



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**JONAS LIRA DO NASCIMENTO**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DE VITAMINA D**

**CAMPINA GRANDE  
2022**

JONAS LIRA DO NASCIMENTO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DE VITAMINA D**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

**Área de concentração:** Farmácia

**Orientador:** Prof. Me. Carlos Arthur Gouveia Veloso

**Coorientadora:** Me. Fernanda Pontes Nóbrega

**CAMPINA GRANDE  
2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

N244v Nascimento, Jonas Lira do.  
Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de vitamina D [manuscrito] / Jonas Lira do Nascimento. - 2022.  
42 p. : il. colorido.

Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.  
"Orientação : Prof. Me. Carlos Arthur Gouveia Veloso , Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."  
"Coorientação: Profa. Ma. Fernanda Pontes Nóbrega , UFPE - Universidade Federal de Pernambuco"

1. Vitamina D. 2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 3. Políticas públicas. 4. Suplementação nutricional. I. Título  
21. ed. CDD 615.328

JONAS LIRA DO NASCIMENTO

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DE VITAMINA D

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Farmácia

Aprovada em: 25/07/2022.

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Me. Carlos Arthur Gouveia Veloso (Orientador)  
Me. Fernanda Pontes Nóbrega (Coorientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Paulo César Dantas da Silva  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Oliveira da Silva Simões  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

A minha mãe pelo amor, dedicação e esforço durante esses anos, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar a oportunidade de hoje estar concluindo uma etapa tão importante da minha vida, que é a graduação.

À minha família, principalmente minha mãe, que é a maior merecedora desse diploma, por sua paciência, dedicação, sacrifício e amor.

À minha irmã, colega e amiga Kamilla, por todo o companheirismo nesses anos de luta na graduação, dos projetos, monitorias, estágios e tantos outros momentos.

À Paulo, por toda sua ajuda, incentivo e cuidado nesse tempo de pesquisa, que com certeza não teria sido concluída sem sua ajuda.

À Fernanda, que incessantemente esteve disposta e solícita para nos ajudar e explicar as coisas quando não compreendemos.

À Arthur, por se dispor tão prontamente e aceitar o convite, mesmo que de última hora.

À professora Mônica, por aceitar o convite, mesmo com suas dificuldades pessoais.

À professora Rose, que com sua atenção e incentivo foi fundamental para que eu pudesse conhecer e me aprofundar na extensão e pesquisa.

À minha turma, que esteve comigo durante esses cinco anos e foi, sem dúvidas, essencial na minha experiência no curso de farmácia.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), em especial a coordenação de farmácia, que facilitou a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste/UEPB (CERTBIO/UEPB) por permitir livremente e colaborar para que a pesquisa fosse realizada nos laboratórios.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por permitir a realização dos testes nas suas dependências.

À Pharmapele por disponibilizar voluntariamente os insumos necessários para a realização das análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo persistente à pesquisa.

Muito obrigado a todos que, de alguma forma, influenciaram e contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

A hipovitaminose D é uma deficiência demasiada comum a nível global, e isso pode acarretar em graves problemas de saúde, tanto a curto como a longo prazo. Sabendo que a alternativa mais comum para a resolução dessa situação é a suplementação nutricional, e que esse tipo de produto é negligenciado em termos de políticas públicas de controle de qualidade, tem-se a necessidade de implementá-las a fim de garantir a segurança para o seu uso. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) capaz de quantificar a vitamina D, bem como realizar caracterização com estudos de análise térmica e espectroscópica. Para validação foram realizadas análises em CLAE, com soluções em seis níveis de concentração diferentes (2,0 a 7,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), com base na RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da ANVISA, que determina a avaliação dos parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de qualidade (LQ) e robustez. Já para caracterizar o do insumo farmacêutico utilizado foram realizadas Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), a fim de assegurar sua qualidade. Após a realização das análises o método analítico foi aprovado em todos os parâmetros avaliados na CLAE, e pôde ser considerado válido, enquanto que a análise térmica e espectroscópica mostraram resultados positivos e em conformidade com a literatura. Portanto, a validação do método em questão visa incentivar o controle de qualidade desse tipo de produto, assim como de políticas mais exigentes quanto a comercialização dos mesmos, tendo em vista o quanto sua ingestão, ou ausência desta, influencia no estado saúde-doença do paciente.

**Palavras-Chave:** Vitamina D; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; Políticas públicas; Suplementação nutricional.

## ABSTRACT

Vitamin D deficiency is an all-too-common deficiency globally, and this can lead to serious short-term and long-term health problems. Knowing that the most common alternative for solving this situation is nutritional supplementation and that this type of product is neglected in terms of public quality control policies, there is a need to implement them in order to guarantee safety for your use. The objective of this work was to develop and validate a good analytical method in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) capable of quantifying a vitamin D, such as characterization with studies of thermal and spectroscopic analysis. For tests carried out, they were prepared with solutions at six different concentration levels (2,0 to 7,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), based on RDC No. 166, of July 24, 2017, from ANVISA, which determines the evaluation of parameters, selectivity, linearity, precision, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and robustness. In order to characterize the pharmaceutical ingredient used, Thermogravimetry (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transform Infrared Region Spectroscopy (FTIR) were performed in order to ensure its quality. After carrying out the considered valid method in all parameters, the HPLC could be considered a thermal analysis and spectrum with the positive result and in general view. Therefore, the validation of the method in question aims to control the quality of this type of product, as well as its more efficient policies regarding their production, considering how much their ingestion, or absence of health-disease status of the patient.

**Keywords:** Vitamin D; High Performance Liquid Chromatography; Public policy; Nutritional supplementation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura do calcitriol .....	16
Figura 2 – Síntese do calcitriol.....	17
Figura 3 – Curvas TG/DTG da vitamina D <sub>3</sub> .....	30
Figura 4 – Termograma obtido por DSC da vitamina D <sub>3</sub> .....	31
Figura 5 – Espectro de absorção na região do infravermelho médio para a vitamina D <sub>3</sub> ..	32
Figura 6 – Cromatograma da vitamina D <sub>3</sub> .....	33
Figura 7 – Curva analítica de calibração da vitamina D <sub>3</sub> .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de robustez modificados e variações.....	28
Tabela 2 – Dados obtidos das áreas para construção da curva analítica da vitamina D.....	34
Tabela 3 – Precisão interdia dos 3 níveis de concentração estabelecidos.....	35
Tabela 4 – Precisão interanalista dos 3 níveis de concentração estabelecidos.....	35
Tabela 5 – Exatidão dos 3 níveis de concentração estabelecidos.....	36
Tabela 6 – Dados da variação do parâmetro comprimento de onda (260 e 270 nm).....	37
Tabela 7 – Dados da variação do parâmetro temperatura (38 e 42 °C).....	37
Tabela 8 – Dados da variação do parâmetro vazão (0,08 e 0,12 mL,min-1).....	38

--	--	--

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-DHC	7-dehidrocolesterol
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DRX	<i>Difratometria de Raios X</i>
DTG	<i>Derived Thermogravimetry</i>
EM	<i>Espectroscopia de Massas</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectrometer</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDR	Ingestão Diária Recomendada
MS	Ministério da Saúde
PTH	Paratormônio
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo
SBPC/ML	Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
SIABI	Sistema Integrado de Automação de Bibliotecas.
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TG	Termogravimetria
TGA	<i>Differential Thermal Analysis</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	14
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	14
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
<b>3.1 Vitamina D</b> .....	15
<b>3.2 Hipovitaminose D</b> .....	17
<b>3.3 Controle de qualidade de suplementos nutricionais</b> .....	18
<b>3.4 Validação de método analítico</b> .....	18
<b>3.4.1 Seletividade</b> .....	19
<b>3.4.2 Linearidade</b> .....	19
<b>3.4.3 Precisão</b> .....	19
<b>3.4.4 Exatidão</b> .....	20
<b>3.4.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)</b> .....	20
<b>3.4.6 Robustez</b> .....	20
<b>2.5 Caracterização térmica de insumos farmacêuticos</b> .....	21
<b>3.5.1 Termogravimetria (TG)</b> .....	21
<b>3.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</b> .....	21
<b>3.6 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	22
<b>3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	22
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>4.1 Material</b> .....	24
<b>4.1.1 Insumo Farmacêutico</b> .....	24
<b>4.1.2 Solventes</b> .....	24
<b>4.1.3 Equipamentos e materiais</b> .....	24
<b>4.2 Métodos</b> .....	24

<b>4.2.1 Termogravimetria (TG)</b> .....	24
<b>4.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</b> .....	25
<b>4.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	25
<b>4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	25
<b>4.2.5 Desenvolvimento e validação da metodologia</b> .....	25
4.2.5.1 Preparo de solução-mãe e soluções de trabalho.....	26
4.2.5.2 Seletividade.....	26
4.2.5.3 Linearidade.....	26
4.2.5.4 Precisão.....	26
4.2.5.5 Exatidão.....	27
4.2.5.6 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	27
4.2.5.7 Robustez.....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>5.1 Termogravimetria (TG)</b> .....	29
<b>5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</b> .....	29
<b>5.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	30
<b>5.4 Desenvolvimento e validação da metodologia</b> .....	31
5.4.1 Seletividade.....	31
5.4.2 Linearidade.....	32
5.4.3 Precisão.....	33
5.4.4 Exatidão.....	35
5.4.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	35
5.4.6 Robustez.....	35
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39

## 1 INTRODUÇÃO

A descoberta da vitamina D é relativamente recente, tendo Adolf Windaus, a identificado em 1925, e ganhado o prêmio Nobel por isto em 1928. Adolf e seu grupo de pesquisa isolaram o ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) e colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>), que são as formas nutricionais mais importantes da vitamina D. E com isso, foi possível o início de diversas pesquisas nas décadas seguintes, que envolviam sua síntese, estrutura química, estabilidade, e principalmente funções metabólicas (SOUSA, 2016; JONES, 2022).

Dentre as várias funções metabólicas da vitamina D, a que mais popularizou-se desde o início das pesquisas foi a relacionada ao metabolismo ósseo. Logo, não demorou muito tempo até que as alternativas de suplementação e a indicação dessas surgissem e se tornassem comuns à população, em especial ao público idoso e infantil. Porém, mesmo diante dessas opções e de todo conhecimento adquirido ao longo das décadas, atualmente estima-se que haja em torno de 1 bilhão de pessoas com deficiência de vitamina D (hipovitaminose D), o que a caracteriza como um problema de saúde pública (LINDEN, 2019).

Considerando que a maior fonte de energia disponível no planeta é proveniente do sol, o mecanismo de adaptação do ser humano durante sua evolução promoveu uma dependência quase que unicamente dessa fonte para a síntese de vitamina D. Isto posto, é possível evidenciar através de pesquisas e estudos, que a baixa exposição à luz solar está diretamente relacionada à deficiência da vitamina D. Além disso, fatores intrínsecos e outros fatores extrínsecos também são responsáveis por influenciar na exposição que as pessoas têm diariamente à luz solar. (SANTOS, 2020)

Os fatores intrínsecos são aqueles relacionados à população, como questões culturais, ausência de tempo dedicado a banhos de sol, características fenotípicas, distúrbios de saúde (fotossensibilidade, fotofobia, albinismo, vitiligo, etc.), entre outros. Já os fatores extrínsecos são os que não dependem da população, como incidência solar, clima, localização de moradia, situações atípicas, a exemplo da pandemia COVID-19 causada pelo coronavírus, entre outros. E em situações atípicas que induzem um isolamento em massa, como na citada, foi observada que as solicitações de dosagens sorológicas de vitaminas, em especial da D, aumentaram, assim como a sua suplementação (RIZZATTI, 2011; SANTOS, 2020).

A suplementação de vitamina D pode ser vista tanto como uma solução, como até um problema, isso porque o excesso de vitamina D pode ocasionar uma intoxicação que, embora seja rara, quando acontece pode levar a hipercalcemia aguda (provocando confusão mental, poliúria, polidipsia, anorexia, vômitos, fraqueza muscular e até lesão cerebral em crianças),

consequente agravamento nos quadros de insuficiência renal e, em casos graves, desmineralização óssea e sensação dolorosa. Esse tipo de situação é ainda mais frequente em condições onde a suplementação ocorre de forma coletiva e mais intensa que o habitual (BISINOTTO; MARINS, 2014).

Porém, quando trata-se da deficiência dessa vitamina os valores de grande parte da população, singularmente das crianças, não encontram-se na faixa ideal. Em 2017 a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo (SBEM) realizaram um consenso e decidiram fazer uma revisão dos valores de referência para vitamina D, até então vigentes no Brasil. Ao final do consenso ficou acordado os seguintes valores de referência: para população saudável (até 60 anos) - até 20 ng/mL; para grupos como idosos, gestantes, lactantes, pessoas com patologias específicas (como raquitismo/osteomalácia, osteoporose, hiperparatireoidismo, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, doença renal crônica e síndromes de má absorção) e com histórico de quedas e fraturas - entre 30 e 60 ng/mL; e valores acima de 100 ng/mL caracterizam um risco de toxicidade e hipercalemia (FERREIRA, 2017).

Atualmente, tem-se um problema quanto ao controle de qualidade dos suplementos vitamínicos, que não possuem obrigações legais rígidas o suficiente para que seja garantida a qualidade do produto ingerido pelo consumidor. Com isso, tem-se técnicas instrumentais estão sendo utilizadas a fim de quantificar os insumos presentes nesses produtos, sendo uma delas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), também conhecida como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Além disso, o emprego de análises térmicas e espectroscópicas também é feito com o objetivo de caracterizar e determinar a qualidade do insumo farmacêutico presente nas formulações.

Então, com base nessas recentes mudanças nos parâmetros referenciais para a suplementação de vitamina D no Brasil, bem como na ausência de uma legislação que exija mais com relação ao desenvolvimento e controle de qualidade de suplementos vitamínicos, se faz necessário avaliar a influência dessa suplementação no desenvolvimento metabólico. Portanto, este trabalho tem como objetivo validar um método analítico que seja capaz de quantificar a vitamina D, em especial a D<sub>3</sub>, em soluções líquidas, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Também, de forma complementar, será realizada a caracterização do padrão utilizado na validação por meio de análise térmica, Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), e espectroscópica, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (BRASIL, 2018).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Validar um método analítico para quantificação de vitamina D em soluções líquidas, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar padrão de vitamina D<sub>3</sub> por meio de Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Desenvolver e validar método analítico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com base na RDC nº 166/2017, que seja capaz de quantificar a vitamina D<sub>3</sub>.

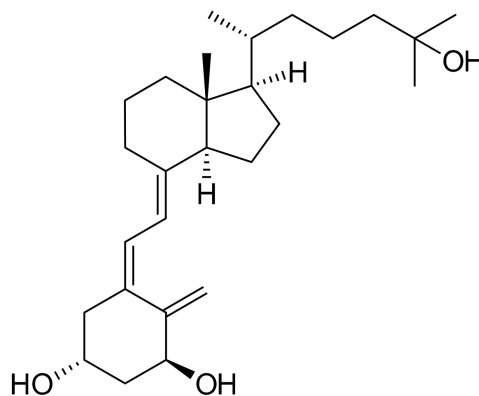


### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Vitamina D

A vitamina D trata-se na verdade de um conjunto de moléculas esteroides, portanto o termo refere-se tanto a sua forma ativa (1,25-dihidroxicolecalciferol ou calcitriol - Figura 1) como aos seus precursores (vitamina D<sub>2</sub> ou ergosterol, vitamina D<sub>3</sub> ou colecalciferol e a 25-hidroxitamina D ou calcidiol). Essa vitamina é um hormônio sintetizado *in vivo* através da incidência solar dos raios UVB (290 e 315 nm) na pele, sendo esta via de obtenção responsável por 80-95% de toda vitamina D do organismo. A síntese (Figura 2) é iniciada na epiderme onde o precursor do colesterol, 7-deidrocolesterol (7-DHC), presente na membrana das células, convertido em pré-vitamina D<sub>3</sub>. Sendo que caso haja uma desregulação positiva no metabolismo da enzima 7-deidrocolesterol redutase, que é responsável pela conversão do 7-DHC em colesterol, isso ocasiona em uma baixa concentração de 7-DHC e, conseqüentemente em concentrações diminuídas de calcitriol (CASTRO, 2011; KRATZ, 2018).

**Figura 1** - Estrutura do calcitriol

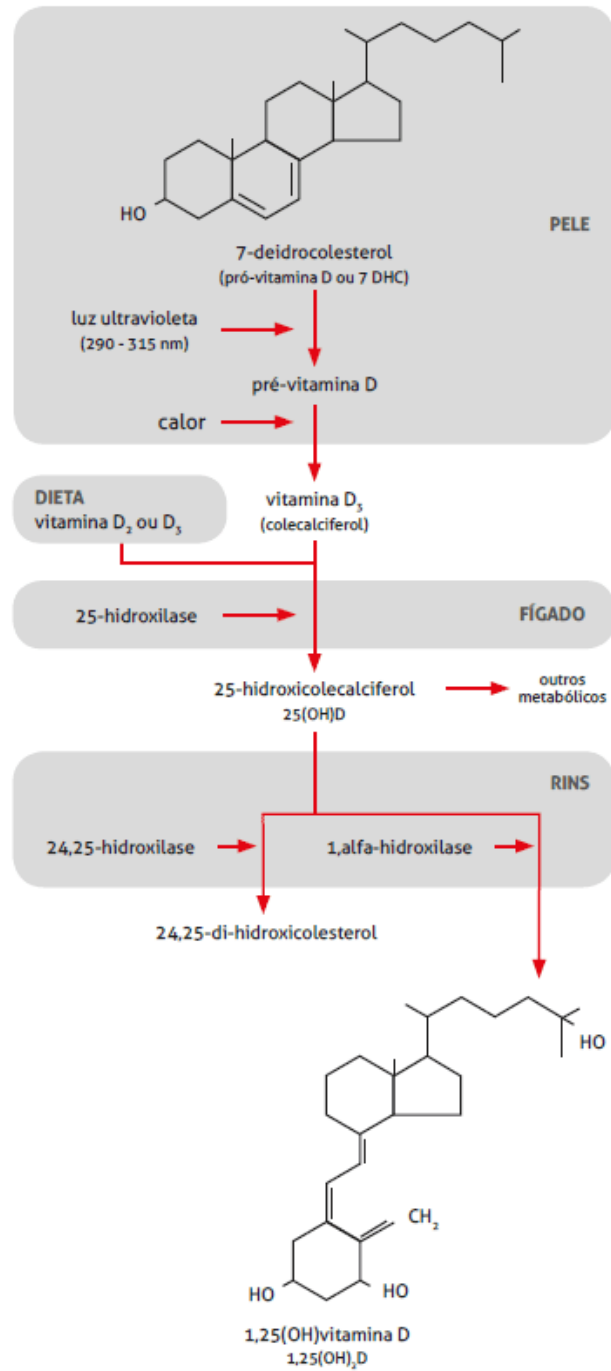


**Fonte:** Elaborada pelo autor, 2022.

A absorção dos raios UVB pelo 7-deidrocolesterol provoca uma clivagem fotoquímica entre os carbonos 9 e 10 do anel B, formando a pré-vitamina D<sub>3</sub>, que por sua vez é instável termicamente, e é convertida, através de isomerização, na vitamina D<sub>3</sub> propriamente dita, a fim de se tornar mais estável. Já a vitamina D<sub>2</sub>, é caracterizada atualmente como menos potente do que a D<sub>3</sub>, no que diz respeito à conversão em sua forma ativa, já que apresenta uma meia vida menor que a D<sub>3</sub>. Essa conversão na forma ativa inicia-se no fígado (Figura 2), onde as formas D<sub>3</sub> e D<sub>2</sub> são hidroxiladas no carbono 25 pela enzima 25-hidroxilase originando o 25-dihidroxicolecalciferol, que é transportado para diferentes tecidos, como os rins, e

hidroxilado pela enzima 1- $\alpha$ -hidroxilase, sendo então convertido em sua forma ativa, 1, 25-dihidroxicolecalciferol ou calcitriol (CASTRO, 2011).

**Figura 2 - Síntese do calcitriol.**



**Fonte:** GALVÃO (2013).

A vitamina D possui diversas funções metabólicas, principalmente regulando as concentrações séricas e extracelulares de cálcio e fósforo. Com esse tipo de regulação a mesma é importante no metabolismo ósseo, já que é responsável pelo aumento da absorção

intestinal e renal de cálcio. Mas, atualmente já se sabe que a vitamina D também está relacionada com a regulação de magnésio, secreção pancreática de insulina, inibição da produção de renina, excreção de creatinina, secreção de prolactina, sinalização celular e até mesmo com a expressão gênica associada aos seus receptores (*Vitamin-D receptor-VDR*), que estão presentes em diferentes tipos celulares. Muitas dessas funções foram mais estudadas durante a pandemia COVID-19, por exemplo, com o objetivo de identificar alguma relação e influência da vitamina D<sub>3</sub> com a doença, já que a mesma trata-se de uma virose e está diretamente associada com a imunidade (GALVÃO, 2013; RAFAELLI, 2015).

### **3.2 Hipovitaminose D**

A hipovitaminose D é extremamente comum em todo o planeta, mesmo frente às diversidades socioeconômico-culturais, e pode ocorrer basicamente em decorrência de fatores fisiológicos, muitas vezes relacionados à baixa exposição aos raios UV, doenças hepáticas e/ou renais, doenças autoimunes, obesidade, neoplasias, ou ainda relacionados a secreção do paratormônio (PTH), produzido pela tireoide, que é um importante estimulador da conversão de 25-hidroxivitamina D em sua forma ativa. Essa deficiência acontece em virtude, sobretudo, da baixa produção da vitamina D na pele e, além de agravar patologias pré-existentes, pode levar ao surgimento de novas, como osteoporose, cancro cutâneo, hipertensão arterial sistêmica, doença inflamatória intestinal, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, etc. (SOUSA, 2016; SANTOS, 2020).

Esse tipo específico de hipovitaminose D trata-se de uma deficiência bastante comum entre as crianças, desde recém-nascidos até as maiores, com 12 anos. E, pelo fato da vitamina D estar necessariamente relacionada ao desenvolvimento esquelético, essa população específica torna-se mais suscetível a problemas ósseos, tanto na própria infância, como na vida adulta. Dentre alguns distúrbios músculo-esqueléticos estão o raquitismo, adinamia, hipocalcemia, espasmos musculares e a deformidade esquelética propriamente dita. Mesmo perante o avanço nas análises clínicas e, conseqüentemente, nas formas de diagnóstico laboratorial, ainda hoje o diagnóstico de hipovitaminose D é negligenciado. Portanto, quando descoberta, a suplementação deve ser iniciada o quanto antes a fim de restabelecer os níveis séricos normais desse hormônio, já que sua deficiência pode levar a conseqüências mais graves a longo prazo (LEÃO, 2013; LUIZ, 2018).

No caso de suplementação de vitamina D, o Departamento de Nutrologia da Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP), recomenda que na infância seja realizada, profilaticamente, uma suplementação de 400 UI/dia (até os 12 meses) e 600 UI/dia (dos 12 aos 24 meses), incluindo

as crianças que estão em fase de aleitamento. A SBP também destaca a necessidade da exposição regular à luz solar, sendo necessário para crianças no primeiro ano de vida cerca de 30 minutos/semana de exposição, ou seja, seis a oito minutos/dia, três vezes na semana. Já quando se trata da população idosa também tem-se uma menor capacidade de produção de vitamina D diante da exposição solar, cerca de 20% do que um jovem adulto produziria, o que propicia uma recomendação de exposição ao Sol semelhante à indicada para as crianças, a fim de se obter níveis séricos normais de vitamina D (VAZ, 2017, TAVARES, 2022).

### **3.3 Controle de qualidade de suplementos nutricionais**

O uso dos suplementos nutricionais tem se difundido na população de forma expressiva nos últimos anos. E embora em alguns casos seja necessário o registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), esse tipo de produto não se enquadra em uma categoria específica, podendo ser classificado como forma farmacêutica ou mesmo alimento, dependendo de sua composição (FONTENELE, 2013).

A RDC nº 243, de 26 de julho de 2018 (ANVISA) enfatiza que os suplementos vitamínicos “são alimentos que servem para complementar com estes nutrientes a dieta” e “devem conter um mínimo de 25% e no máximo até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas e/ou minerais, na porção diária indicada pelo fabricante”, diferente dos medicamentos a base de vitaminas, que possuem como principal característica posologias que ultrapassam a IDR, apresentando um efeito mais expressivo. Daí a importância de políticas que requeiram um controle de qualidade mais exigente, principalmente com relação à disponibilidade de princípio ativo.

Logo, ponderando que uma das formas mais eficazes em termos de exigência para se garantir o controle de qualidade de um determinado produto é fazendo-se o uso da validação de uma metodologia, sua aplicação surge como uma alternativa interessante, assegurando confiabilidade dos resultados que serão obtidos a partir das análises (ROCHA, 2021).

### **3.4 Validação de método analítico**

Visando a importância do uso da validação de metodologias analíticas, em 24 de julho de 2017, o Ministério da Saúde, por meio da Diretoria Colegiada da ANVISA, realizou a publicação da RDC nº 166 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos, além de dar outras providências. Nessa resolução há parâmetros estabelecidos direcionados a insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção, podendo os suplementos vitamínicos serem sujeitos a essa investigação (BRASIL, 2017).

Segundo a RDC nº 166, na validação de um método os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de qualidade (LQ) e robustez, devem ser avaliados.

#### **3.4.1 Seletividade**

A seletividade de um método analítico “deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz” (BRASIL, 2017).

A resolução explicita que “no caso de métodos cromatográficos, deve ser comprovada a pureza cromatográfica do sinal do analito” e caso o analito apresente-se em uma matriz, “deve ser demonstrada sua capacidade de obter resultado positivo para amostra contendo o analito e resultado negativo para outras substâncias presentes na amostra” (BRASIL, 2017).

#### **3.4.2 Linearidade**

A linearidade “deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra”. Para avaliar a linearidade, “deve ser construído um gráfico das respostas frente a concentração da substância em questão”, e para isso “deve-se utilizar a equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados, e realizar-se uma avaliação da associação linear entre as variáveis do coeficiente de correlação (r) e de determinação (r<sup>2</sup>), bem como da significância do coeficiente angular”. Sendo que, o r “deve estar acima de 0,990”, enquanto que o r<sup>2</sup> “deve ser significativamente diferente de zero” e quanto mais próximo este for de 1, “melhor é a representação do modelo matemático expresso pela equação de reta” (ABE-MATSUMOTO, 2016; BRASIL, 2017).

#### **3.4.3 Precisão**

O parâmetro da precisão “deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado” e deve ser expresso “por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade”. A precisão será obtida pela dispersão dos resultados, neste caso é utilizado o cálculo do desvio padrão relativo (DPR):

$$DPR = \frac{DP}{\bar{X}} \cdot 100$$

Onde DP e  $\bar{X}$  são desvio padrão e média, respectivamente (BRASIL, 2017).

#### **3.4.4 Exatidão**

Trata-se de um parâmetro que deve ser determinado através “do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro”. São exigidas um mínimo de nove determinações, das quais três diferentes concentrações (baixa, média e alta) devem ser consideradas contemplando o intervalo linear do método analítico. Cada concentração será submetida a três réplicas. E o cálculo da exatidão deverá ser realizado pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental ou CA}}{\text{Concentração teórica ou CTA}} \cdot 100$$

Onde CA é a concentração experimental do analito e CTA a concentração teórica do analito (BRASIL, 2017).

#### **3.4.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)**

A determinação do limite de detecção (LD) deve ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva analítica, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado, sendo que o utilizado para determinação da razão sinal/ruído deve ser descrito e justificado (BRASIL, 2017).

Já o limite de quantificação (LQ) “é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas”. Recomenda-se que o LQ “deve ser coerente com o limite de especificação da impureza”, sendo “menor ou igual ao limite de notificação” (limite de detecção). Para determiná-lo deve ser feito o uso da razão sinal/ruído, onde a mesma deve ser no mínimo de 10:1. Já quando utiliza-se parâmetros da curva analítica, o LQ deve ser calculado pela fórmula:

$$LQ = \frac{DP \cdot 10}{IC}$$

Onde DP é o desvio padrão, e IC a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2017).

#### **3.4.6 Robustez**

É um parâmetro que indica a capacidade do método “em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas”. Para métodos quantitativos, “o impacto das

variações propostas nos resultados obtidos deverá ser avaliado com os mesmos critérios utilizados para a exatidão”. Já tratando-se de métodos qualitativos, recomenda-se avaliar se as variações propostas no método comprometem os resultados (BRASIL, 2017).

## **2.5 Caracterização térmica de insumos farmacêuticos**

A aplicação de técnicas de caracterização térmica são de suma importância para a avaliação da estabilidade térmica da amostra, tendo em vista que esse é um parâmetro essencial de ser conhecido, pois auxilia diretamente em várias etapas, principalmente quando se tratam de fármacos, desde a escolha da forma farmacêutica à temperatura de armazenamento. Essas técnicas fornecem informações como: ponto de fusão, estabilidade térmica, perda de massa, ponto de ebulição, etc. Porém, sabe-se que os resultados podem sofrer variações ao depender das concentrações, condições ambientais, origem do material, e até mesmo dos excipientes presentes na formulação a ser analisada. Nesse caso, essas análises contribuem de forma complementar à validação do método analítico (SILVA, 2013; CARVALHO, 2022).

### **3.5.1 Termogravimetria (TG)**

A termogravimetria (TG) é uma técnica empregada na análise térmica, e determina o comportamento térmico da amostra a partir da determinação da energia de ativação, fator de frequência, ordem de reação e da taxa de decomposição da mesma frente a influência da temperatura. Logo, a TG é frequentemente utilizada para avaliar a estabilidade térmica, decomposição, desidratação e oxidação da amostra, com base na sua variação da massa (OLIVEIRA, 2016; PALMAY, 2021).

A TG pode ser classificada em: TG isotérmica, quando a massa da amostra é registrada em função do tempo à temperatura constante, TG quase-isotérmica, quando a amostra é aquecida linearmente à massa constante a cada série de acréscimo de temperatura, e TG dinâmica, onde a massa da amostra é aquecida ou resfriada a partir de programa predefinido de variação de temperatura, sendo esta a mais utilizada (FERREIRA, 2012; SILVA, 2019).

### **3.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

A fim de verificar-se a variação do fluxo de calor com uma determinada variação de temperatura a Calorimetria Exploratória Diferencial, ou *Differential Scanning Calorimetry*, é bastante empregada. As curvas que são obtidas podem conter informações que indicam

processos endo e exotérmicos, sendo possível observar as variações de entalpia ( $\Delta H$ ) e assim determinar as características térmicas da amostra, como temperatura de fusão, oxidação, degradação, cristalização, de transição vítrea, entre outros (FERNANDO, 2022).

Na análise o equipamento de DSC mensura, sob uma programação de temperatura predefinida, a variação de energia entre a amostra a ser analisada e uma referência, levando em consideração a temperatura e/ou o tempo. Esse processo ocasiona nas reações endo e/ou exotérmicas e, conseqüentemente, na formação de picos. Das reações endotérmicas tem-se a fusão, reações de perda de massa, de redução e a dessorção, enquanto que as reações exotérmicas mais frequentes são a oxidação, adsorção, cristalização, reações de polimerização, entre outros (VIEIRA, 2022).

### **3.6 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A maioria dos estudos de quantificação, principalmente de fármacos, são baseados em métodos cromatográficos, como a CLAE, já que este é mais sensível e detalhado. Mas, como essas técnicas também apresentam um custo elevado e um tempo de espera maior, para a determinação do controle de qualidade desses fármacos tem-se utilizado o FTIR, que se diferencia na não destruição da amostra e conseqüente baixa geração de resíduos, num menor custo e baixo, ou inexistente, consumo de solventes (MADEIRA, 2015).

O FTIR é uma técnica de espectroscopia vibracional que é utilizada para determinar a composição química de amostras. No procedimento existe uma absorção da luz infravermelha pelas moléculas que compõem o material a ser analisado, onde todas as moléculas que apresentarem momento dipolar resultante diferente de zero irão absorver a luz infravermelha irradiada. Desde o século XIX, os avanços na espectrometria permitiram que a mesma partisse de uma técnica lenta e não confiável para um método simples, poderoso e eficaz. O uso amplo dessa técnica em diversos estudos analíticos tem o objetivo de auxiliar os pesquisadores corroborando para a confirmação dos resultados de outros testes realizados nas pesquisas. Com o tempo, o FTIR foi sendo empregado em vários tipos de materiais, desde fármacos até a materiais biológicos, tanto para análises qualitativas como quantitativas (LITO, 2022).

### **3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Nos últimos anos, com o aumento exponencial na quantidade de suplementos vitamínicos, paralelamente ocorreu a expansão tecnológica das técnicas cromatográficas, permitindo a ampliação das metodologias de quantificação. A quantificação de vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis é realizada a um tempo, seja por técnicas microbiológicas e



espectrofotométricas ou por técnicas mais modernas, como a CLAE. Essas novas metodologias trazem mais vantagens, como agilidade na análise, pouca quantidade de analito e reagentes, mais eficiência, etc. Atualmente, a CLAE é bastante empregada nas quantificações de vitaminas, e expressa resultados formidáveis, mesmo que apresente um custo relativamente alto, frente às metodologias mais simples (ABE-MATSUMOTO, 2016).

A CLAE é uma técnica frequentemente empregada na separação de compostos iônicos e macromoléculas. Para esse tipo de análise é utilizado um cromatógrafo, que deve possuir coluna cromatográfica e bomba, já que o mesmo trata-se de uma sistema personalizado, onde os parâmetros podem ser modificados de acordo com o objetivo do estudo. Outro componente importante é o detector, que necessita de uma compatibilidade com a fase estacionária para uma boa análise da separação cromatográfica. Essa separação é decorrente da interação entre as fases estacionária e móvel, sendo a fase móvel aquela que elui através da coluna, enquanto que a fase estacionária é a que está compactada na própria coluna (PEREIRA, 2022).

Nesse tipo de análise podem haver alguns interferentes, dentre eles as questões de estabilidade físico-química e as concentrações, em especial quando tratam-se de vitaminas, já que nos suplementos vitamínicos apresentam-se em maiores quantidades que nos alimentos *in natura*, por exemplo. Logo, o uso dessa técnica para validação de um método analítico é muito interessante, já que uma característica dela é a separação dos compostos antes da etapa de quantificação, o que minimiza a chance de resultados ilegítimos (ABE-MATSUMOTO, 2016; KIENEN, 2018).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Insumo Farmacêutico**

A Vitamina D<sub>3</sub> foi doada por uma farmácia de manipulação, produzida por Zhejiang Nhu Company Ltd. (Hong Kong, China), lote VD191104, teor 'puro', declarado pelo fabricante.

#### **4.1.2 Solventes**

Os solventes utilizados ao longo da pesquisa foram o metanol grau HPLC (LiChrosolv<sup>®</sup>, lote I1166107137) e acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, lote SHBG7762V). A água ultra purificada também foi utilizada, e foi obtida através de um ultra purificador Milli-Q A10 gradiente (Millipore<sup>®</sup>).

#### **4.1.3 Equipamentos e materiais**

Os equipamentos utilizados durante as análises foram: HPLC Flexar (PerkinElmer<sup>®</sup>), DSC-50 (Shimadzu<sup>®</sup>), TGA-60 (Shimadzu<sup>®</sup>), FTIR-MIR 400 (PerkinElmer<sup>®</sup>), Lavadora Ultrassônica (Biotron<sup>®</sup>), pHmetro (Hanna Instruments<sup>®</sup>), Balança analítica (Bel Engineering<sup>®</sup>), vidrarias (becker, proveta, balão volumétrico, funil, *vials*, erlenmeyer, vidro de relógio, frascos), espátulas, papel alumínio, seringas, filtros de seringa de 0,45 µm.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Termogravimetria (TG)**

Para determinação termogravimétrica fez-se o uso de uma termobalança TGA-60 (Shimadzu<sup>®</sup>), sendo as curvas formadas sob as seguintes condições experimentais: atmosfera dinâmica (100mL.min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> e intervalo máximo de temperatura de 30 a 600 °C. Foram utilizados 5,00 ± 0,1 mg em suportes de platina e para avaliação da linha de base do sistema foram geradas curvas em branco, antes das análises. Já para realização da calibração foi utilizado o padrão de oxalato de cálcio numa razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>.

#### **4.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Por meio de uma célula calorimétrica de modelo DSC-50 (Shimadzu<sup>®</sup>), sob atmosfera dinâmica de O<sub>2</sub> (50 mL.min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento 10 °C.min<sup>-1</sup> e intervalos de 25 a 250 °C de temperatura, as curvas de DSC foram conseguidas. Utilizaram-se 2,00 ± 0,10 mg de amostra em cadinhos de alumínio fechados nas análises, sendo necessário avaliar a linha de base do sistema através de curvas em branco. Já para calibrar a célula, foi empregado o índio metálico ( $T_{\text{fusão}} = 156,6^{\circ}\text{C}$ ;  $H_{\text{fusão}} = 28,7 \text{ J.g}^{-1}$ ), com pureza de 99,99%.

#### **4.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Para avaliação espectroscópica foi utilizado um equipamento de FTIR-MIR (PerkinElmer<sup>®</sup>), modelo 400, onde se aplicou a técnica de reflexão total atenuada (ATR), com resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup>, média de 64 varreduras/espectro e no modo de transmitância. Os espectros obtidos foram provenientes após as amostras serem colocadas com espátula sobre o cristal de ATR, sem preparo preliminar. A análise foi realizada numa região de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>, e seus espectros comparados aos disponibilizados na bibliografia. Já a limpeza da célula foi realizada com acetona entre cada ensaio, tendo em vista que se isso não ocorre as interferências podem alterar o resultado final da análise.

#### **4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Na análise cromatográfica foi utilizado um HPLC Flexar (PerkinElmer<sup>®</sup>), equipado com bomba quaternária, forno, detector do tipo UV/visível e sistema de processamento de dados software Chromera<sup>®</sup> CDS. A fase móvel foi composta por acetonitrila:água (99:1 v/v), com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, mantida sob condições isocráticas, durante 15 minutos, com detecção a 265 nm. E para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna C18, 2,6 µm, 50 mm x 300 mm (Phenomenex<sup>®</sup>), mantida em temperatura de 40 °C. As amostras foram injetadas em volumes de 10 µL e analisadas em triplicata. Além disso, todas as soluções padrão e amostras analisadas foram filtradas em filtros de 0,45 µm antes de serem colocadas nos *vials* e serem injetadas.

#### **4.2.5 Desenvolvimento e validação da metodologia**

A validação do método analítico foi realizada com base na RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que é a mais recente disponibilizada pela ANVISA e institui as mais atuais diretrizes

necessárias para validação de um método analítico, incluindo seus parâmetros e etapas (BRASIL, 2017).

#### 4.2.5.1 *Preparo de solução-mãe e soluções de trabalho*

A solução-mãe da vitamina D foi preparada a fim de se obter uma concentração de 1000 mg.mL<sup>-1</sup>. Inicialmente foram pesados 10 mg de vitamina D, em seguida a mesma foi dissolvida em um pouco de metanol grau HPLC, submetida 15 minutos no ultrassom e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Posteriormente, completou-se as 10 mL com o metanol, fez-se a transferência para um frasco âmbar e a mesma foi armazenada sob refrigeração (2-8 °C). Tendo em vista sua baixa fotoestabilidade, as soluções de trabalho foram preparadas no mesmo dia.

As soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução-mãe nas concentrações 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 µg.mL<sup>-1</sup>. Para isso, foram pipetadas 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µL em 6 diferentes balões de 10 mL, e em seguida foram completados com metanol grau HPLC. Prontamente as mesmas soluções foram colocadas em *vials*, utilizando o auxílio de seringas e filtros de membrana microporosa de 0,45 µm para HPLC.

#### 4.2.5.2 *Seletividade*

Tendo em vista que esse parâmetro se baseia na avaliação da capacidade do método identificar o analito, mesmo que na presença de impurezas, solventes e outros interferentes, a seletividade foi avaliada através da detecção de pureza de pico (BRASIL, 2017).

#### 4.2.5.3 *Linearidade*

A linearidade busca avaliar se o método reproduz os resultados esperados na curva, com base nas concentrações presentes nas amostras. Sabendo-se que as seis concentrações de vitamina D utilizadas foram: 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 µg.mL<sup>-1</sup>, e com o objetivo de obter uma curva analítica linear, foi necessário calcular o coeficiente de variação (CV) e o coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>), que deve sempre resultar em um valor igual ou maior que 0,99 (BRASIL, 2017).

#### 4.2.5.4 *Precisão*

A precisão fornece dados com relação à capacidade que o método tem de reproduzir, sob as mesmas condições, resultados próximos, ou não. Esse parâmetro é obtido através do

desvio padrão relativo (DPR), ou seja, através da relação entre os desvio verificado entre os resultados e sua média (BRASIL, 2017).

Com a finalidade de determinar o nível de precisão do método na quantificação da vitamina D, foram realizadas três determinações de diferentes níveis, baixo, médio e alto, sendo eles 2,0, 4,0 e 6,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. A precisão foi determinada através da precisão intermediária (precisão interdica e precisão interanalista), com as mesmas concentrações das soluções e condições experimentais, para que fosse se obtivessem os valores médios, desvios padrões relativos (DPR) e valores de exatidão correspondentes.

#### 4.2.5.5 Exatidão

Como a exatidão é um parâmetro que determina o grau de concordância entre os valores reais e o valor teórico foram realizadas análises em triplicata dos pontos baixo, médio e alto, totalizando nove corridas cromatográficas. Após o término dos ensaios foram calculado os valores percentuais, com base nas concentrações experimentais e teóricas da vitamina D (BRASIL, 2017).

#### 4.2.5.6 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados de acordo com as instruções contidas na RDC nº 166 de julho de 2017, utilizando-se os parâmetros da curva de calibração.

#### 4.2.5.7 Robustez

Como a robustez visa submeter o método a diferentes condições para avaliar o quanto que ele resiste e consegue, ainda assim realizar a quantificação foi utilizado como base uma adaptação do teste de Youden, onde foram escolhidos 3 parâmetros para serem modificados: (RELACRE, 2000; BRASIL, 2017)

**Tabela 1** - Parâmetros de robustez modificados e variações.

Parâmetro	Identificação	Padrão	Variação
Comprimento de onda (nm)	A	265	260-270
Temperatura (°C)	B	40	38-42
Vazão ( $\text{mL.min}^{-1}$ )	C	1	0,08-0,12

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

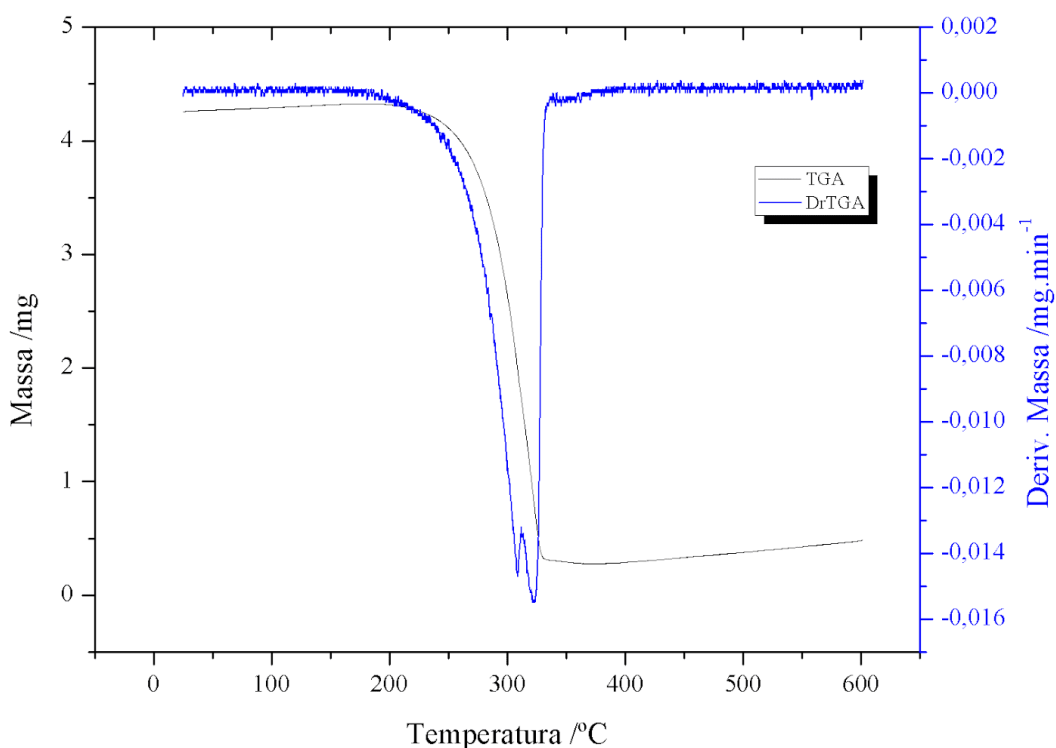
Foram determinados 3 parâmetros para a análise da robustez, estes foram submetidos a variações acima e abaixo do seu valor padrão, que foi definido inicialmente para o restante da validação. Foram realizadas corridas cromatográficas para cada variação, nos três níveis estabelecidos, em triplicata para cada nível.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Termogravimetria (TG)

O termograma TGA da vitamina D<sub>3</sub> (Figura 3) demonstrou que em 236 °C acontece evento de degradação térmica de etapa única, que ocorre na faixa entre 236 e 334 °C, correspondendo com o que MEDEIROS (2013) e STANKIEWSKI (2017) observaram. Enquanto que o TG-DTG mostrou a ocorrência de um único pico, com duas etapas de decomposição sobrepostas, com temperaturas máximas de degradação térmica de 309 e 322 °C ( $\Delta_{m\%}=91,76$ ), respectivamente, fornecendo um resíduo de 0,48 mg ao final da análise. Sendo assim, a vitamina D<sub>3</sub> é estável termicamente até 219 °C e sofre degradação térmica entre 236 e 334 °C.

**Figura 3** - Curvas TG/DTG da vitamina D<sub>3</sub>.



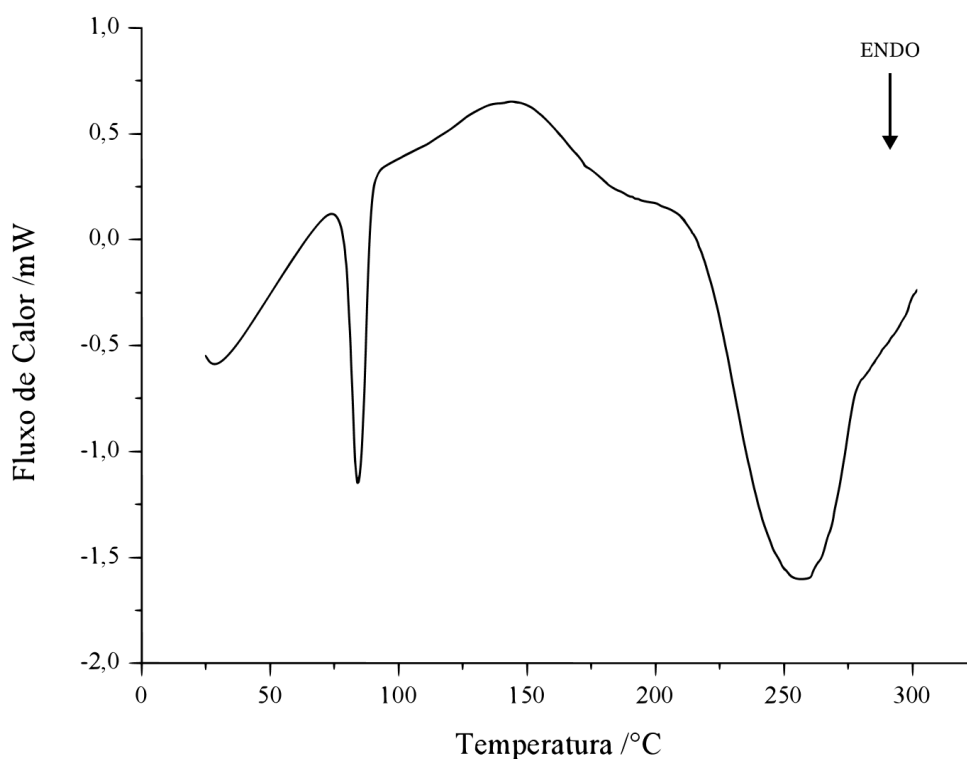
**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

### 5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica proveniente do DSC (Figura 4) é compatível com os resultados do TG, que mostram um único pico, tendo em vista que segundo o pico endotérmico apresentado em 257 °C é de característica variável e pode aparecer devido a decomposição da substância. Já o primeiro pico, apresentado na região de 84 °C no DTG, corresponde ao ponto de fusão,

coincidindo com o TGA, que mostra perda de massa, o que condiz com o relatado na literatura para a vitamina D<sub>3</sub>, que sugere sua presença entre 83,0 e 86,0 °C (STANKIEWSKI, 2017; TRIVEDI, 2021). A entalpia desse processo endotérmico de fusão foi de -34,88 J.g<sup>-1</sup>, enquanto que a condizente ao segundo evento foi de -168,53 J.g<sup>-1</sup>.

**Figura 4** - Termograma obtido por DSC da vitamina D<sub>3</sub>.



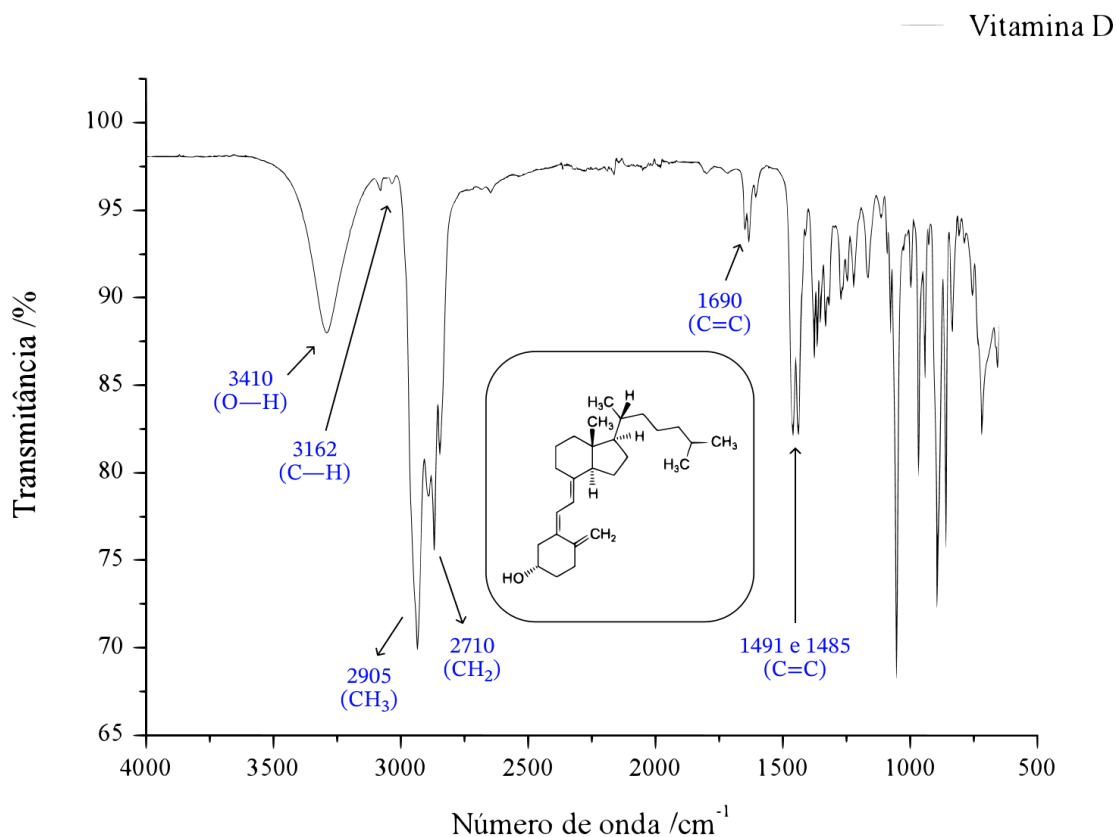
**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

### 5.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro da vitamina D<sub>3</sub> (Figura 5) expressa a presença de deformações axiais (estiramentos). Na região de 3410 cm<sup>-1</sup> foi observada uma banda de intensidade moderada sugestiva de estiramento de O-H livre, em 3162 cm<sup>-1</sup> foi observada uma banda de fraca intensidade sugestiva de grupamento C-H aromático, em 2905 e 2710 cm<sup>-1</sup> bandas de intensidade moderada indicativos de estiramentos C-H alifáticos, em 1690 cm<sup>-1</sup> banda de baixa intensidade sugestiva de estiramento C=C, e também foram visualizadas bandas em 1491 e 1485 cm<sup>-1</sup> sugestivas de estiramento C=C aromático.



**Figura 5** - Espectro de absorção na região do infravermelho médio para a vitamina D<sub>3</sub>.



**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

A técnica de FTIR é bastante relevante no monitoramento e fundamentação das justificativas de mudança de propriedade e atividade. Nesse caso, as bandas obtidas corresponderam com as existentes na literatura, que contém espectros de infravermelho da vitamina D<sub>3</sub>, contribuindo para afirmar a qualidade do insumo utilizado nas análises (TRIVEDI, 2021).

#### 5.4 Desenvolvimento e validação da metodologia

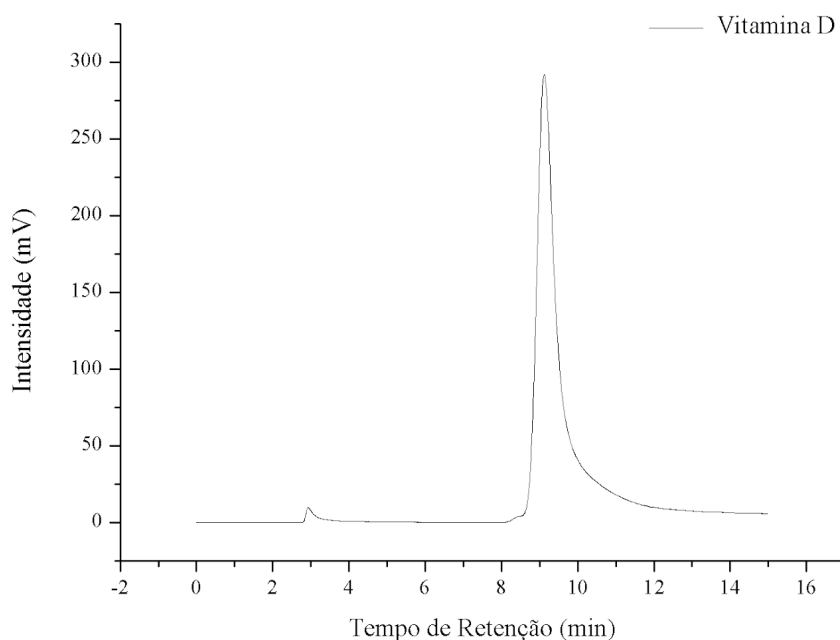
O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi o escolhido para ser validado na quantificação de vitamina D. Para realizar a detecção, o arranjo de fotodiodos e a análise da pureza do pico cromatográfico foram escolhidos.

##### 5.4.1 Seletividade

Esse parâmetro foi avaliado através da análise da pureza de pico da vitamina D, paralelamente com pesquisa da presença, ou não, de resíduos existentes no material. Como resultado não foi observada a presença de nenhum resíduo que caracterize o analito como

impuro, tendo o mesmo apresentado pureza de pico de 1,04 (Figura 6), apresentando-se na faixa ideal do aparelho (HPLC Flexar da PerkinElmer®), que é de até 5,0. Logo, o método é seletivo pois foi capaz de identificar a presença da vitamina D<sub>3</sub>.

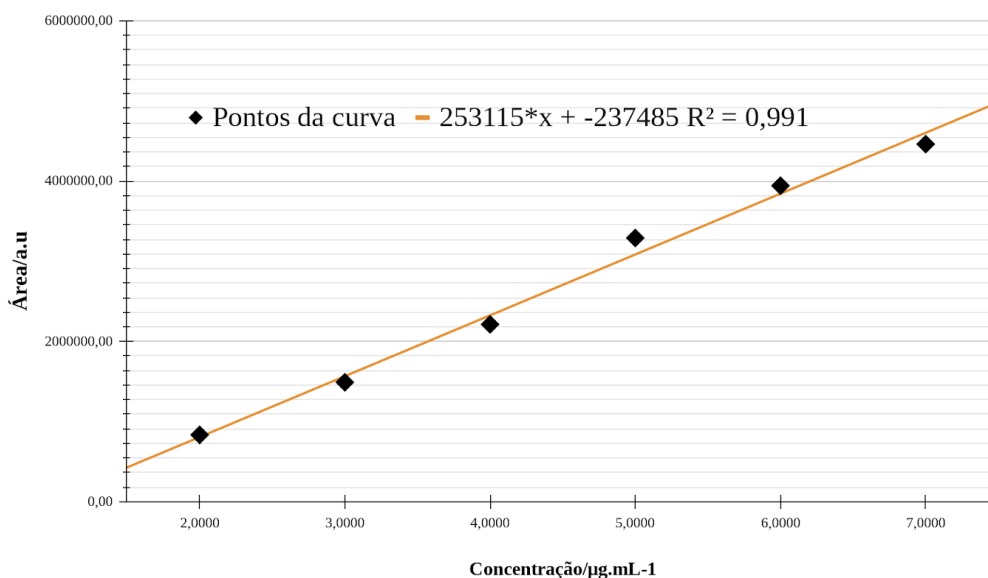
**Figura 6** - Cromatograma da vitamina D<sub>3</sub>.



**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

#### 5.4.2 Linearidade

Para a análise desse parâmetro foi elaborada uma curva de calibração, com 6 níveis de concentração (Tabela 2). Por meio do Programa Microsoft Excel®, foi possível observar que os valores reais obtidos foram correspondentes aos valores de concentração teóricos da vitamina D. Por meio da obtenção da equação da reta teve-se o coeficiente de determinação  $r^2 = 0,991$  (Figura 7), apresentando-se na faixa exigida pela legislação sanitária vigente ( $r^2 \geq 0,99$ ), o que é confirmado através dos DPRs calculados para cada nível, que não excedem o limiar aceitável de 5% (BRASIL, 2017).

**Figura 7** - Curva analítica de calibração da vitamina D<sub>3</sub>.

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

**Tabela 2** - Dados obtidos das áreas para construção da curva analítica da vitamina D.

Nível	Concentração/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Área	Média	DPR (%)
1	2,0	278343,0	277689,0	0,22
		277102,0		
		277622,0		
2	3,0	500033,0	496699,0	1,02
		490612,0		
		498552,0		
3	4,0	736489,0	737325,7	0,27
		735867,0		
		739621,0		
4	5,0	1095863,0	1096704,7	0,55
		1091140,0		
		1103111,0		
5	6,0	1315480,0	1314037,7	0,38
		1308499,0		
		1318134,0		
6	7,0	1473800,0	1487035,3	1,45
		1475400,0		
		1511906,0		

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

#### 5.4.3 Precisão

A precisão foi determinada com análise de 3 níveis (baixo, médio e alto, sendo 2,0, 4,0 e 7,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente) em triplicata utilizando a precisão intermediária (precisão

interdia e precisão interanalista). Com base na análise dos dados, observou-se que as amostras apresentaram um DPR de 0,013 a 3,26% e, tanto a interdia (Tabela 3) como a interanalista (Tabela 4), tal qual exatidões abaixo de 5% encontrando-se na faixa exigida pela ANVISA, que é de até 5%. Dessa forma, o método pode ser considerado preciso, não sofrendo interferência relevante pelo dia nem pelo analista que conduz a análise (BRASIL, 2017).

**Tabela 3** - Precisão interdia dos 3 níveis de concentração estabelecidos.

Nível	Dia 1		Dia 2	
	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Exatidão (%)	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Exatidão (%)
Baixo	2,07	3,5	2,04	2,0
	2,03	1,5	2,09	4,5
	2,04	2,0	2,09	4,5
<b>Média</b>	2,046		2,07	
<b>DP</b>	0,0208		0,029	
<b>DPR (%)</b>	1,02		1,45	
Médio	3,85	3,75	3,99	0,25
	3,85	3,75	4,19	4,75
	3,86	3,5	3,94	1,5
<b>Média</b>	3,85		4,04	
<b>DP</b>	0,058		0,132	
<b>DPR (%)</b>	0,15		3,26	
Alto	6,14	2,33	6,20	3,33
	6,11	1,83	6,22	3,66
	6,15	2,5	6,00	0
<b>Média</b>	6,13		6,14	
<b>DP</b>	0,0208		0,122	
<b>DPR (%)</b>	0,34		1,98	

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

**Tabela 4** - Precisão interanalista dos 3 níveis de concentração estabelecidos.

Nível	Analista 1		Analista 2	
	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Exatidão (%)	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Exatidão (%)
Baixo	2,07	3,5	2,09	4,5
	2,03	1,5	2,02	1,0
	2,04	2,0	2,09	4,5
<b>Média</b>	2,046		2,066	
<b>DP</b>	0,0208		0,0404	
<b>DPR (%)</b>	1,02		0,02	
Médio	3,85	3,75	3,81	4,75
	3,85	3,75	3,82	4,5

	3,86	3,5	3,90	2,5
<b>Média</b>	3,85		3,84	
<b>DP</b>	0,058		0,05	
<b>DPR (%)</b>	0,15		0,013	
	6,14	2,33	6,01	0,17
Alto	6,11	1,83	5,80	3,33
	6,15	2,5	5,92	1,33
<b>Média</b>	6,13		5,91	
<b>DP</b>	0,0208		0,105	
<b>DPR (%)</b>	0,34		1,78	

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

#### 5.4.4 Exatidão

Para a determinação da exatidão também se fez o uso dos mesmos 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto). Logo, tendo em vista que a ANVISA exige uma exatidão de até 5% e os valores obtidos foram de 0,75 a 1,09% (Tabela 5), seus resultados apresentaram-se em conformidade com a legislação sanitária vigente. Assim, o método em validação é considerado um método exato (BRASIL, 2017).

**Tabela 5** - Exatidão dos 3 níveis de concentração estabelecidos.

Nível	Concentração teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Média da concentração experimental ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Exatidão (%)	DPR (%)
Baixo	2,0	2,0525	2,625	1,09
Médio	4,0	3,8617	3,4575	0,45
Alto	6,0	6,1626	2,71	0,75

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

#### 5.4.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Com base na curva de calibração fez-se a determinação dos limites de quantificação e detecção, onde  $LD = 0,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $LQ = 1,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Com isso, é possível observar que estes apresentaram-se abaixo de 5% dos limites exigidos para um nível de 95%. Além disso, os LD tiveram resultados menores que os LQ, como esperado, sendo possível afirmar que o método é sensível e assim capaz de cumprir com o objetivo proposto.

#### 5.4.6 Robustez

Após as análises cromatográficas para a avaliação da variação dos 3 parâmetros estabelecidos (Tabelas 6, 7 e 8) com base no teste de Youden, os seguintes resultados foram analisados a fim de determinar se o método é robusto ou não.

**Tabela 6** - Dados da variação do parâmetro comprimento de onda (260 e 270 nm).

Nível	260nm		270nm	
	Concentração (µg.mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)	Concentração (µg.mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)
Baixo	1,99	0,5	1,92	4
	1,93	3,5	1,96	2
	1,94	3	1,98	1
<b>Média</b>	1,95		1,95	
<b>DP</b>	0,032		0,03	
<b>DPR (%)</b>	0,016		0,015	
Médio	3,98	0,05	3,93	1,75
	3,81	4,75	4,06	1,5
	3,85	3,75	4,01	0,25
<b>Média</b>	3,88		4	
<b>DP</b>	0,09		0,065	
<b>DPR (%)</b>	0,023		0,016	
Alto	5,70	5	5,84	2,67
	5,78	3,67	5,95	0,83
	5,73	4,5	6,03	0,5
<b>Média</b>	5,74		5,94	
<b>DP</b>	0,04		0,095	
<b>DPR (%)</b>	0,007		0,016	

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

**Tabela 7** - Dados da variação do parâmetro temperatura (38 e 42 °C).

Nível	38 °C		42 °C	
	Concentração (µg.mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)	Concentração (µg.mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)
Baixo	1,95	2,5	2,07	3,5
	1,90	5	2,08	4
	1,93	3,5	2,06	3
<b>Média</b>	1,93		2,07	
<b>DP</b>	0,025		0,01	
<b>DPR (%)</b>	1,3		0,005	
Médio	4,09	2,25	4,31	7,75
	4,16	4	3,98	0,05
	4,17	4,25	3,94	1,5
<b>Média</b>	4,14		4,08	
<b>DP</b>	0,0436		0,203	
<b>DPR (%)</b>	0,0105		0,05	
Alto	6,06	1	6,06	1
	5,84	2,67	6,01	0,17
	5,71	4,83	6,07	1,17
<b>Média</b>	5,87		6,05	

<b>DP</b>	0,177	0,032
<b>DPR (%)</b>	0,03	0,005

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

**Tabela 8** - Dados da variação do parâmetro vazão (0,08 e 0,12 mL.min<sup>-1</sup>).

	0,08 mL.min <sup>-1</sup>		0,12 mL.min <sup>-1</sup>	
Nível	Concentração (µg.mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)	Concentração (µg.mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)
Baixo	1,97	1,5	1,93	3,5
	1,90	5	1,95	2,5
	1,99	0,5	1,97	1,5
<b>Média</b>	1,95		1,95	
<b>DP</b>	0,047		0,02	
<b>DPR (%)</b>	0,024		0,0103	
Médio	4,03	0,75	4,02	0,5
	4,06	1,5	4,09	2,25
	4,04	1	4,06	1,5
<b>Média</b>	4,04		4,06	
<b>DP</b>	0,0153		0,035	
<b>DPR (%)</b>	0,004		0,009	
Alto	5,84	2,67	6,19	3,17
	6,00	0	6,23	3,83
	6,13	2,17	6,19	3,17
<b>Média</b>	5,99		6,2	
<b>DP</b>	0,145		0,023	
<b>DPR (%)</b>	0,024		0,004	

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2022.

Fundamentando-se nos dados resultantes das variações sugeridas, o método apresenta-se como um método robusto, já que não apresentou DPR excedente para nenhum parâmetro que foi modificado. Sendo assim, o método validado é capaz de resistir a pequenas variações dos três parâmetros avaliados: comprimento de onda, temperatura e vazão.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resultados provenientes dos experimentos realizados complementarmente a validação, como TG, DSC e FTIR, mostraram caracterizações condizentes com o que está presente na literatura para a vitamina D<sub>3</sub>, promovendo a confirmação que o insumo farmacêutico utilizado no desenvolvimento e validação do método se adequou tecnicamente, por meio da caracterização, para que as posteriores análises fossem realizadas. O desenvolvimento e validação do método analítico foi possível pois todas as etapas presentes na RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que foram testadas resultaram em dados que estavam em conformidade com a resolução, contribuindo para que a metodologia fosse validada. Logo, considerando que não existem leis nacionais que regularizem de forma exigente o desenvolvimento e comercialização de suplementos nutricionais, e tendo em vista o impacto que esse tipo de produto pode levar ao usuário, o controle de qualidade, especialmente da vitamina D, acrescenta de modo a incentivar que mais pesquisas e estudos sejam realizados.

Portanto, dando importância aos expressivos dados com relação aos casos de hipovitaminose D e de pessoas que fazem suplementação de vitamina D, o método validado contribui cientificamente de modo que possa ser, posteriormente, aplicado a diferentes produtos que já foram aprovados pelas indústrias farmacêuticas e ANVISA para comercialização. Já para a presente pesquisa a implementação de mais testes, como por exemplo, um estudo de solubilidade e pré-formulação, bem como a caracterização por outras técnicas, como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia de Massas (EM) e Difractometria de Raios X (DRX), surgem como perspectivas interessantes para serem realizadas.



## REFERÊNCIAS

- ABE-MATSUMOTO, L.T.; SAMPAIO, G.R.; BASTOS, D.H.M. Validação e aplicação de métodos cromatográficos para determinação de vitaminas em suplementos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 75, n. 1689, 2016.
- BISINOTTO, H. et al. **Intoxicação por vitamina D após suplementação: relato de dois casos em atenção terciária**. Relato de caso. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas.
- BRASIL. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, ed. 141, seção 1, p. 87, 24 jun 2017.
- BRASIL. RDC nº 268, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da União: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, ed. 217, seção 2, p. 44, 12 nov. 2018.
- CARVALHO, A. C. S. **Desenvolvimento de novas formas sólidas multicomponentes do fármaco lornoxicam**. 2022. 129 f. Dissertação de Doutorado (Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 55, n. 8, 2011.
- D'ÁVILA, H. F.; KIRSTEN, V. R. Consumo energético proveniente de alimentos ultraprocessados por adolescentes. **Rev Paul Pediatr.**, v. 35, n. 1, p. 54-60, 2017.
- ELOY, J. O. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Quim. Nova**, v. 35, n. 5, p. 1036-1040, 2012.
- FERNANDO, K. P. **Caracterização térmica, mecânica e dinâmico-mecânica de poliuretanos biocompatíveis com memória de forma**. 2022. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Materiais) - Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território (ILATIT), Foz do Iguaçu.
- FERREIRA, C. E. S. et al. Consenso – intervalos de referência de vitamina D [25(OH)D] das sociedades médicas brasileiras. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo (SBEM). **J Bras Patol Med Lab**, v. 53, n. 6, p. 377-381, dez. 2017.
- FERREIRA, R. A. dos. R. **Contribuição ao estudo cinético e balanço energético da pirólise autotérmica da palha de cana-de-açúcar através de análises termogravimétricas e calorimetria**. 2012. 15 f. Tese (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- FONTENELE, M. L. S.; LUNA, G. I. Regulamentação da Suplementação Nutricional no Brasil. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 1, n. 2, 2013.
- GALVÃO, L. B. et al. Considerações atuais sobre a vitamina D. **Brasília Med**, v. 50, n. 4, p. 324-332, 2013.

JACINTO, I. C. **Definição dos limites de detecção e quantificação para melhoria na qualidade da determinação de sólidos em efluentes.** 8ª Jinc - Jornada de Iniciação Científica. Concórdia, SC, 2014.

JONES, G. Historical aspects of vitamin D. **Endocrine Connections**, v. 11, n. 4, abr. 2022.

KIENEN, V. **Desenvolvimento de método cromatográfico limpo para a determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos explorando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ambientes micelares.** 2007. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

KRATZ, D. B.; SILVA, G. S.; TENFEN, A. Deficiência de vitamina D (25OH) e seu impacto na qualidade de vida: uma revisão de literatura. **RBAC**. v. 50, n. 2, p. 118-23, 2018.

LEÃO, L. M. C. S. M.; TAVARES, A. B. W.; JUNIOR, V. L. S. Prevalência e consequências da hipovitaminose D em adolescentes. **Adolesc. Saude**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 50-55, out./dez. 2013.

LINDEN, M. A. et al. Definition of vitamin D deficiency in schoolchildren: systematic review with meta-analysis. **Arq Gastroenterol**, v. 56, n. 4, out./dez., 2019.

LITO, T. et al. Revising Fourier-transform infrared (FT-IR) and Raman spectroscopy towards brain cancer detection. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 38, 2022.

LUIZ, F. S. et al. Avaliação da estatura em crianças nascidas com baixos níveis de vitamina D. **Id on Line Rev. Mult. Psic.** v. 12, n. 42, p. 295-307, 2018.

MADEIRA, C. R. de S.; PIANTAVINI, M. S.; TRINDADE, A. C. L. B. Aplicação da espectrofotometria na região do infravermelho associado a calibração multivariada no controle de qualidade de fármacos - revisão. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 16, n. 1, jan.-mar. 2015.

MARINS, T. A. et al. Intoxicação por vitamina D: relato de caso. **einstein**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 242-4, 2014.

MEDEIROS, L. de A. **Desenvolvimento farmacotécnico de cápsulas de colecalciferol de uso terapêutico: um estudo comparativo com formulações magistrais.** 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de suplementos vitamínicos e ou de minerais. **Diário Oficial da União**, 15 jan. 1998.

OLIVEIRA, K. R. W. de. **Desenvolvimento e validação de métodos para caracterização e quantificação de marbofloxacino em formulação farmacêutica de uso animal.** 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

PALMAY, P. et al. Determination of Thermodynamic Parameters of Polylactic Acid by Thermogravimetry under Pyrolysis Conditions. **Appl. Sci.**, p. 11, 2021.

PEREIRA, E. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de urânio em compostos do ciclo do combustível nuclear por Espectroscopia no**

**Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).** 2016. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materiais) - IPEN, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo.

PEREIRA, V. R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de ácido vanílico em emulsão cosmética.** 2022. 15f. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo.

RAFAELLI, *et al.* Influência da vitamina D nas doenças endocrinometabólicas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 333-348, ago. 2015.

RELACRE. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. **Guia Relacre 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química.** p. 1-30, 2000.

RIZZATTI, K.; SCHNEIDER, I. J. C.; D’ORSI, E. Perfil epidemiológico dos cidadãos de Florianópolis quanto à exposição solar. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 459-469, out./dez. 2011.

ROCHA, E. S. da.; MACHADO, F. **Validação do método analítico para determinação do teor de cloreto de cetilpiridínio em enxaguante bucal fabricado em uma indústria de produtos de higiene pessoal.** 14f. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Química) - Centro Universitário Internacional Uninter.

SANTOS, M. F. S. dos. et al. Vitamina D durante a pandemia da COVID-19: mudanças dos hábitos alimentares. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria.** v. 24, n. 3, p. 283-299, set./dez. 2020.

SILVA, D. C. da. **Ensaio físico dos excipientes e avaliação das farmacopeias.** 2013. 17 f. Monografia (Especialização em Tecnologia Industriais Farmacêuticas) - FIOCRUZ (Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos/CTM), Rio de Janeiro.

SILVA, P. C. D. da. **Estudo de desenvolvimento de comprimidos de liberação imediata em associação dose fixa para o tratamento de filariose.** 2019. 54 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SOUSA, S. M. de. **A vitamina D e o seu papel na prevenção de doenças.** 2016. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa/Faculdade de Ciências da Saúde, Porto.

STANKIEWSKI, L. **Desenvolvimento tecnológico de nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol.** 2017. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

TAVARES, C. A. **Oncocalixona A:** validação de uma metodologia analítica por clae-uv para quantificação em diferentes meios e estudo termodinâmico da interação com ciclodextrinas através de calorimetria de titulação isotérmica. 2019. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

TAVARES, L. de P.; RAUBER, R. CAMPAGNOLO, G. A. Pele e vitamina D: qual o grau de exposição solar necessário para atingir o nível sérico ideal. **Society and Development**, v. 11, n. 8, 2022.

TRIVEDI, M. K.; JANA, S. Assessment of Physical, Thermal and Spectral Properties of Consciousness Energy Treated Cholecalciferol. **Open Access Pub**, v. 1 n. 3, p. 56, jan./fev. 2021.

VAZ, M. A. et al. Suplementação na infância e a prevenção da carência de micronutrientes: Artigo de revisão. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**. v. 6, n. 1, p. 116-131, jan./abr. 2017.

VIEIRA, G. da. C. **Estudo termomecânico da resina poliéster/nanopartículas de haloisita com aditivo retardante de cura**. 2022, 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Materiais) - Faculdade de Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus.