Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability. Boca Raton: CRC Press; 2006.
16. Ministério da Saúde (BR). Resolução RDC Nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial União*. 26 dez 2003.
17. Tabela brasileira de composição de alimentos: Versão 5.0, 2008[acesso 25 jul 2017]. Disponível em: http://www.fcf.usp.br/tabela/buscar_alim.asp
18. Faria GHF, Vieira DAP, Machado SS. Comparação da composição do leite em diferentes espécies: uma revisão. *Cad Educ Tecnol Soc*. 2008;1(1):104-8. <https://doi.org/10.14571/cets.v1i1.134>
19. Ministério da Saúde (BR). Portaria Nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais, constante do anexo desta Portaria. *Diário Oficial União*. 16 jan 1998.
20. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, World Health Organization - WHO. Human vitamin and mineral requirements. Rome: Food and Nutrition Division; 2001.
21. The National Academies of Sciences Engineering Medicine. Dietary reference intakes tables and application. Washington, DC: National Academy of Sciences; 2017[acesso 22 ago 2017]. Disponível em: <http://www.nationalacademies.org/DRIs>

Agradecimentos

À Célia Maria Gaudêncio e à Roberta Francese Paiva, pelo auxílio técnico prestado na execução deste trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.