



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

Rodrigo Ramos Catharino

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM
ALIMENTOS**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor
em Ciência de Alimentos.**

**CAMPINAS – SP
2004**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C284d Catharino, Rodrigo Ramos
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica
para determinação de folatos em alimentos / Rodrigo
Ramos Catharino. – Campinas, SP: [s.n.], 2004

Orientador: Helena Teixeira Godoy
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Alimentos - Análise. 2. Análise cromatografica. 3.
Vitaminas. 4. Alimentos. I.Godoy, Helena Teixeira.
II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
(Orientadora) FEA-UNICAMP

Profa. Dra. Elenice Haruko Murate
(Membro da Banca) UFPR

Graciliano de Oliveira Neto
(Membro da Banca)

Maria Teresa Mendes Ribeiro Borges
(Membro da Banca) UFSCAR

Mauro Luiz Aldrigue
(Membro da Banca) UFSCAR

Heloisa Máscia Cecchi
(Membro da Banca) FEA-UNICAMP

Hilary Castle de Menezes
(Membro da Banca) FEA-UNICAMP

Dedicatória

***Dedico este trabalho a Deus e aos meus
Pais maravilhosos, José Roberto Ramos
Catharino e Jamira Machado Ramos
Catharino por todo o sacrifício que
fizeram e tem feito por mim.***

Agradecimentos Especiais

Agradeço em especial minha sempre companheira irmã **Raquell Ramos Catharino**, pela amizade, confiança, ajuda e incentivo.

Agradeço também a minha orientadora **Helena T. Godoy** por toda ajuda e apoio nestes agradáveis anos de minha vida na FEA-UNICAMP.

Agradecimentos

Aos membros da Banca Examinadora.

Ao incentivo do Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto em 1998.

À todos os meus amigos do Laboratório de Análises de Alimentos-FEA-UNICAMP.

Em especial Elenice H Murate, Elizete M. P. Facco, Gisele Letícia Alves, Jesuí V. Visentainer, Juliana Azevedo Lima, Maria Teresa M. R. Borges, e a Professora Maria Regina Bueno Franco por toda atenção que sempre me deram e pelas palavras que sempre me ajudaram.

Á todos os meus amigos que fiz durante estes anos de FEA.

Á FEA-UNICAMP.

Á CAPES pelo apoio financeiro.

**'Esta Tese é o resumo de uma grande descoberta realizada com a
molécula AmOr (Amigo, S., *et al.*, 2004)''.**

Rodrigo Ramos Catharino

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências Bibliográficas.....	6
 CAPÍTULO 1 - METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE FOLATOS EM ALIMENTOS-UMA REVISÃO.....	 7
Resumo.....	8
Abstract.....	9
1. Introdução.....	10
2. Métodos de Análise para Ácido fólico e Folatos.....	14
2.1. Métodos Biológicos.....	15
2.2. Métodos Microbiológicos.....	15
2.3. Métodos Químicos.....	16
2.4. Métodos Imunológicos.....	16
2.5. Métodos Cromatográficos.....	17
2.5.1. Métodos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	18
3. Validação da Metodologia.....	25
4. Referências Bibliográficas.....	26
 CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM ALIMENTOS.....	 33
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introdução.....	36
Material e Método.....	38
Materiais.....	38
Reagentes.....	38

Equipamentos.....	39
Metodologia Analítica.....	39
Validação do Método.....	41
Limites de detecção e quantificação.....	41
Testes de Recuperação.....	41
Repetibilidade.....	42
Resultados e Discussão.....	42
Etapas Analíticas e Validação de Metodolo.....	42
Conclusões.....	49
Referências Bibliográficas.....	52

CAPÍTULO 3 – DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM ALIMENTOS BRASILEIROS.....

Resumo.....	54
Abstract.....	55
Introdução.....	56
Material e Método.....	57
Material.....	60
Reagentes.....	61
Equipamentos.....	61
Método.....	62
Resultados e Discussão.....	63
Conclusões.....	70
Referências Bibliográficas.....	71

CAPÍTULO 4 – FOLATOS EM FRUTAS TÍPICAS DA REGIÃO NORTE E NORDESTE DO BRASIL 74

Resumo.....	75
Abstract.....	76
Introdução.....	77
Material e Método.....	79
Material.....	79
Reagentes.....	79

Equipamento.....	80
Método.....	80
Resultados e Discussão.....	82
Conclusões.....	87
Referências Bibliográficas.....	87
CONCLUSÕES GERAIS E PESPECTIVAS FUTURAS.....	90
ANEXOS.....	93
Anexo 1. Espectros de excitação e absorção dos diferentes folatos: (A) THF; (B) 5MTHF; (C) 10FFA; (D) 5FFA; (E) AF (nm); (F) 10MAF	94
Anexo 2. Curvas analíticas para os diferentes folatos: (A) THF; (B) 5MTHF (C) 10FAF; (D) 5MAF; (E) AF; e (F)10MAF.....	95
Anexo 3. Foto dos frutos de murici.	96
Anexo 4. Foto dos frutos de jenipapo.....	97

RESUMO

O Brasil é um país que carece de metodologias analíticas apropriadas para a determinação de folatos, uma classe de vitamina cuja deficiência pode acarretar vários distúrbios bioquímicos no organismo humano. Visando atender a esta necessidade, neste trabalho foi desenvolvida e validada uma metodologia para determinação dos folatos em alimentos, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A maior vantagem do método proposto foi a simplicidade obtida na extração da amostra para análise, em relação as metodologias existentes. A extração dos folatos foi feita com acetato de amônia (0,05mol/L), seguida da limpeza do extrato com ácido tricloroacético. Os folatos, 5-metiltetraidrofolato (5MTHF), 5-formiltetraidrofolato (5FTHF), tetraidrofolato (THF), 10-formil-ácido fólico (10FAF), 10-metil-ácido fólico (10MAF) e ácido fólico (AF) foram separados em coluna de fase reversa C₁₈ por eluição com gradiente de fase móvel (acetonitrila/ solução com ácido acético). A detecção foi através da fluorescência natural dos compostos, com exceção do ácido fólico que foi detectado na região do ultra-violeta e, a quantificação dos analitos realizada por padronização externa. Os limites de detecção e as taxas de recuperação para as diferentes formas de folatos foram, respectivamente, 5pg/mL e 94-108% para o 5MTHF, 7pg/mL e 97-102% para o THF, 30pg/mL e 97-104% para o 5FTHF, 30pg/mL e 96-105% para o 10FAF, 5ng/mL e 97-102% para o AF e 5ng/mL e 98-103% para o 10MAF. Os limites de quantificação foram considerados como duas vezes os limites de detecção. A repetibilidade apresentou CV« 3,9% para todas as formas da vitamina. Completando a validação da metodologia, a exatidão foi avaliada

utilizando três materiais de referência certificado, fígado de porco (BCR487), leite em pó (BCR421) e misturas de vegetais (BCR485). Para avaliar a versatilidade do método, este foi aplicado a três matrizes diferentes: duas frutas tropicais (jenipapo e murici) coletadas em cidades diferentes do país (Fortaleza e Belém), carne bovina e dois tipos de bebidas fermentadas, vinho tinto e cerveja pilsen. As frutas foram as que apresentaram os maiores teores de folatos totais, 146,5µg/100g e 80,4µg/100g para o murici e jenipapo, respectivamente. Houve diferenças significativas entre os valores obtidos de frutas da região norte e nordeste do país. O vinho tinto apresentou variação no teor de folatos totais de 6,5 a 23,7µg/100mL. A cerveja apresentou variação de 292,8 a 652,6µg/100mL. Os teores encontrados na carne bovina ficaram em torno de 14,0µg/100g. O 5MTHF foi a forma predominante no músculo e no murici, já o para o jenipapo e o vinho a distribuição de teores individuais foi equitativa sendo que a concentração do 10MAF se destacou um pouco mais em comparação com os outros folatos.

ABSTRACT

Brazil is a country that lacks appropriate analytical methodologies for the determination of folates, a vitamin whose lack can cause some biochemical disturbances in the human body. Aiming filling this gap, methodology for the determination of folates in foods using high performance liquid chromatography (HPLC) was developed and validated. The principal advantage of the method considered was the simplicity of the sample extraction method, in relation to existing methodologies. The folates were extracted with ammonia acetate (0.05mol/L), followed by the clean-up step of the extract using trichloroacetic acid. The folates, 5-methyltetrahydrofolate (5MTHF), 5-formyltetrahydrofolate (5FTHF), folic acid tetrahydrofolate (THF), 10-formyl-folic acid (10FAF), 10-methyl-folic acid (10MAF) and folic acid (FA) were separated using a C₁₈ reverse phase column and gradient elution with acetonitrile and aqueous acetic acid solution. Detection was by the natural fluorescence of the compounds, with the exception of folic acid, which was detected in the ultra-violet region and quantification was by external standardization. The detection limits and recovery rates for the different forms of folate were, respectively; 5pg/mL and 94-108% for 5MTHF, 7pg/mL and 97-102% for THF, 30pg/mL and 97-104% for 5FTHF, 30pg/mL and 95-105 for 10FAF, 5 ng/mL and 97-102% for FA and 5ng/mL and 98-103% for 10MAF. The quantification limits were considered as three times the detection limits. Repeatability showed CV< 3,9% for all the forms of the vitamin. After completing the validation of the methodology, it was applied to three certified reference materials, pig liver (BCR487), powdered milk (BCR421) and a mixture of vegetables (BCR485). To evaluate the versatility of the method, it was applied to three different matrices, two tropical fruits

(jenipapo and murici) collected in different cities of the country (Fortaleza and Belem), bovine meat and red wine. The fruits presented the highest contents of total folate, 146.5 μ g/100g and 80.4 μ g/100g for murici and jenipapo, respectively. There were significant differences between the values obtained for fruits from different cities in the north of the country. The red wine presented variations in the total content of folates from 6.5 to 23.7 μ g/100mL. The beer presented variations in the total content of folates from 292.8 to 652.6 μ g/100mL. The contents found in the meat were about 14.0 μ g/100g. 5MTHF was the predominant form in the meat and murici, but for jenipapo and red wine the distribution was balanced, the concentration of 10MAF being slightly higher than the other folates.

INTRODUÇÃO GERAL

Os alimentos, num passado não muito distante, eram tidos apenas como fontes de substâncias essenciais para preencher os requisitos nutricionais básicos do organismo humano ou animal. Hoje, sabe-se que os alimentos oferecem muito mais, são fontes de substâncias bioativas que proporcionam benefícios adicionais à saúde. As investigações nesse sentido foram estimuladas principalmente, pelos avanços científicos que proporcionaram evidências convincentes ligando dieta e saúde.

Entre esses fitoquímicos bioativos encontram-se os folatos, que compreendem um grupo de substâncias que hoje estão sendo consideradas pelos cientistas indispensáveis à saúde humana e animal, apontadas como “as vitaminas do futuro”. Recentemente, inúmeros trabalhos publicados mostraram que a carência de folatos pode causar doenças cardiovasculares, câncer e desordens mentais, como o mal de Alzheimer, além de outras doenças debilitantes crônicas. Acredita-se que um dos possíveis efeitos diretamente relacionado à carência dos folatos e que tem surtido maior repercussão mundial são as malformações congênitas (MACHLIN, 1991; CZEIZE e DUDAS, 1992; KATZUNG, 1994; ULENE e ULENE, 1995; OAKLEY *et al.*, 1995; CRANE *et al.*, 1995; DALY *et al.*, 1997; DEVLIN, 1997; PARODI, 1997; RANG *et al.*, 1997; DIERKS *et al.*, 1998; MAILNOW *et al.*, 1998; MOSHFEGH *et al.*, 1998). A deficiência de folatos no organismo humano, normalmente é causada pelo consumo dietético inadequado, demanda aumentada por má absorção ou por erros genéticos no metabolismo de folatos (CZEIZE e DUDAS, 1992; PARODI, 1997; TARUMA e MESSING, 1997). Segundo levantamentos de consumo alimentar, a ingestão inadequada parece ser a causa mais comum (DEVLIN, 1997).

Em consequência de todas essas doenças causadas pela ingestão insuficiente dessa vitamina, o FDA (Food and Drug Administration) nos EUA, desde 1996, determinou que o ácido fólico deveria ser adicionado (140 µg/100g) a uma série de alimentos, principalmente aos cereais matinais, macarrão e farinhas (TUCKER *et al.*, 1996). A preocupação com a ingestão de folatos na alimentação de gestantes foi tão grande que, em 1998, uma campanha nacional foi criada nos EUA, cuja missão foi a de reduzir as malformações congênitas, incentivando e promovendo o consumo de alimentos ricos em folatos. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) reconheceu a importância dos folatos, através da Resolução nº 344 de 13/12/2002, obriga o enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico (Brasil, 2002).

A identificação e quantificação de folatos em alimentos é pré-requisito básico para as investigações sobre alimentos funcionais e para programas que promovem dieta saudável para a população. Embora um grande número de alimentos contenha folatos, o conhecimento dos teores dessa vitamina nesses produtos tem sido dificultado pela falta de laboratórios preparados para a realização das análises, e principalmente, pela falta de metodologias analíticas adequadas (POLESELLO e RIZZOLO, 1990; MACRAE, 1990).

O método oficial (CUNNIFF, 1997) para a determinação de ácido fólico e folatos em alimentos é um método microbiológico que apresenta muitos inconvenientes, como baixa precisão, lentidão na análise e exatidão questionável, além de não permitir a separação e identificação de cada forma da vitamina presente.

Os métodos químicos para a determinação de folatos apresentam problemas em decorrência da presença de muitos interferentes na análise de matrizes alimentícias. Recentemente, a literatura vem apresentando avanços nos métodos para a determinação

de folatos, através de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão, possibilitando a determinação das diferentes formas de folatos em uma única análise. Portanto, o desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de uma metodologia utilizando a CLAE para a determinação de folatos é de extrema importância, para a pesquisa de alimentos no país.

Esforços tem sido feitos visando a determinação correta dos valores de folatos nos alimentos, considerando-se que esta análise não é uma tarefa fácil. Problemas analíticos que resultaram em dados não confiáveis ou errôneos vêm impedindo o progresso nesta área, inclusive nos estudos epidemiológicos que correlacionam os folatos à incidência de doenças. A confiabilidade dos dados analíticos é importante para o conhecimento dos teores reais nos alimentos, principalmente, na garantia da segurança alimentar e na obtenção de novas fontes. Nos últimos anos a AOAC (Association of Official Analytical Chemists) vem estimulando o controle de qualidade analítica, através de planejamento e análises estatísticas variadas (WERNIMONT, 1985). No Brasil, também a validação de novos métodos analíticos tem sido uma preocupação dos pesquisadores, mas pouco se tem feito em relação a validação de novos métodos para folatos e ácido fólico (CATHARINO e GODOY, 2000).

Tendo em vista o contexto que envolve os folatos, o presente estudo visou desenvolver uma metodologia por CLAE para determinação de folatos em alimentos brasileiros, onde não há nenhum dado na literatura.

Este trabalho, além de auxiliar os pesquisadores, apresenta uma alternativa para a determinação de folatos em alimentos, de forma a verificar e garantir o potencial vitamínico, bem como possibilita o estudo de novas fontes, podendo também ser utilizado como ferramenta para enriquecer os dados da tabela brasileira de composição de alimentos.

Referências Bibliográficas:

BRASIL. Resolução- RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. Diário oficial da União, Brasília, 18 de dezembro de 2002.

MACHLIN L.J. *Handbook of vitamins* In: BRODY, T. **Folic Acid**. 2nd. rev. and Expanded. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 340-400.

CATHARINO. Rodrigo R. Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos: **desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. 3 cap. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP. 2000.

CRANE, N. T.; WILSON, D. B.; COOK, D. A.; LEWIS, C. J.; YETLEY, E. E.;

RADER, J. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **American Journal of Public Health**, v. 85, nº 5, p. 660-666, 1995

CUNNIFF, P. (nd) **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th, Gaithersburg, Maryland: AOAC International: 1997. v.

CZEIZE, A. E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New England Journal of Medicine*. v. 327, nº 26, p. 1832-1835, 1992.

DALY, S., MILLS, J. R., MOLLOY, A. M., CONLEY, M., LEE, Y. J., KIRKE P. N., WEIR, D. G., SCOTT, J. M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet*. v. 350, nº 9092, p. 1666- 1669, 1997.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1nd. Ed. Edgard: Blücher, 1997. p. 230-233.

DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B6. Supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **International Journal of Vitamin and Nutrient Research**. v. 68, p. 98-103, 1998.

KATZUNG B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994. p. 142-144.

MACRAE, R. HPLC determination of vitamins. **Journal Micronutrients Analysis**. v. 7, p. 247-260, 1990.

MAILNOW, M. R.; DUELL, P. B.; HESS, D. L.; ANDERSON, P. H.; KRUGER, W. D.; PHILLIPSON, B. E.; GLUCKMAN, R. A.; BLOCK, P. C.; UPSON, B. M. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary disease. **New England Journal of Medicine**. v. 338, nº 15, p. 1009-1015, 1998.

MOSHFEGH, A. J.; COOK, A. J.; HO, J. M.; FRIDAY, J. E. Folate intakes. **Food Surveys Research Group**. BHNCR, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.

OAKLEY, G. P. JR; ERICKSON, J. D.; ADAMS, M. J. Urgent need to increase folic acid consumption. **Journal of American Medical Association**, v. 274, nº 21, p. 1717-1718, 1995.

PARODI, P. W. Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. **The Australian Journal of Dairy Technology**. v. 52, p. 109-118, 1997.

POLESELLO, A.; RIZZOLO, A. Application of HPLC to the determination of water soluble vitamins in foods: 2 (a review 1985-1989). **Journal Micronutrients Analysis**. v. 8, p. 105-158, 1990.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, Koogan, 1997.

TAMURA, T.; MESSING, B. Bioavailability of folic acid in fortified food. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 66, nº 6, p. 1299-1300, 1997.

TUCKER, K. L.; MAHNKEN, B ; WILSON, P. W. F. ; JACQUES, P. ; SELHUB, J. Folic acid fortification of the food supply. Potential benefits and risks for the Elderly population. **Journal of the American Medical Association**. v. 276, nº 23, p. 1879-1885, 1996.

ULENE, A.; ULENE, V. **Vitamins**. 1ed. Blumenau, EKO, 1995.

WERMINONT, G. T. **Use of statistic to develop and evaluate analytical methods**. Virginia: AOAC, 1985. p. 183-189.

CAPÍTULO 1

METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE FOLATOS EM ALIMENTOS: UMA REVISÃO.

Enviado para publicação no Boletim do SBCTA

**Catharino, R. R., Azevedo, J. L., Godoy, H. T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
C.P. 6121 CEP - 13083-970
robit@bol.com.br**

MÉTODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE FOLATOS EM ALIMENTOS

-UMA REVISÃO-

Catharino, R. R., Azevedo, J.L., Godoy, H.T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
C.P. 6121 CEP - 13083-970
robit@bol.com.br

Resumo

Até pouco tempo atrás, os folatos, termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente mas também com atividade semelhante a do ácido fólico, tinham apenas algumas poucas funções elucidadas em relação ao organismo humano. Atualmente, sabe-se que os folatos estão envolvidos em inúmeras reações metabólicas e são extremamente importantes para a manutenção da saúde. A carência dessa vitamina, pertencente ao grupo das vitaminas hidrossolúveis, vem sendo relacionada a uma série de doenças graves como a anemia megaloblástica, câncer, distúrbios cardíacos e malformações congênitas, entre outras. As principais fontes de folatos são os vegetais folhosos e as leveduras, além de carnes, fígado, rins, frutas, cereais e leguminosas (BRODY, 1991, FRANCO, 1992). Porém, trabalhos para confirmar ou encontrar novas fontes de folatos e assegurar a qualidade nutricional desses alimentos são escassos, bem como, as metodologias desenvolvidas com esse propósito que muitas vezes são impossíveis de serem reproduzidas nos laboratórios nacionais de análise de alimentos. Embora a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) seja uma das técnicas analíticas mais

utilizadas para análise de vitaminas em função de sua sensibilidade e precisão, e a mais indicada para a separação das diferentes formas de folatos ativos, em uma única análise, só alguns poucos trabalhos são encontrados na literatura.

Abstract

Until fairly recently, the functions of folates, a general term used for a group of compounds with structures and activities similar to those of folic acid, were little understood with respect to the human body. Nowadays we know that folates are involved in several metabolic reactions and are most important for the maintenance of health. The lack of this vitamin, which belongs to the water-soluble group of vitamins, has been associated with a series of serious diseases such as megaloblastic anemia, cancer, heart disease and congenital malformations, amongst others. The main sources of folate are green vegetables and yeasts, as well as meats, liver, kidneys, fruits, cereals and vegetables in general (BRODY, 1991, FRANC, 1992). However, research to confirm or to find new sources of folate and to assure the nutritional quality of these foods is scarce, as are methodologies created for this purpose that are frequently impossible to reproduce in the national laboratories for food analysis. High performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most widely used analytical techniques for vitamin analyses as a function of its sensitivity and precision and is the most indicated technique for the separation of the different forms of active folates in a single analysis. Nevertheless few papers on this subject can be found in the literature.

1. INTRODUÇÃO

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também é conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B₉, vitamina B₁₂ e vitamina M. Está naturalmente presente em alimentos, geralmente, na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, com 2 a 7 resíduos de ácido glutâmico (DEVLIN, 1997). Folatos é um termo geral que se refere a compostos com estrutura e atividade biológica semelhante a do ácido fólico (BRUBACKER *et al.*, 1985, KEAGY, 1985, BÜHLER, 1988, BRODY, 1991, ZANINI e OGA, 1994, BRODY, 1994, DALY *et al.*, 1997).

Os folatos estão sendo apontados como “a vitamina do futuro”. Acredita-se que uma das consequências diretamente relacionado à carência dos folatos com maior repercussão mundial, são as malformações congênitas. Recentemente, inúmeros trabalhos publicados mostram que a carência de folatos, também, pode causar doenças cardiovasculares, câncer e desordens mentais, como o mal de Alzheimer (GREGORY III, 2001, **SESHADRI** *et al.*, **2002**).

Apesar do ácido pteroilglutâmico (PteGlu) ser a estrutura química comum aos folatos (Figura 1), ele não é o principal congênere nos alimentos, nem a coenzima ativa no metabolismo intracelular. Os folatos encontrados nos alimentos estão, predominantemente, na forma de poliglutamatos, sendo o 5-metiltetraidrofolato o congênere majoritário. Durante o transporte gastrointestinal, os poliglutamatos são hidrolisados a monoglutamatos, reduzidos e metilados.

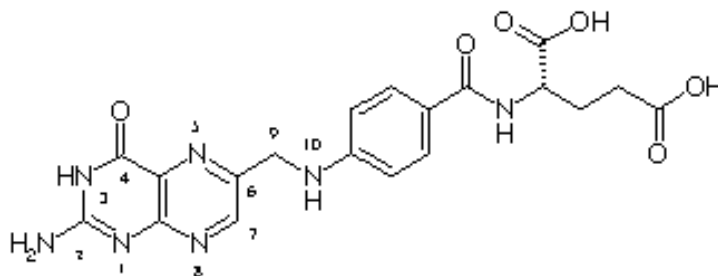


Figura 1. Ácido pteroilglutâmico (Pteglu).

Os folatos estão na natureza em diferentes formas, cada uma sendo sintetizada a partir de reações de metilação e replicação celular nos organismos, desempenhando um papel específico no metabolismo intracelular humano, conforme apresentado na Tabela 1. Entretanto o principal papel dos folatos é a formação de co-fatores essenciais às reações de metilação e replicação celular (GOODMAN e GILMAN, 1991, KATZUNG, 1994, ZANINI e OGA, 1994, ALVAREZ, 1997, DALY *et al.*, 1997).

A deficiência de folatos no organismo humano é causada por vários fatores, entre eles a demanda aumentada, má absorção, erros genéticos no metabolismo de folatos ou pelo consumo dietético inadequado (TAMURA e MESSING 1997, CZEIZE, 1992). Segundo DELVIN (1997), os levantamentos sobre o consumo alimentar demonstraram que a causa mais comum da deficiência de folatos tem origem nutricional.

Tabela 1. Nomenclatura e funções bioquímicas dos principais congêneres do ácido pteroilglutâmico.

Composto	Congênere	Radical	Posição	Função
Metiltetraidrofolato	CH ₃ H ₄ PteGlu	-CH ₃	N5	*Conversão de homocisteína a metionina.*Conversão de serina a glicina.
Ácido folínico	5-CHOH ₄ PteGlu	-CHO	N5	Síntese de purinas.
10-Formiltetraidrofolato	10-CHOH ₄ PteGlu	-CHO	N10	*Síntese de purina. *Utilização ou geração de formato.
5,10-Meteniltetraidrofolato	5,10-CHH ₄ PteGlu	-CH-	N5-10	*Síntese de purina.
5,10-Metilenotetraidrofolato	5,10-CH ₂ H ₄ PteGlu	-CH ₂ -	N5-10	*Síntese de timidilato
Formiminotetraidrofolato	CHNHH ₄ PteGlu	-CHNH	N5	*Metabolismo da histidina.

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) reconheceu a importância dos folatos, através da Resolução nº 344 de 13/12/2002, obriga o enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico (Brasil, 2002).

Embora os folatos estejam presentes em um grande número de alimentos, o conhecimento dos teores reais dessa vitamina tem sido dificultado pela falta de laboratórios preparados para a realização das análises, e principalmente, pela falta de metodologias analíticas adequadas (FINGLAS *et al.*, 1999). Infelizmente, os resultados encontrados na literatura sobre o conteúdo de folatos necessitam serem reavaliados, especialmente pelas dificuldades analíticas inerentes aos métodos utilizados (CATHARINO, VISENTAINER, GODOY, 2003). Esses dados são muito importantes na reformulação das tabelas de composição de alimentos, onde muitos dos teores apresentados são discrepantes, dificultando comparar os valores e a estimativa do consumo dietético com um certo grau de confiabilidade. Além disso, as

amostras de alimentos podem variar amplamente tanto na composição qualitativa como quantitativa, o que dificulta o estabelecimento de um método geral para determinação do valor vitamínico. Essas tabelas são ferramentas indispensáveis para os profissionais da área de saúde para adequar a ingestão de folatos, substâncias importantes para a manutenção da saúde e prevenção de determinadas doenças.

Existe uma lacuna muito grande em relação ao estabelecimento da bioatividade e biodisponibilidade das diferentes formas de folatos (GREGORY, 1985, KONINGS, 1999, SCOTT, RÉBEILLÉ, FLETCHER, 2000). Estudos nesse sentido só serão conclusivos com técnicas analíticas que permitam a separação e quantificação dos diferentes folatos presentes nos alimentos.

Independente do método utilizado para a determinação de folatos, algumas características são indispensáveis, como a separação individual das suas diferentes formas, medidas para evitar perdas dos folatos durante a análise e adequação do método à natureza da amostra para obtenção de dados confiáveis. À medida que essas exigências são cumpridas, é claro que a execução do método se torna cada vez mais difícil, porém simplificações podem ser introduzidas, sem prejuízo do resultado final.

Os primeiros procedimentos utilizados para a determinação de folatos baseavam-se em métodos biológicos e microbiológicos. A principal vantagem desses métodos é a avaliação da biodisponibilidade da vitamina, baseados nos requerimentos nutricionais de animais de laboratório ou de um microrganismo. Entretanto, apresentam algumas limitações, além de quantificações pouco precisas. O método oficial para a determinação de ácido fólico e folatos em alimentos (CUNNIFF, 2000) é um método microbiológico que apresenta, inconvenientes, como baixa precisão, lentidão na análise

e exatidão questionável, além de não permitir a determinação das diferentes formas de folatos.

Os métodos químicos apresentam muitos problemas em decorrência da presença de muitos interferentes na análise de matrizes alimentícias, além de apresentarem muitos inconvenientes, como baixa confiabilidade e quantificação pouco precisa. Recentemente, a literatura vem apresentando avanços em relação às técnicas utilizadas nos métodos para a determinação de folatos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão, exatidão, possibilitando a determinação das diferentes formas de folatos em uma única análise (SCOTT, RÉBEILLÉ, FLETCHER, 2000)

2. MÉTODOS DE ANÁLISE PARA ÁCIDO FÓLICO E FOLATOS

Os métodos para a determinação de folatos podem ser agrupados em cinco categorias: biológicos, microbiológicos, químicos, imunológicos e físicos (cromatográficos). Dentro de cada uma dessas categorias, o analista possui algumas opções de escolha entre os diferentes métodos, dependendo da finalidade da análise. Para a determinação de folatos totais podem ser utilizados métodos microbiológicos, biológicos ou químicos, porém para análise específica do valor vitamínico dos folatos deve-se utilizar métodos capazes de separar e quantificar isoladamente cada forma de folato, já que a bioatividade é diferente entre as diferentes formas ativas de folatos (JASTREBOVA *et al.*, 2003), assim como a ação dessas substâncias no organismo (KONINGS, 1999). Recomendando-se nesses casos a utilização dos métodos cromatográficos ou imunológicos.

2.1. Métodos Biológicos

Os métodos biológicos avaliam os efeitos da suplementação de dietas pobres em folatos sobre as características e comportamentos fisiológicos de animais de laboratório, tais como reprodução, crescimento e estocagem no fígado. O método biológico, O'DELL e HOGAN (1943) desenvolveram o primeiro método biológico utilizando frangos para determinar a substância, então conhecida como ácido fólico. Métodos utilizando ratos também foram desenvolvidos (GREGORY, 1985), porém, são inevitavelmente demorados, dispendiosos e de baixa repetibilidade, hoje raramente utilizados. No entanto, não se pode esquecer que os métodos biológicos são importantes ferramentas para o estabelecimento das vias bioquímicas dos folatos no organismo (HORNE e HOLLOWAY, 1997, SCOTT, RÉBEILLÉ, FLETCHER, 2000).

2.2. Métodos Microbiológicos

Em comparação com os métodos biológicos para determinação de vitaminas hidrossolúveis, as técnicas microbiológicas são mais reprodutíveis. Para a determinação de folatos os métodos microbiológicos apresentam algumas vantagens na sua aplicação e geralmente são mais aceitos quando a finalidade da análise é a determinação de folatos totais (GOLI e VANDERSLICE, 1989, RADER *et al.*, 1998). No entanto, não são métodos seletivos, respondendo igualmente as inúmeras formas de folatos, (FINGLAS *et al.*, 1999). No método oficial 992.05, descrito no Method of the Association of Official Analytical Chemistry (CUNNIFF, 1997), bem como no método descrito no Coopération Européenne dans le Domaine de la Recherche Science et Technique (BRUBACKER *et al.*, 1985), para a determinação de folatos, o microrganismo utilizado é o *Lactobacillus rhamnosus* (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC) 7469).

Tanto os métodos microbiológicos quanto os biológicos não permitem a determinação simultânea das diferentes formas de folatos determinando apenas os totais (TAMURA e MESSING, 1997).

2.3. Métodos Químicos

Os métodos químicos têm maior aplicação na síntese dos folatos e na determinação de concentrados vitamínicos e produtos farmacêuticos em virtude da alta concentração e ausência de interferentes. Porém, são métodos muito criticados, principalmente pela falta de sensibilidade quando comparados aos métodos microbiológicos, imunológicos e cromatográficos. Além disso, a presença de muitos interferentes acabam por comprometer a análise dos folatos, sendo muito pouco utilizados, principalmente para análise quantitativa.

Existem técnicas empregadas cujo princípio dos métodos químicos baseia-se na reação dos folatos com permanganato, liberando ácido p-aminobenzoico (PABA) formando um complexo colorido que é lido a 540nm (KEAGY, 1985).

2.4. Métodos Imunológicos

Os métodos imunológicos possuem como principais características a rapidez e a sensibilidade, embora a sensibilidade seja muitas vezes relativa. A rapidez é um fator muito importante quando se tem uma demanda bastante grande de análises. Porém os preços dessas análises são bastante altos, o que muitas vezes inviabiliza a análise de folatos para alguns laboratórios nacionais.

Uma das técnicas utilizadas para a determinação dos folatos é aquela na qual os mesmos são ligados com proteína ligante de folacina (FBP), originária do leite bovino, para então produzirem uma resposta imunológica, detectável através de uma

complexação com um anti-corpo, produzindo cor. Contudo, muitas substâncias podem dificultar a análise devido principalmente à conformação espacial adquirida pelas moléculas interferentes (RAUCH *et al.*, 1989, REICHERT, RUBACH, 1991). Além disso, é utilizado um marcador radioativo, exigem-se normas rigorosas de segurança e pessoas altamente capacitadas para realização dos ensaios, aumentando assim o custo do método (GREGORY, 1985). São métodos que, por sua vez, apresentam vantagens, como especificidade, rapidez e sensibilidade. As técnicas imunológicas são comumente empregadas para a determinação de folatos totais em fluídos biológicos (RAUCH *et al.*, 1989, REICHERT e RUBACH, 1991). Mais recente, aplicando esta técnica em alimentos (STRALSJO *et al.*, 2002, ARCOT, SHRESTHA, GUSANOV 2002), determinaram folatos em leite e em cereais matinais respectivamente.

2.5. Métodos Cromatográficos

Para os folatos com bioatividade específica (RUGGERI *et al.*, 1999), é necessário a separação e quantificação individual de cada composto e as técnicas cromatográficas se aplicam muito bem a essa finalidade.

A cromatografia em papel e a cromatografia em camada delgada foram as primeiras técnicas aplicadas para a determinação de folatos, porém os métodos apresentam dificuldades para realização, em especial, na quantificação ocasionada pela manipulação do papel ou da placa. A cromatografia a gás (CG) não foi muito empregada na tentativa de determinação de folatos, devido a baixa volatilidade e termo-instabilidade da vitamina, limitando assim o seu uso (McCORMACK e NEWMAN, 1992). DUEKER *et al.* (2000), determinaram folatos totais no sangue humano, utilizando um CG acoplado de um espectrômetro de massas, identificando o PABA.

2.5.1. Métodos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) está sendo hoje a técnica mais empregada para a análise de folatos (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, VAHTERISTO *et al.*, 1997 a e b, KONINGS, 1999, NDAW *et al.*, 2001, DOHERTY e BEECHER 2003). Vantagens como rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, alta sensibilidade e exatidão, além da melhor resolução na separação das diversas formas bioativas presente nos alimentos, tem sido atribuídas a esta técnica (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984, JÄGERSTAD, JASTREBOVA, SVENSSON, 2004).

A aplicação da CLAE na determinação de folatos em materiais biológicos e em alimentos ocorre de forma rápida, dependendo da otimização da extração da amostra, da purificação do extrato e dos métodos de detecção para cada tipo de análise requerida (GREGORY III, 1985, LUCOCK *et al.*, 1993, HOLLMAN *et al.*, 1993, LUCOCK *et al.*, 1995, CHLADEK, SIPERA, MRTINKOVA, 2000, NDAW *et al.*, 2001, DOHERTY e BEECHER 2003). Embora sempre citada como uma técnica rápida, muitas vezes as etapas antecedentes o procedimento cromatográfico são demorados e trabalhosos.

A determinação de vitaminas em alimentos envolve inicialmente a etapa de extração de compostos, frequentemente lábeis e em concentrações muito baixas, a partir de matrizes complexas. Assim, geralmente o procedimento de extração envolve extensiva hidrólise ácida e/ou enzimática, produzindo extratos com quantidades apreciáveis de compostos interferentes (AGOSTINI, 1996). Esses procedimentos de hidrólise e extração, provavelmente, constituem as mais importantes causas de variação na determinação de vitaminas hidrossolúveis, e a otimização dessas etapas representará um importante passo na eficiência do método (HOLLMAN, 1993).

Diferente da extração da maioria das vitaminas hidrossolúveis, a extração de folatos com o uso de tampão fosfato em concentrações de 0,075 até 0,1mol/L, adicionado de ácido ascórbico para a estabilização dos folatos, numa concentração de 0,1% até 2%, em pH variando de 4,5 até 7,4 foi a mais freqüente nos trabalhos revisados (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984, SCHULZ, WEIDEMANN, BITSCH, 1985, JACOB e HENRY, 1992, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, KONINGS, 1999, NDAW *et al.*, 2001, DOHERTY e BEECHER, 2003). Tampão acetato, em substituição ao fosfato, também foi utilizado na extração em concentrações que variaram de 0,0005 até 0,1mol/L (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984, STOKES e WEBB, 1999, JASTREBOVA *et al.*, 2003) bem como, a substituição do ácido ascórbico por ascorbato de sódio (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984). Já VAHTERISTO *et al.* (1996), STOKES e WEBB (1999), e RUGGERI *et al.* (1999) utilizaram o 2-mercaptoetanol, juntamente com o ácido ascórbico, para prevenir a oxidação dos folatos durante a extração. Recentemente, JASTREBOVA *et al.* (2003) utilizaram o 2-mercaptoetanol, combinado com fluxo de nitrogênio, na tentativa de minimizar a oxidação de folatos. DOHERTY e BEECHER (2003) com o mesmo objetivo de evitar a oxidação dos folatos utilizaram como solvente para extração o 2-octanol combinado ao hexano.

Depois de estabilizar as condições garantindo a não degradação dos folatos presentes nos alimentos, muitos trabalhos apontam a necessidade de hidrólise enzimática dos folatos poliglutâmicos em folatos monoglutâmicos utilizando conjugase. Plasma humano (HP) e pâncreas de porco (HK) como fonte de conjugases, com um tempo de reação de 3 horas à temperatura de 37°C, foram as condições empregadas por GREGORY III, SARTAIN, DAY,

(1984), SCHULZ, WEIDEMANN, BITSCH, (1985), LUCOCK *et al.* (1995) e VAHTERISTO *et al.* (1996). Em substituição às conjugases, a α -amilase foi empregada por OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, (1998) e RUGGERI *et al.* (1999) na determinação de folatos totais em cereais matinais e salames, respectivamente.

Após a estabilização e hidrólise pelas enzimas, compondo assim o procedimento de extração, vários procedimentos de limpeza, do extrato na tentativa de minimizar a presença de interferentes e análogos biologicamente inativos, são utilizados pelos pesquisadores.

Técnicas simples de filtração (SCHULZ, WEIDEMANN, BITSCH, 1985) ou centrifugação (OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998, STOKES e WEBB, 1999) foram utilizadas. O emprego de ácido tricloroacético (TCA), para desproteinização dos extratos, seguido de centrifugação foi sugerido por RUGGERI *et al.* (1999). Métodos de limpeza utilizando colunas de extração em fase sólida, particularmente colunas de troca iônica compostas por amina quaternária (SAX), foram largamente utilizados nos últimos anos, tanto para purificação como concentração dos folatos (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, OSSEYI *et al.*, 1998, KONINGS, 1999, STOKES e WEBB, 1999, CHO, KO, CHENONG, 2000, DOHERTY e BEECHER, 2003). Cartuchos de Sep-pak C₁₈ (STOKES e WEBB, 1999) e ZorbaxSB C₈ (JASTREBOVA *et al.*, 2003) foram utilizados com a mesma finalidade. RUGGERI *et al.* (1999) e NDAW *et al.* (2001) utilizaram para purificação do extrato de alimentos ricos em proteína colunas de bioafinidade, contendo proteína ligante de folatos (FBP).

No sistema cromatográfico, fases móveis tamponadas, com ou sem modificador orgânico, foram as mais utilizadas. Os modificadores orgânicos mais empregados foram metanol e acetonitrila (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984, GREGORY, 1985, SCHULZ, WEIDEMANN, BITSCH, 1985, LUCOCK *et al.*, 1993, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, VAHTERISTO *et al.*, 1997b, OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998, KONINGS, 1999, RUGGERI *et al.*, 1999, STOKES e WEBB 1999, NDAW, *et al.*, 2001, DOHERTY e BEECHER 2003, JASTREBOVA *et al.* 2003). O par iônico (PI) tetrabutyl-aminofosfato (TBAP) foi utilizado em alguns trabalhos na composição da fase móvel (SCHULZ, WEIDEMANN, BITSCH, 1985, OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998), já CHLADEK, SIPERA, MRTINKOVA, (2000) utilizaram o ácido octasulfônico. Observou-se nos cromatogramas apresentados nesses trabalhos que a utilização dos pares iônicos permitiram a obtenção de picos bem mais simétricos e finos que os obtidos nos trabalhos sem a utilização do PI nas fases móveis.

Nos trabalhos analisados observou-se um equilíbrio entre os dois tipos de eluição empregados para a determinação de folatos. GREGORY (1985), SCHULZ, WEIDEMANN, BITSCH, (1985), LUCOCK *et al.* (1993), LUCOCK *et al.* (1995), VAHTERISTO *et al.* (1996) e OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, (1998) deram preferência ao sistema de eluição isocrática, enquanto que, em trabalhos mais recentes, a utilização de gradientes tem-se mostrado muito eficiente na separação de mais formas de folatos (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984, VAHTERISTO *et al.*, 1997a e b, KONINGS, 1999, RUGGERI *et al.*, 1999, STOKES e WEBB, 1999, NDAW *et al.*, 2001, CATHARINO, 2003, DOHERTY e BEECHER, 2003, JASTREBOVA *et al.*, 2003).

As colunas mais empregadas para a separação de folatos foram as de fase reversa de octadecilsilano (C_{18}) (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984, SCHULZ, WEIDEMANN, BITSCH, 1985, VAHTERISTO *et al.*, 1996, VAHTERISTO *et al.*, 1997a e b, OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998, KONINGS, 1999, RUGGERI *et al.*, 1999, STOKES e WEBB, 1999, CHO, KO, CHEONG, 2000, CHLADEK, SIPERA, MRTINKOVA, 2000, NDAW *et al.*, 2001, CATHARINO, VISENTAINER, GODOY, 2003, DOHERTY e BEECHER 2003, JASTREBOVA *et al.*, 2003). Outros tipos de colunas também foram utilizados na análise de folatos. DONG *et al.* (1988) utilizaram colunas de fase reversa C_8 para separação de folatos em leite e LUCOCK *et al.* (1995) empregaram coluna com fase ligada microporosa com grupamento fenil para a determinação de folatos em alimentos e fluídos biológicos. FINGLAS *et al.* (1999) utilizaram coluna com resina de poliacrilamida estireno divinilbenzeno (PLRPS) na separação dos folatos em vegetais. Porém, dados de comparação entre os diferentes tipos de colunas utilizadas na separação de folatos, com relação a melhor eficiência, rapidez e resolução, não foram encontrados na literatura.

O detector mais empregado para métodos de determinação de folatos em alimentos foi o de fluorescência, em comprimentos de onda de excitação variando de 280nm até 310nm, enquanto que o de emissão variou de 352nm até 372nm (JI, SAVON, JACOBESSEN, 1995, LUCOCK *et al.*, 1995, CHLADEK, SIPERA, MRTINKOVA, 2000, NDAW *et al.*, 2001, JASTREBOVA *et al.* 2003). A tentativa de aumentar a fluorescência do AF, do tetraidrofolato e do diidrofolato fez com que GREGORY III, SARTAIN, DAY, (1984) desenvolvessem uma reação de oxidação pós-coluna com hipoclorito de sódio e cloridina, com a finalidade de quebrar o ácido fólico, o tetraidrofolato e o

diidrofolato em produtos pteridínicos, resultando em substâncias que apresentam maior fluorescência.

A detecção por absorção na região do ultra-violeta, (UV), que já foi utilizada em maior escala para detecção de folatos, hoje continua sendo usada principalmente para a detecção de ácido fólico, sendo que os comprimentos de onda variam de 254nm a 290nm (SCHULZ, WEIDEMANN, BITSCH, 1985, HORNE e HOLLOWAY, 1997, HOLT, WEHLING, ZEECE, 1988, OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998), com a evolução para o uso de detectores de arranjo de diodos (DAD), que permitem, além da detecção, a obtenção de parâmetros para auxiliar a identificação (KONINGS, 1999, DOHERTY e BEECHER 2003, CATHARINO, 2003). GREGORY III, SARTAIN, DAY, (1984), VAHTERISTO *et al.* (1996), RUGGERI *et al.* (1999) e JASTREBOVA *et al.* (2003) utilizaram detectores de UV e fluorescência, em série, para a detecção do ácido fólico e dos demais folatos, respectivamente.

Detectores eletroquímicos foram empregados para análise de folatos em fluídos biológicos e alimentos por LUCOCK *et al.* (1993) e BAGLEY e SELHUB (2000). LUCOCK *et al.* (1995) fizeram uma comparação entre a utilização do detector eletroquímico, de fluorescência e UV com arranjo de diodos para a determinação de folatos em alimentos e fluídos biológicos, recomendando a determinação do sinal do AF no UV e para os demais folatos, dependendo do tipo e concentração do folato a ser determinado e da complexidade do extrato, os três tipos de detectores poderiam ser utilizados, embora o de fluorescência fosse o mais indicado para baixas concentrações e extratos complexos. STOKES e WEBB (1999) utilizaram um espectrômetro de massas (MS) como

detector para determinação e confirmação de folatos em complexos vitamínicos, carnes, vegetais e cereais matinais.

A identificação dos folatos, na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, foi feita por comparação do tempo de retenção do composto presente na amostra, com o fornecido pelo padrão e por co-cromatografia (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984, SCHULZ, WEIDEMANN, BITSCH, 1985, FARRAR *et al.*, 1992, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, VAHTERISTO *et al.*, 1997 a e b, JASTREBOVA *et al.*, 2003). Um dos problemas nesse tipo de identificação é que o tempo de retenção pode variar de uma matriz alimentícia para outra, podendo diferir dos compostos vitamínicos puros. O perfil do espectro de absorção obtido no DAD, além do tempo de retenção e da co-cromatografia, foi utilizado por KONINGS (1999), para identificação dos folatos em materias de referência certificado. Técnicas mais sofisticadas foram aplicadas por STOKES e WEBB (1999), onde os folatos foram confirmados através da espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo a líquido.

A quantificação, em todos os trabalhos revisados, foi feita através da construção de curvas analíticas por padronização externa, utilizando a área dos picos (GREGORY III, SARTAIN, DAY, 1984, SCHULZ, WEIDEMANN, BITSCH, 1985, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, VAHTERISTO *et al.*, 1997 a e b, OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998, KONINGS, 1999, RUGGERI *et al.*, 1999, JASTREBOVA *et al.*, 2003, CATHARINO, 2003).

A eletroforese capilar vem sendo utilizada na determinação de todas as vitaminas do complexo B, incluindo o AF, em produtos farmacêuticos. Entretanto, ainda é uma técnica bastante recente, reservada para fins de

pesquisa, não estando ainda disponível para métodos analíticos de rotina (GOMIS *et al.*, 1999). A literatura não apresenta nenhum trabalho com a determinação de folatos em alimentos utilizando essa técnica, possivelmente pelo alto custo da instrumentação e pela baixa sensibilidade quando comparada à obtida pela CLAE.

3. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

O primeiro passo para a obtenção de dados analíticos confiáveis está no uso de método analítico validado, pois resultados analíticos obtidos de métodos que não tenham passado por um processo de validação são considerados duvidosos (VALENTE SOARES, 2001). A qualidade e a credibilidade de um trabalho analítico se fundamentam nos cuidados com os quais o analista se cerca para produzir dados que expressem o valor real da medida obtida (CHASIN *et al.*, 1998).

Existem diferentes formas para se validar uma metodologia e vários procedimentos estatísticos são utilizados com essa finalidade (YOUNDEN, 1982, WERMINONT, 1985, TAYLOR, 1987, MILLER e MILLER, 1988). Recentemente, pesquisadores cada vez mais preocupados com a qualidade dos dados analíticos fornecidos por seus laboratórios, fizeram validações de suas metodologias para a determinação de folatos. Entre eles destacam-se os desenvolvidos por FINGLAS *et al.* (1999), KONINGS (1999) e JASTREBOVA *et al.* (2003) que utilizaram materiais de referência certificados para a validação de metodologia e, CHLADEK, SIPERA, MRTINKOVA, (2000), que validaram sua metodologia de forma interlaboratorial.

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, T. S. **Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B1, B2, B6, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos.** Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 1996.
- ALVAREZ, M. A. **Bioquímica da nutrição vitaminas, fibras e minerais.** 1ed. Editora Plêiade, São Paulo, 1997.
- ARCOT, J., ASHOK S. K., GUSANOV, U. Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. **Food Control**, **13**: 245-252, 2002
- BAGLEY, P. J. SELHUB J. Analysis of folate form distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrochemical detection. **Clinical Chemistry**, **46** (3): 404-411, 2000.
- BRASIL. Resolução- RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. Diário oficial da União, Brasília, 18 de dezembro de 2002.
- BRODY, T. Folic Acid In: MACHLIN L.J. **Handbook of vitamins.** 2ed. rev. and Expanded. NewYork: Marcel Dekker, 1991.
- BRODY, T. **Nutritional biochemistry.** United Kingdom. Honolulu, Hawaii: Academic Press Limited, 1994.
- BRUBACKER, G., MULLER-MULLOT, W., SOUTHGATE, D. A. T. **Methods for the Determination of Vitamins in Food, Recommended by COST 91**, Elsevier Applied Science Publishers, New York, 1985.
- BÜHLER, V. **Vademecum for Vitamin Formulations**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1988.
- CATHARINO, R. R., VISENTAINER, J. V., GODOY, H. T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **23** (3): 389-395, 2003.
- CHASIN, A. A. M., NASCIMENTO, E. S., RIBEIRO-NETO, L. M., SIQUEIRA, M. E. P. B., ANDRAUS, M. H., SALVADORI, M. C., FERNICOLA, N. A. G., GORNI, R., SALCEDO, S. Validação em métodos em análise

- toxicológicas:uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, **11**(1): 1-6, 1998.
- CHLADEK, J., SIPERA L., MRTINKOVA, J. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of 5-methyltetrahydrofolate in human plasma. **Journal Chromatography B**, **744**: 307-313, 2000.
- CHO, C. M., KO, J. H., CHEONG, W. J. Simultaneous determination of water-soluble vitamins excreted in human urine after eating na overdose of vitamin pills by a hplc method couple with a solid phase extration. **Talanta**. **51** (4): 799-806, 2000.
- CUNNIFF, P. (Ed) **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17ed AOAC International, Gaithersburg, Maryland, 1997.
- CZEIZE, A. E., DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by perioconceptional vitamin supplementetion. **New England Journal of Medicine**. **327** (26): 1832-1835, 1992.
- DALY, S., MILLS, J. R., MOLLOY, A. M., CONLEY, M., LEE, Y. J., KIRKE P. N., WEIR, D. G., SCOTT, J. M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet*, 350 (9092): 1666- 1669, 1997.
- DEVLIN,T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**.1ed. Ed. Edgard Blücher, 1997.
- DOHERTY R. F., BEECHER G. R. A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods. **Journal of Agricultural and food chemistry**, **51**: 354-361, 2003.
- DONG, M. W., LEPORE, J., TARUMOTO, T. Factors affecting the ion-pair chromatography of water-soluble vitamins. **Journal of Chromatography**, **442**: 81-95, 1988.
- DUEKER, S. R., LIN Y., JONES A. D., MERCER, R., FABBRO, E., MILLER J. W., GREEN, R., CLIFFORD, A. J. Determination of blood folate using acid extration and internally standardized gas chromatography-mass spectrometry detection. **Analytical Biochemistry**, **283**: 266-275, 2000.
- FARRAR, G., BUSS, D. H., LOUGHRIDGE, J., LEEMING, R. J., HUGHES, K., BLAIR, J.A. **Food folates and the British total diet study**. *Journal Human Nutrition Diabetics*, **5**: **237-249**, **1992**.

- FINGLAS, P. M., WIGERTZ, K., VAHTERISTO, L., WITTHÖFT, C., SOUTHON, S., FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**, **64**: 245-255, 1999.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**, 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
- GOLI, D. M., VADERSLICE J. T. Microbiological assay of folacin using a CO₂ analyzer system. **Journal of Micronutrient Analysis**, **6** (1): 19-33, 1989.
- GOMIS, D. B., GONZALES, L. L., ÁLVAREZ, D. G. Micelar electrokinetic capillary chromatography analysis of water-soluble vitamins. **Analytica Chimica Acta**, **396** (1): 55-60, 1999.
- GOODMAN, L. S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapeutica**. 8ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1991.
- GREGORY III, J. F., SARTAIN, D. B., DAY, B. P. Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. **Journal Nutrition**, **114**: 341-353, 1984.
- GREGORY III, J. F. Folacin II In: AUGUSTIN J., KLEIN, B. P., BECKER, D., VENUGOPAL, P. B. **Methods of vitamin assay**. 4ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1985.
- GREGORY III, J. F. Case study: Folate bioavailability. **Journal of Nutrition**, **131** (4): 1376S-1382S, 2001.
- GREGORY III, J. F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Advances Food Nutrition Research**, **33**: 1-101, 1989.
- HOLLMAN, P. C., SLANGE, J. H., WAGSTAFFE, J. P., FAURE, U., SOUTHGATE, D. A. T., FINGLAS, P. M. Intercomparison of methods for the determination of vitamins in food. **Analyst**, **118**: 481-488, 1993.
- HOLT, D. L., WEHLING, R. D., ZEECE, M. G. Determination of native folates in milk and other dairy products by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, **449**: 271-279, 1988.
- HORNE, D. W., HOLLOWAY R.S. Compartmentation of folate metabolism in rat pancreas: nitrous oxide inactivation of methionine synthase leads to

- accumulation of 5-methyltetrahydrofolate in cytosol. **Journal of Nutrition**, **127** (9): 1772-1775, 1997.
- JACOBY, B. T., HENRY, F. T. Liquid chromatographic determination of folic acid in infant formula and adult medical nutritionals. **Journal of Association of Official Agricultural Chemists International**, **75** (5): 891-898, 1992.
- JÄGERSTAD, M., JASTREBOVA, J., SVENSSON, U. Folates in fermented vegetables—a pilot study. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie** **37**: 603-611, 2004.
- JASTREBOVA, J., WITTOFT, C., GRAHN, A., SVENSSON, U., JAGERSTAD, M. HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. **Food Chemistry**, **80** (4): 579-588, 2003.
- JI, A. J., SAVON, S. R., JACOBESSEN, D. W. Determination of total serum sulfite by HPLC with fluorescence detection. **Clinical Chemistry**, **41** (6): 897-903, 1995.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- KEAGY, P. M. Folacin I In: AUGUSTIN, J., KLEIN, B.P., BECKER, D., VENUGOPAL, P.B. **Methods of vitamin assay**. 4ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1985.
- KONINGS, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. **Journal of Association of Official Agricultural Chemists International**, **82** (1): 119-127, 1999.
- LUCOCK, M. D., GREEN, M., HARTLEY, M., LEVENE, I. Physicochemical and biological factors influencing methylfolate stability: use of dithiothreitol for HPLC analysis with electrochemical detection. **Food Chemistry**, **47**: 79-86, 1993.
- LUCOCK, M. D., GREEN, M., PRIESTNALL, M., DASKALAKIS, I., LEVENE, H.M.I. Optimization of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. **Food Chemistry**, **53**: 329-338, 1995.
- MCCORMACK, J. J., NEWMAN, R. A. Chromatographic studies of folic acid and Related Compounds In: De LEENHEER, A.P., LAMBERT, W.E., NELIS,

- H.J. **Modern chromatographic analysis of vitamins**. 30. 1ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1992.
- MILLER, J. C., MILLER, J. M. **Statistic for analytical chemistry**. 2ed. Horwood. p. 117, 1988.
- NDAW,S., BERGAENTZLÉ M., AOUDÉ-WERNER D., LAHELY S., HASSELMANNNC. Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection afeter precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates. **Journal of Chromatography A**, 928: 77-90, 2001.
- O'DELL, B. L., HOGAN, A. G. Additional observations on the chick anti-anemia vitamin. **Journal Biologic Chemistry**, 149: 323-332, 1943.
- OSSEYI, E. S., WEHLING, R. L., ALBRECHT, J.A. Liquid chromatographic method for determination added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, 826 (2): 235-240, 1998.
- RADER, J. I., WEAVER, C. M., AGYAL G. Use of microbiological assay with tri-enzyme extration for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. **Food Chemistry**, 62 (4): 451-465, 1998.
- RAUCH, P., K. A. S. J., STREJCEK, F., CERNA, J. Radioassay of folacin in foodstuffs. **Journal of Foods Biochemistry**, 13 (1): 21-29, 1989.
- REICHERT, N., RUBACH, K. Determination of biotin and folic acid in vitamin-enriched foods by competitive binding protein assay and ELISA. **Deutsche-Lebensmittel Rundschau**, 87 (11): 341-345, 1991.
- RUGGERI, S., VATHERISTO, L. T., AGGUZZI, A., FINGLAS, P., CARNOVALE, E. Determination of folate vitamers in food and italian reference diet by high performace liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 855 (1): 237-245, 1999.
- SESHADRI, S., BEISER, A., SELHUB, J. , JACQUES, P. F., ROSENBERG, I. H., D'AGOSTINO, R. B., WILSON, P. W. F., WOLF, P. A. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **The New England Journal Of Medicine**, 346 (7): 476-483, 2002.
- SCOTT, J., RÉBEILLÉ, F., FLETCHER, J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80: 795-824, 2000.

- SCHULZ, A., WEIDEMANN, K., BITSCH, I. Stabilisation of 5-CH₃H₄-Pglu and subsequent analysis by reverse phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography** , **328**: 417-421, 1985.
- STOKES, P., WEBB, K. Analysis of some folate monoglutamates by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, **864** (1): 59-67, 1999.
- STRALSJO, L., ARKBAGE, K., WITTHOFT, C., JAGERSTAD, M. Evaluation of a radioprotein-binding assay (RPBA) for folate analysis in berries and milk. **Food Chemistry**, **79**: 525- 534, 2002.
- TAMURA, T., MESSING, B. Bioavailability of folic acid in fortified food. **American Journal of Clinical Nutrition**, **66** (6): 1299-1300, 1997.
- TAYLOR, J.K. **Quality assurance of chemical measurements**. 2ed. Chelsea, 1987.
- VAHTERISTO, L.T., OLLILAINEN, V., KOIVISTOINEN, P. E., VARO, P. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. **Journal Agriculture Food Chemistry**, **44** : 477-482, 1996.
- VAHTERISTO, L. T., OLLILAINEN, V., VARO, P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg, and dairy products consumed in Finland. **Journal of Association Official Analytical Chemists International**, **80** (2): 373-378, 1997a.
- VAHTERISTO, L. T., OLLILAINEN, V., VARO, P. Application of HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland, **Food Chemistry**, **59** (4.): 589-597, 1997b.
- VALENTE SOARES, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, **60** (1): 79-84, 2001.
- WERMINONT, G. T. **Use of statistic to develop and evaluate analytical methods**. AOAC, Virginia, p 183, 1985.
- WIGERTZ, K., JÄGERSTAD, K. Comparison of a HPLC and radioprotein-binding assay for the determination of folates in milk and blood samples, **Food Chemistry**, **54** (4): 429-436, 1995.
- YOUNDEN, W. J. Statistical techniques for collaboratives test In: **Statistical Manual of the AOAC**. 3ed .Arlington, p 88, 1982.

ZANINI, A. C., OGA, S. **Farmacologia aplicada.** 5ed. São Paulo: Atheneu, 1994.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM ALIMENTOS

Artigo a ser submetido ao Journal of Chromatography A

**Catharino, R. R., Azevedo, J. L., Godoy, H. T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
C.P. 6121 CEP - 13083-970
robit@bol.com.br**

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM ALIMENTOS

Rodrigo R. Catharino, Juliana A. Lima, Helena T. Godoy
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
C.P. 6121 CEP 13083-970
robit@bol.com.br

RESUMO

Técnicas para a determinação de folatos em alimentos tem sido desenvolvidas nos últimos anos com intuito de confirmar e descobrir fontes existentes, garantindo a ingestão dessa vitamina através da dieta, e dando subsídios aos programas de ingestão de folatos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinação simultânea de seis diferentes formas de folatos, incluindo o ácido fólico. Os melhores resultados foram obtidos com a extração com solução de acetato de amônio (0,05mol/L) e com ácido tricloroacético para limpeza do extrato. A separação das diferentes formas de folatos foi obtida utilizando coluna C_{18} e gradiente com fase aquosa (água, ácido acético; pH ajustado para 2,8 com KOH) e acetonitrila. Quatro dos folatos foram detectados através da fluorescência natural dos compostos [λ_{exc} 290nm e λ_{emis} 360nm para o 5-metiltetraidrofolato (5MTHF), 5-formiltetraidrofolato (5FTHF) e tetraidrofolato (THF) e λ_{exc} 360nm e λ_{emis} 445nm para o 10-formil-ácido-fólico (10FAF)]. O 10-metil-ácido-fólico (10MAF) e ácido

fólico (AF) foram detectados através da absorção na região do ultra-violeta a 290nm, usando detector de arranjo de diodos (DAD). A identificação foi feita por comparação com os tempos de retenção, co-cromatografia e pelos espectros de absorção. A quantificação foi feita por padronização externa. As curvas analíticas apresentaram boa linearidade, com coeficientes de correlação variando de 0,9878 a 1,0000, sendo os limites de detecção e recuperação, respectivamente, 5pg/mL e 94-108% para o 5MTHF, 7pg/mL e 97-102% para o THF, 30pg/mL e 97,9-104% para o 5FTHF, 30pg/mL 95-105 para o 10FAF, 5ng/mL e 97-102% para o AF, e 5ng/mL e 98-103% para o 10MAF. Testes de repetibilidade apresentaram um coeficiente de variação inferior a 3,9% para todas as formas de folatos. A metodologia proposta também foi aplicada a três materiais de referência certificados, fígado de porco (BCR487), leite em pó (BCR421) e mistura de vegetais (BCR485), comprovando a sua eficiência e aplicabilidade na análise de folatos em alimentos.

ABSTRACT

Techniques for the determination of folates in foods have been developed over the last few years both to confirm existing sources and to discover new ones and to guarantee the quality of folate enrichment programs. Thus, this work aimed to develop and validate a methodology using high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of six folates including folic acid. The best results were obtained by extracting with an ammonium acetate solution (0.05mol/L) and doing the clean-up with trichloroacetic acid. Separation of the different forms of folates was using achieved C₁₈ column and gradient with an aqueous phase (water, acetic acid; pH adjusted to 2.8 with KOH) and acetonitrile. Four of the folates were quantified using a

fluorescence detector with λ_{exc} 290nm and λ_{emis} 360nm for 5- methyltetrahydrofolate (5MTHF), 5-formyltetrahydrofolate (5FTHF) and tetrahydrofolate (THF); with λ_{exc} 360nm and λ_{emis} 445 nm for 10-formyl-folic-acid (10FAF) and 10-methyl-folic-acid (10MAF); and folic acid (FA) using a diode array detector (DAD) at 290nm. In all cases quantification was made by external standardization. The standardization curves presented good linearity, with coefficients of correlation varying from 0.9878 to 1.0000, The limits of detection and recovery for the vitamins in the five certified reference materials were respectively 5pg/mL and 94-108% for 5MTHF, 7pg/mL and 97-102% for THF, 30pg/mL and 97.9-104% for 5FTHF, 30pg/mL and 95-107 for 10FAF, 5ng/mL and 97-102% for AF and 5ng/mL and 98-103% for 10MAF. Repeatability showed a coefficient of variation below 3.9% for all the vitamins. The proposed methodology was shown to be efficient when applied to 3 different certified reference materials, pig's liver (BCR487), powdered milk (BCR421) and a vegetable mixture (BCR485).

INTRODUÇÃO

Pesquisas recentes tem levantado a hipótese de que a ingestão de vitaminas é insuficiente em grande parte da população. Assim sendo, muitos países tem adotado programas de enriquecimento de alimentos para tentar minimizar os efeitos da carência desses nutrientes. A descoberta e/ou a redescoberta de alimentos fontes pode colaborar também nesse sentido. Para tanto, a utilização de métodos de análise que proporcionam a confiabilidade necessária são ferramentas essenciais nesse processo [1].

A análise de vitaminas em alimentos envolve alguns desafios em decorrência da concentração em que se encontram, da presença de inúmeros

interferentes em função da complexidade da matriz e da exigência de cuidados especiais devido à baixa estabilidade desses nutrientes. Os maiores desafios para determinação de vitaminas em alimentos incluem, além do melhoramento dos processos de extração e limpeza, o desenvolvimento e a validação de métodos simultâneos que reduziriam, sensivelmente, o tempo gasto para a análise e os custos, ainda possibilitando uma menor geração de resíduos [2, 3, 4].

A literatura vem apresentando avanços nos métodos para a determinação de folatos, através de técnicas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15], em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão [2, 16]. Pesquisas com a CLAE tem sido realizadas para determinação simultânea de folatos, em preparações farmacêuticas multivitamínicas, e em alimentos [17, 18, 19]. Entretanto, a maior parte das determinações de folatos em alimentos envolvem a utilização de enzimas (conjugases) no processo de extração, o que dificulta muito a aplicação do método e aumenta o tempo de análise, além de promover a perda de folatos [5, 6, 7, 8, 9, 10].

Um outro fator importante para o conhecimento do potencial nutricional dos alimentos e a garantia do sucesso no desenvolvimento de novos produtos, é a qualidade dos dados analíticos. Planejamentos e análises estatísticas variadas, programas de comparação de métodos analíticos e o emprego de materiais de referência são as ferramentas utilizadas hoje pelos pesquisadores no controle de qualidade analítica para a determinação de folatos [10, 20, 21].

Dentro desse panorama, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de metodologia, utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência, na determinação simultânea de seis formas naturalmente e mais comumente presentes de folatos em alimentos.

MATERIAL E MÉTODO

3 Materiais

Três diferentes materiais de referência certificados, fígado de porco (BCR487), leite em pó (BCR421) e misturas de vegetais (BCR485), foram adquiridos do Instituto de Material de Referência e Padrões - Bélgica. Cada material foi totalmente homogeneizado antes da análise. Após a homogeneização, porções de 1,0g foram tomadas para a análise. Todas as determinações foram realizadas em duplicatas.

4 Reagentes

Os padrões de folatos, 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato sal de cálcio, tetraidrofolato, 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato sal de cálcio, 10-formil-ácido-fólico, 10-metil-ácido-fólico, foram adquiridos do laboratório SCHIRCKS - Suíça, e o ácido fólico (F-7876) foi adquirido da SIGMA (USA). A acetonitrila, grau cromatográfico, os ácidos acético e tricloroacético, bem como acetato de amônio, todos com grau de pureza analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. A água utilizada no preparo da fase móvel foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). A fase móvel foi filtrada em filtros MILLIPORE, com poros de 0,45µm de diâmetro.

6 Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100 μ L e detectores de arranjo de diodos (DAD) (UV-Visível) e de fluorescência dispostos em série. Ambos permitem a detecção simultânea em vários comprimentos de onda. Todo o sistema foi controlado pelo programa Chemstation-HP, que também gerencia o sistema de aquisição e tratamento de dados.

Para separação das diferentes formas de folatos foi utilizada uma coluna cromatográfica Microsorb ODS-2, 5 μ m, 250mm x 4,6mm d.i. (RAIMIN, USA) protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5 μ m, 10 x 4,6mm d.i. (VARIAN).

Metodologia Analítica

Para a extração foram tomadas 1,0g de material de referência certificado (CRM) previamente homogeneizada, que foi triturado com 9,0mL de solução de acetato de amônio (0,05mol/L) em homogeneizador e colocada em banho ultrassônico por dez (10) minutos. A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 10mL, para a purificação do extrato, adicionando-se 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) e aferindo-se o volume com solução de acetato de amônia. Após homogeneização, a amostra foi então adequadamente filtrada, primeiro em papel de filtro comum e depois em membrana Durapore (HVLP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45 μ m, e o extrato injetado no cromatógrafo (100 μ L).

A separação dos folatos foi feita através de um sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5 mL/min, desenvolvido com 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2,8 com KOH) no início, chegando em 25 minutos a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se essas condições até o final da corrida em 31 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada por 15 minutos, antes da próxima injeção. Quatro formas de folatos foram detectadas utilizando-se a fluorescência natural desses compostos (λ_{exc} 290nm e λ_{emis} 360nm para 5MTHF, 5FTHF e THF e λ_{exc} 360nm e λ_{emis} 445nm para 10FAF). O 10MAF e o AF foram detectados na região do ultra-violeta, a 290nm.

A identificação dos folatos foi feita por comparação entre os tempos de retenção, obtidos com os padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros obtidos com a utilização do detector de arranjo de diodos e fluorescência. O grau de pureza dos picos foi avaliado pelo sistema disponível no software Chemstation-HP. A quantificação foi realizada por padronização externa, construída a curva analítica com 5 níveis de concentração; sendo cada ponto representado pela média de três determinações. Para o 5-metiltetraidrofolato e tetraidrofolato as concentrações foram de 0,01 a 100 ng/mL para o 5MTHF e o THF; de 0,06 a 120,0ng/mL para a 5FTHF; de 0,06 a 60,0 ng/mL para o 10FAF; de 10 a 1000ng/mL para o AF e 10MAF.

Validação do Método

- Limites de Detecção e Quantificação

A avaliação do limite de detecção (LD) foi feita por diluições sucessivas dos padrões de folatos, onde determinou-se a menor quantidade detectável para cada um deles como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento ($S/R \geq 3$). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o LD [21].

- Testes de Recuperação

Para avaliação da exatidão do método foram realizados testes de recuperação de padrões adicionados à matriz, em dois diferentes níveis de concentração. Para o 5-metiltetrahidrofolato e tetraihidrofolato os níveis foram de 0,85 e 8,5µg/100g, para o 5-formiltetraidrofolato e 10-formil-ácido fólico de 0,65 e 6,5µg/100g, e para o ácido fólico e o 10-metil-ácido fólico de 50 e 100µg/100g. A recuperação foi calculada segundo Jastrebova et al. [11] e Iwatani et al. [15], onde:

$$R = (C_{\text{encontrado}} - C_{\text{amostra}}) / C_{\text{adicionado}}$$

R - representa o valor de recuperação encontrado

$C_{\text{encontrado}}$ - concentração total da amostra já adicionada de padrões

C_{amostra} - concentração de folatos encontrada na amostra sem adição de padrões

$C_{\text{adicionado}}$ - concentração adicionada de padrões

- Repetibilidade

O presente trabalho foi avaliado segundo o método de repetibilidade proposta por Caulcutt e Boddy [21], foram feitas cinco determinações, em duplicatas, do 5-metiltetrahydrofolato, tetrahydrofolato, 5-formiltetrahydrofolato, 10-formil-ácido fólico, 10-metil-ácido fólico e ácido fólico, em soluções padrões e em amostras de material de referência certificado, avaliado segundo a equação.

$$r = t \cdot \sqrt{sr}$$

95%.

r = repetibilidade, com significância de

sr = estimativa do desvio padrão.

t = t de Student .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapas Analíticas e Validação da Metodologia

A **Figura 1** mostra os cromatogramas da separação simultânea das diferentes formas de folatos em solução padrão. O emprego da coluna C₁₈ e a utilização do sistema de eluição por gradiente possibilitaram a eluição do tetrahydrofolato pico nº 1, 5-metiltetrahydrofolato pico nº 2, 10-formil-ácido fólico pico nº 3, 5-formil-ácido fólico pico nº 4, ácido fólico pico nº 5 e 10-metil-ácido fólico pico nº 6 em 19,12, 20,50, 21,52, 22,5, 26,14 e 27,72 minutos, respectivamente, com um tempo de análise total de 31 minutos. Em função da utilização do sistema de eluição por gradiente, o tempo de re-equilíbrio da

coluna foi utilizado em 15 minutos após o final da corrida e foi fundamental para reprodutibilidade e repetibilidade do método.

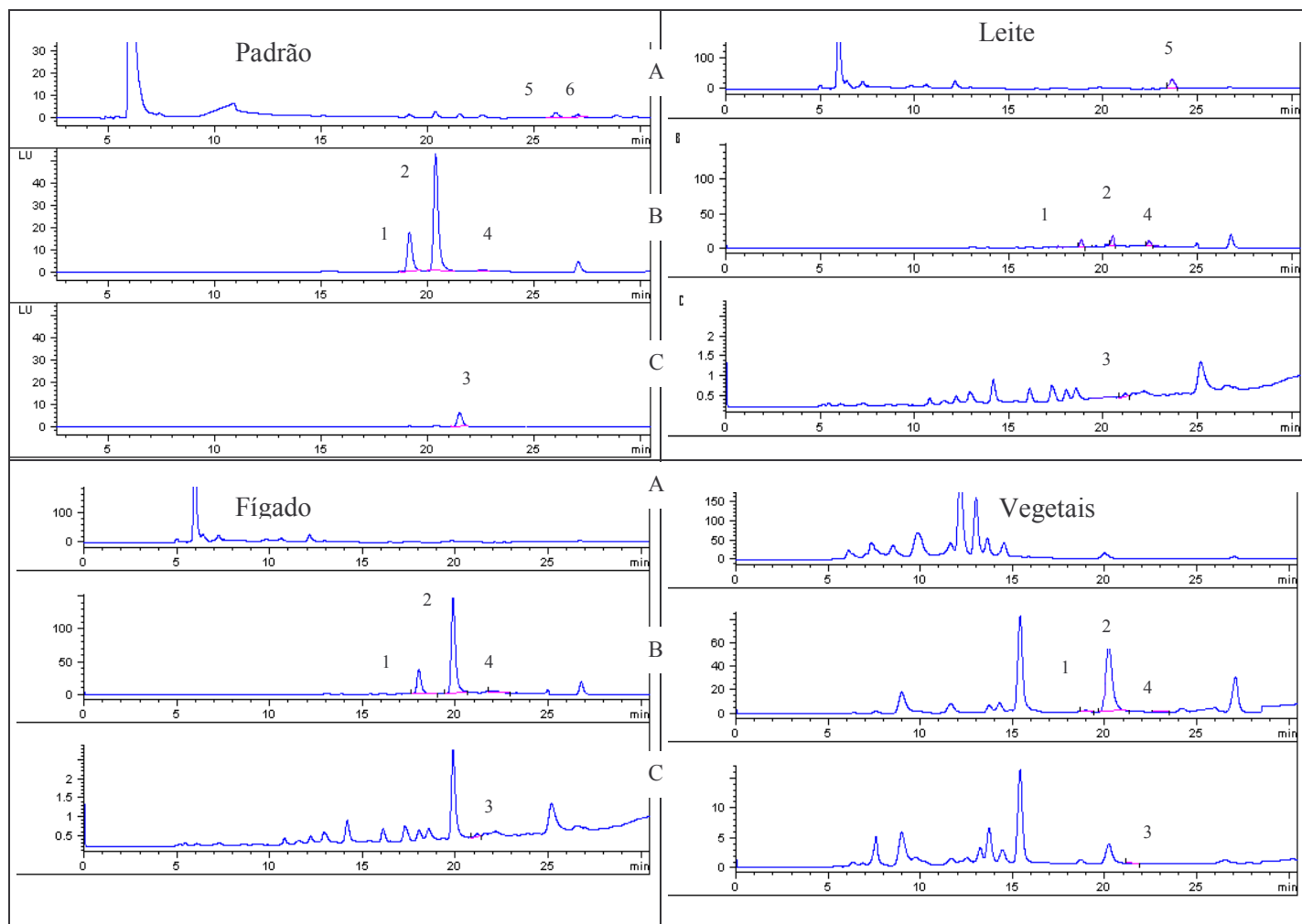


Figura 1: Perfis cromatográficos da separação dos folatos em solução padrão, dos extratos dos materiais de referência certificado BCR421 (leite), BCR485 (mistura de vegetais) e BCR487 (fígado de porco) utilizando detector de fluorescência (λ_{exc} 290nm e λ_{emis} 360nm (A) para folatos e λ_{exc} 360nm e λ_{emis} 445 nm (B) para) e o AF usando um detector de arranjo de diodos (UV-VIS) a 290nm (C). Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 250X4,6mm. Fase móvel: 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2.8 com KOH), chegando em 25 minutos a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 31 minutos. Vazão de 0.5mL/minuto. Identificação dos picos: (1) THF; (2) 5MTHF; (3) 10FAF; (4) 5 FAF; (5) AF; e (6) 10MAF.

Os cromatogramas obtidos para as três amostras (materiais de referência) aqui analisadas estão apresentados na **Figura 1**. Observa-se a versatilidade da metodologia quando aplicada à separação das diferentes formas de folatos nos tipos de alimentos aqui analisados. O **Anexos 1** mostram os perfis dos espectros de absorção e os espectros de excitação dos diferentes folatos, respectivamente, que foram utilizados como parâmetros de identificação dos folatos nas amostras. As purezas dos picos correspondente foram verificadas através dos parâmetros de pureza fornecidos pelo software HP-Chemstation, que confirmaram a eficiência do sistema.

As curvas analíticas traçadas por padronização externa, apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração pré-estabelecidas (**Anexo 3**), de 0,01 a 100 ng/mL para o 5MTHF e o THF; de 0,06 a 120,0ng/mL para a 5FTHF; de 0,06 a 60,0 ng/mL para o 10FAF; de 10 a 1000ng/mL para o AF e 10MAF. Os coeficientes de correlação obtidos foram de 0,9878 e 0,9998 para o THF e o 5MTHF, e para os demais folatos o valor foi igual a 1,0000.

Os teores de folatos determinados nas amostras do material de referência certificado analisadas são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Teores dos folatos nas amostras de material de referência certificado ($\mu\text{g}/100\text{g}$).

Folatos	BCR 421		BCR 487		BCR 485	
	M $\pm$ D	CV %	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%
THF	4,6 $\pm$ 0,2	3,3	35,2 $\pm$ 1,4	3,9	1,75 $\pm$ 0,03	1,7
5MTHF	19,6 $\pm$ 0,3	1,7	1588,4 $\pm$ 3,4	0,2	282,6 $\pm$ 0,6	0,2
5FTHF	1,8 $\pm$ 0,1	3,4	8,2 $\pm$ 0,1	1,6	7,5 $\pm$ 0,1	1,2
10FAF	1,33 $\pm$ 0,01	0,8	1,71 $\pm$ 0,01	0,6	1,77 $\pm$ 0,04	2,2
AF	71,7 $\pm$ 1,2	1,6	nd		nd	
10MAF	nd		nd		nd	
Folatos Totais	102,9 $\pm$ 0,6	0,6	1633,5 $\pm$ 1,5	0,5	295,4 $\pm$ 1,5	0,5

THF – tetraidrofolato; 5MTHF – 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato; 5FTHF - 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato; 10FTHF-10-formil-ácido-fólico; AF – ácido fólico; 10MAF- 10-metil-ácido-fólico

BCR421 – leite em pó; BCR487 – fígado de porco; BCR485 – mistura de vegetais

M $\pm$ D média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação; nd - não detectado.

O ácido fólico foi a forma predominante no leite em pó, enquanto que nas demais amostras a predominância foi do 5-metil-tetraidrofolato. O 10-metil-ácido fólico não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas.

O teor de folatos totais obtidos neste trabalho para o leite em pó (BCR421) de 102,9 $\mu\text{g}/100\text{g}$ é similar ao teor encontrado por Konings [10] (107 $\mu\text{g}/100\text{g}$), que também utilizou o mesmo tipo de material de referência certificado. Entretanto, o valor está aquém da faixa esperada para o material de referência, que era de 142 $\pm$ 14 $\mu\text{g}/100\text{g}$. Para o fígado de porco (BCR487) o valor encontrado por Konings [10] foi de 1750 $\mu\text{g}/100\text{g}$, enquanto que neste trabalho foi de 1633 $\mu\text{g}/100\text{g}$. Ambos estão acima do estipulado no material de

referência certificado ($1340 \pm 140 \mu\text{g}/100\text{g}$). Já para a mistura de vegetais (BCR485) o valor encontrado neste trabalho de $295 \mu\text{g}/100\text{g}$ para folatos totais foi superior ao encontrado no trabalho de Konings [10] ($195 \mu\text{g}/100\text{g}$), porém, se apresentou dentro da faixa esperada para o material de referência certificado, que é de $315 \pm 28 \mu\text{g}/100\text{g}$. Portanto, os resultados obtidos com a metodologia desenvolvida estão muito próximos aos encontrados por Konings [10], no entanto diferem das faixas apresentadas para os materiais de referência certificado, exceto para a mistura de vegetais, onde nossos dados foram concordantes. Cabe salientar que os teores de folatos totais nos materiais de referência foram estabelecidos utilizando o método microbiológico.

Os limites de detecção obtidos neste trabalho foram de $5 \text{pg}/\text{mL}$ para o 5-MTHF, $7 \text{pg}/\text{mL}$ para o THF, $30 \text{pg}/\text{mL}$ para o 5-FTHF e para 10-FAF, e $5 \text{ng}/\text{mL}$ para o AF e o 10-MAF (**Tabela 2**). Jastrebova et al. [11] determinaram limites de detecção para o THF, 5MTHF e 5FTHF, que foram superiores aos aqui determinados para esses mesmos folatos. Chladek et al. [13] e Ndaw et al. [14] determinaram apenas o 5MTHF e os limites de detecção nestes trabalhos foram superiores aos obtidos neste estudo. Na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, onde foram determinados os limites de detecção para os folatos, com exceção do ácido fólico, os valores foram sempre superiores aos aqui determinados [5, 6, 7, 10,12]. Vahteristo et al. [8] foram os únicos a encontrar para o 5MTHF e THF limites de detecção inferiores aos aqui determinados (**Tabela 2**). O limite de quantificação foi considerado, neste estudo, como sendo duas vezes o limite de detecção, ficando para o 5MTHF $0,01 \text{ng}/\text{mL}$, para o THF $0,014 \text{ng}/\text{mL}$, para 5FTHF e 10FAF $0,06 \text{ng}/\text{mL}$ e para o AF e 10MAF de $10 \text{ng}/\text{mL}$ tanto para as amostras quanto para o padrão.

Tabela 2. Comparação entre valores dos limites de detecção determinados para o tetraihidrofolato, 5-metiltetrahidrofolato, 10-formiltetraidrofolato, 5-formil-ácido fólico, ácido fólico e 10-metil-ácido fólico.

Autores	Limite de Detecção (ng/mL)					
	THF	5MTHF	10FAF	5FTHF	AF	10MAF
Day e Gregory [5]	5	3	40	10	3	-
Duch et al. [6]	2	2	2,5	1,5	1,5	-
Konings [10]	0,007	0,007	0,059	1,0	1,0	-
Holt et al. [7]	5,7	0,3	7,3	5,1	1,7	-
Vahteristo et al. [8]	0,003	0,002	0,04	0,05	1,4	-
Jastrebova et al. [11]	0,25	0,15	-	2,0	-	-
Doherty e Beecher [12]	-	1,0	-	-	1,0	-
Chladek et al. [13]	-	0,07	-	-	-	-
Ndaw et al. [14]	-	0,099	-	-	-	-
Neste trabalho	0,007	0,005	0,03	0,03	5	5

As taxas de recuperação, nos três diferentes produtos, em dois níveis de adição, para cada forma de folato, estão apresentadas na **Tabela 3**. Os valores das taxas de recuperação, nos três materiais certificados para os dois níveis de enriquecimento, variaram para o 5THF de 94 -108%; para o THF de 96-102%, para 5FTHF de 97 -104%; para o 10FTHF de 95 -104%; para o AF de 97 – 102%; e para o 10MTHF de 98 – 103%. As taxas de recuperação aqui determinadas foram superiores às relatadas por Vahteristo et al. [9]. Esses

autores encontraram para o 5-metiltetrahydrofolato uma taxa de recuperação de 88% em leite em pó, 76% em carne bovina, 96% em fígado de porco liofilizado e 67% em gema de ovo. Para o tetraihidrofolato, os mesmos autores relatam níveis de recuperação de 64% em carne bovina e 61% em gema de ovo. O 10MTHF e o 10FAF tiveram recuperações ainda menores no trabalho de Vahteristo et al. [9], com níveis de 90% para o 5FTHF e 70% para o 10FAF em carne bovina, e em gema de ovo 49% de recuperação para os dois folatos, sendo que os níveis de enriquecimento foram de 18 até 42µg/100g. Para o ácido fólico, nos quatro produtos analisados por Vahteristo et al. [9], os valores encontrados de recuperação variaram de 49 a 77%, com níveis de enriquecimento de 22 e 220µg/100g. Konings [10], onde foram analisados os mesmos materiais de referência certificados, embora em um único nível de enriquecimento, determinou que para a mistura de vegetais, na qual detectou-se apenas o 5MTHF, a recuperação foi de 90% em um nível de enriquecimento de 172µg/100g, cuja taxa de recuperação foi menor do que a encontrada neste trabalho. No fígado de porco, Konings [10] determinou apenas o 5MTHF e o THF e os valores de recuperação, nos respectivos níveis de enriquecimento de 641µg/100g e 2161µg/100g, foram de 109% e 88%. Mesmo com elevados níveis de enriquecimento, em comparação com os utilizados neste trabalho, a taxa de recuperação para o THF foi menor quando comparada com a deste trabalho. O mesmo ocorreu com a recuperação no leite em pó, que foi mais baixa quando comparada com as taxas obtidas neste trabalho. Konings [10] encontrou em leite em pó apenas o 5MTHF e o AF e seus valores de recuperação foram, respectivamente, 85% e 90%, quando adicionados 25,5ug/100g do 5MTHF e 70ug/100g de AF.

A repetibilidade do método pode ser considerada boa, pois, as variações existentes entre as medições obtidas neste estudo foram menores que os valores de repetibilidade, conforme a **Tabela 4**.

CONCLUSÕES

A simplicidade e a rapidez da preparação de amostra, principalmente pela não utilização da hidrólise enzimática, aliada aos dados obtidos na validação, indicam a eficiência da aplicação da metodologia na determinação simultânea de folatos em alimentos, por CLAE.

Tabela 3. Valores de recuperação encontrados para o tetraidrofolato, 5-metiltetrahidrofolato, 10-formiltetrahidrofolato, 5-formil-ácido fólico, ácido fólico e 10-metil-ácido fólico.

Folatos	Vam (ug/100g)	Va (ug/100g)		VE (ug/100g)		Recuperação (%)	
		I	II	I	II	I	II
Leite em pó (BCR421)*							
5THF	19,82	0,85	8,5	20,62	28,11	94	98
THF	4,71	0,85	8,5	5,53	13,09	97	99
5FTHF	1,81	0,65	6,5	2,44	8,16	97	98
10FTHF	1,33	0,65	6,5	2,01	7,77	105	99
AF	73,01	50	100	122,01	173,52	98	101
**10MTHF	nd	50	100	49,2	99,4	98	99
Fígado de porco (BCR485)*							
5THF	1595,84	0,85	8,5	1596,76	1604,71	108	104
THF	365,89	0,85	8,5	366,75	374,42	101	100
5FTHF	8,25	0,65	6,5	8,89	15,01	99	104
10FTHF	1,72	0,65	6,5	2,34	8,16	95	99
**AF	nd	50	100	48,5	102,3	97	102
**10MTHF	nd	50	100	51,4	101,5	103	102
Mistura de Vegetais (BCR487)*							
5THF	282,46	0,85	8,5	283,45	291,06	99	101
THF	1,86	0,85	8,5	2,73	10,52	102	102
5FTHF	7,89	0,65	6,5	8,56	14,31	103	99
10FTHF	1,82	0,65	6,5	2,46	8,35	99	100
**AF	nd	50	100	49,6	101,5	99	102
**10MTHF	nd	50	100	48,9	99,7	98	100

*Valores são médias de determinações em duplicata; **Vitaminas adicionadas, não presentes nos materiais de referência certificado; Vam-valor encontrado na amostra; Va-valor de vitamina adicionada; VE-, valor encontrado depois do enriquecimento; I e II representam os dois níveis de enriquecimento; nd, não detectado.

Tabela 4. Valores de repetibilidade determinados para o tetraihidrofolato, 5-metiltetrahidrofolato, 10-formiltetraidrofolato, 5-formil-ácido fólico, ácido fólico e 10-metil-ácido fólico em padrões e em material de referência certificado.

Padões de Folatos			Leite em pó (BCR421)			Fígado de porco (BCR485)			Mistura de vegetais (BCR487)		
V	C (µg/100g)	r	V	C (µg/100g)	r	V	C (µg/100g)	r	V	C (µg/100g)	r
THF	10,0076	0,163	THF	4,3647	0,55	THF	343,3612	54,25	THF	1,7259	0,1336
	10,0831			4,4667			362,5709			1,7064	
	10,1041			4,5686			364,9377			1,7802	
	10,1009			4,7350			370,4137			1,7547	
	10,1048			4,4344			339,33440			1,7038	
5MTHF	100,7654	1,145	5MTHF	18,8212	1,41	5MTHF	1584,4072	10,81	5MTHF	284,1455	2,987
	100,2439			19,4937			1589,3562			282,4288	
	100,9072			19,8059			1592,0693			282,1865	
	100,8632			19,2501			1587,8201			282,7564	
	100,9681			19,4653			1587,9908			282,6250	
5FTHF	5,7896	0,307	5FTHF	1,6904	0,18	5FTHF	8,2453	0,629	5FTHF	7,5492	0,3541
	5,9876			1,6834			8,4450			7,4698	
	5,8541			1,6927			8,1226			7,4631	
	5,9437			1,6981			8,0343			7,5800	
	5,92546			1,7975			8,1470			7,6826	
10FTHF	10,0267	0,09	10FTHF	1,3321	0,07	10FTHF	1,6820	0,07	10FTHF	1,7809	0,07
	10,0728			1,3307			1,7244			1,7523	
	10,0891			1,3345			1,7230			1,7377	
	10,0542			1,3295			1,7223			1,7368	
	10,0611			1,3307			1,7228			1,7440	
AF	101,2456	2,01	AF	73,5122	5,12	*AF	100,7852	1,672	*AF	100,3511	3,419
	100,8991			72,0124			100,5345			101,7205	
	101,0325			72,0132			101,002			100,9672	
	100,7655			71,0243			99,869			100,0023	
	102,0632			70,0132			100,5624			102,0442	
10MFA	50,3012	0,575	*10MFA	50,9341	0,343	*10MFA	50,0772	0,276	*10MFA	50,0084	2,015
	50,0079			50,9022			50,2014			51,0671	
	50,0238			50,9204			50,0755			49,8872	
	50,3095			50,9531			50,0621			50,8342	
	50,2074			50,7364			50,1978			50,5672	

*vitaminas adicionadas aos materiais de referência certificado; valores são médias de determinações em duplicata

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Schulz, K. Wiedemann, I. Bitsch. J. Chromatogr. 328 (1985) 417.
- [2] J. Scott, F. Rébeillé, J. Fletcher. J. Sci. Food Agric. 80 (2000) 795.
- [3] S. Ruggeri, L. T. Vahteristo, A. Aguzzi, P. Finglas, E. Carnovale. J. Chromatogr. A. 855 (1999) 237.
- [4] P. Stokes, K. Webb. J. Chromatogr. A. 864 (1999) 59.
- [5] B.P. Day, J.F. Gregory. J. Agric. Food Chem. 29 (1981) 374.
- [6] D.S. Duch, S.W. Bowers, C.A. Nichol. Anal. Biochem. 130 (1983) 385.
- [7] D.L. Holt, R.L. Wehling, M.G. Zeece. J. Chromatogr. 449 (1988) 271.
- [8] L. Vahteristo, K. Lehtikainen, V. Ollilainen, P. Varo. Food Chem. 59 (1997) 589.
- [9] **L. Vahteristo, V. Ollilainen, P. Varo. J. Assn of Offic Anal. Chem. Intern. 80 (1997) 373.**
- [10] E.J.M. Konings. J. Assn of Offic Anal. Chem. Intern. 82 (1999) 119.
- [11] J. Jastrebova, C. Witthöft, A. Grahn, U. Svensson, M. Jagerstad. Food Chem. 80 (2003) 579.
- [12] R. F. Doherty, G. R. Beecher. J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 354.
- [13] J. Chládek, L. Sispara, J. Martínková. J. Chromatogr. B 744 (2000) 307.
- [14] S. Ndaw, M. Bergaentzle, D. Aoudé-Werner, S. Lahély, C. Hasselmann. J. Chromatogr. A 928 (2001) 77.
- [15] Y. Iwatani, J. Arcot, A. K. Shrestha. J. Food Comp. Anal. 16 (2003) 37.
- [16] E. J. M. Konings, H. H. S. Roomans, E. Dorat, R. A. Goldbohm, W.H.M. Saris, P. A. Brandt. Am. J. Nutr. 73 (2001) 765.
- [17] M. W. Dong, J. Lepore, T. Taurumoto. J. Chromatogr. 442 (1988) 81.

- [18] P. M. Finglas, U. Faure, P.J. Wagstaffe. J. Anal. Chem. 345 (1993) 180.
- [19] **P. C. Hollman, J. H. Slange, J. P. Wagstaffe, U. Faure, D. A. T. Southgate, P. M. Finglas, Analyst 118 (1993) 481.**
- [20] **P. M. Finglas, K. Wigertz, L. Vahteristo, C. Witthöft, S. Southon, I. Froidmont-Görtz. Food Chem. 64 (1999) 245.**
- [21] R. Caulcutt, R. Boddy. Statistic for analytical chemists. 1ed. Lo-res, 1983.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM ALIMENTOS BRASILEIROS

Catharino, R. R., Azevedo, J. L., Godoy, H. T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
C.P. 6121 CEP - 13083-970
robit@bol.com.br

DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM CARNE, BEBIDAS E FRUTAS

Rodrigo Ramos Catharino, Juliana Azevedo Lima, Helena Teixeira Godoy*
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP – Campinas – SP – Brasil
CP6121 – CEP13087-970
e-mail: helena@fea.unicamp.br*

RESUMO

Trabalhos para confirmar ou encontrar novas fontes de folatos e assegurar a qualidade nutricional desses analitos em alimentos são escassos na literatura. Em relação a alimentos brasileiros não há na literatura nenhum trabalho sobre o teor de folatos naturalmente presentes. Uma das técnicas mais empregadas para a determinação de folatos é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), devido a possibilidade de se determinar as diferentes formas de folatos ativos, em uma única análise. Dentro desse panorama, o objetivo deste trabalho foi de aplicação da metodologia desenvolvida por CLAE para a avaliação dos teores de folatos totais e individuais em alguns alimentos brasileiros, em frutas, como o murici e o jenipapo, em carne bovina (músculo *Supraspinatus* – peixinho), e em bebidas, como vinho tinto e cerveja, mostrando assim a versatilidade do método desenvolvido, gerando dados mais confiáveis para as tabelas de composição de alimentos e avaliando novas fontes. O músculo peixinho apresentou teores de folatos totais na faixa entre 13,96 e 14,12 μ g/100g, sendo que só foram detectados o tetraidrofolato (THF) e o 5-metiltetraidrofolato (5MTHF) representando uma porcentagem relativa de 57% e 43%, respectivamente. Nas frutas, murici e jenipapo, foram detectados

quatro diferentes folatos, THF, 5MTHF, 10-formil-ácido fólico (10FAF) e o 10-metil-ácido fólico (10MAF), sendo que o 5MTHF e o 10MAF foram as formas predominantes no murici e jenipapo, respectivamente. Nessas frutas o teor de folatos totais variou entre 41,3 a 66,9µg/100g para o murici e 11,2 a 86,3µg/100g para o jenipapo. Para o vinho tinto seco (*Vitis labrusca*) e cerveja (pilsen) foram encontrados os mesmos folatos determinados nas frutas, sendo que o teor de folatos totais variou, dependendo do fabricante, de 6,5 a 23,7µg/100mL no vinho, e de 292,8 a 652,6µg/100mL na cerveja.

ABSTRACT

Research to confirm or to find new sources of folates and to assure the nutritional quality of these foods is scarce in the literature. Published Brazilian papers have no information about folate levels in foods. The most used technique for the determination of folates is high performance liquid chromatography (HPLC), which makes it possible to determine the different forms of active folates in a single analysis. Within this panorama, the objective of this study was the application of HPLC to the evaluation of the levels of total and individual folates in some Brazilian foods: fruits, such as murici and jenipapo; in bovine meat (*Suprascapularis* - peixinho) and drinks, such as red wine and beer, thus showing the versatility of the method developed generating more trustworthy data for food composition tables as well as evaluating new sources. The meat presented total folate levels between 13.96 and 14.12µg/100g, only tetrahydrofolate (THF) and 5-methyltetrahydrofolate being detected (5MTHF), in relative proportions of 57% and 43%, respectively. In the fruits, murici and jenipapo, four different folates, THF, 5MTHF, 10-formyl-folic-

acid (10FAF) and 10-methyl-folic acid (10MAF) were detected, 5MTHF and 10MAF being the predominant forms in murici and genipapo, respectively. In these fruits the contents of total folate varied from 41.3 to 66.9 μ g/100g in murici and from 11.2 to 86.3 μ g/100g in genipapo. For the red wine (*Vitis labrusca*) and beer (pilsen) the same folates determined in the fruits were found, the content of total folates varying, depending on the manufacturer, from 6.5 to 23.7 μ g/100mL in the red wine and from 292.8 to 652.6 μ g/100mL in the beer.

INTRODUÇÃO

Em se tratando de folatos, vários derivados do tetraidrofolato são utilizados em reações de biossíntese. São necessários na formação de produtos intermediários do metabolismo, estão envolvidos na síntese de purinas, dTMP (timidilato), síntese de colina, serina e glicina. Como quantidades adequadas de colina e aminoácidos podem geralmente ser obtidas da dieta, a participação de folatos na síntese de purina e dTMP parece ser, dessas reações, a metabolicamente mais significativa, por serem fundamentais à síntese de DNA. Nesse aspecto, a deficiência da vitamina está sendo apontada como a principal responsável pela incidência de malformações congênitas, pois no período de gestação ocorre aumento do número de células em divisão rápida, havendo então, maior necessidade do consumo da vitamina desde os primeiros dias de gestação (Carmichael et al., 2003). Os folatos também participam na produção normal das hemácias e a carência de alimentos que contenham a vitamina na dieta, pode levar à anemia megaloblástica. Além disso, o tetraidrofolato juntamente com a vitamina B₁₂ são necessários para a conversão de homocisteína em metionina (Devlin, 1997).

Esta reação é de extrema importância para o sistema cardiovascular, dado que a hiperhomocisteinemia pode causar lesões nos vasos sanguíneos, podendo levar à arterioesclerose vascular e trombose (Parodi, 1997; Dierks, Kroesen e Pietrzik, 1998; Quinlivan et al., 2002). Atualmente a homocisteína tem sido apontada como o colesterol do século XXI (Lara, 2001).

Dessa forma, os folatos têm despertado bastante interesse na prevenção de distúrbios cardiovasculares, malformações congênitas como defeitos no tubo neural de fetos e espinha bífida, câncer, mal de Alzheimer's, entre outras (Brody, 1991; Czeizel e Dudas, 1992; Katzung, 1994; Ulene e Ulene, 1995; Oakley et al., 1995; Crane et al., 1995; Daly et al., 1997; Devlin, 1997; Nigard et al., 1997; Rang Ritter e Dale, 1997; Clarke et al., 1998; Malinow et al., 1998; Moshfegh et al., 1998; Tsai et al., 1999; Ndaw et al, 2001).

Os folatos, a exemplo de todas as outras vitaminas, são necessários em pequenas quantidades, porém, parte da população apresenta deficiência desse nutriente. Há muitas causas que levam a esse quadro de carência em seres humanos como ingestão inadequada, absorção e metabolismo deficientes e demanda aumentada, principalmente nos períodos de gestação, lactação e crescimento. A principal causa tem sido apontada como sendo a ingestão insuficiente. Para tentar amenizar esse quadro, os médicos recomendam a ingestão de alimentos ricos nessa vitamina (Ndaw et al, 2001).

De acordo com Brody (1991) e Franco (1992), entre muitos outros autores, vegetais e leveduras seguidos por carnes, fígado, rins, frutas, cereais e leguminosas são considerados fontes dessa vitamina. Porém, muitos dos valores apresentados nas tabelas de composição de alimentos e publicações científicas são diferentes para o mesmo alimento. Essas diferenças,

provavelmente, são devidas às diferentes técnicas analíticas empregadas na obtenção dos resultados, que nem sempre são confiáveis, além de fatores edafoclimáticos relacionados ao cultivo de vegetais, as formas de criação de animais e processos tecnológicos diferentes na fabricação de alimentos.

Estudos realizados em carne bovina mostraram quantidades de folatos diferentes. Konings et al. (2001) encontraram em carne bovina valores significativos de folatos totais, da ordem de 200µg/100g. Por outro lado, Vahteristo et al. (1997) apresentaram um teor de folatos totais de apenas 1,2µg/100g em carne, enquanto que Ndaw et al. (2001) obtiveram valores para folatos totais na faixa de 15,20µg/100g.

Existe pouca informações na literatura sobre os folatos em frutas. No entanto, Brody (1991) determinou níveis de folatos em suco de laranja e polpa de banana na faixa de 1,4µg/100g e 0,28µg/100g, respectivamente. Franco (1992) também com suco de laranja mostra valores em torno de 0,4µg/100g. Em bebidas, como a cerveja e o vinho, as pesquisas quanto a determinação de folatos são escassas, não sendo encontrados teores para os mesmos.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) está sendo hoje a técnica mais empregada para a análise de folatos em alimentos (Vahteristo, Ollilainen e Varo, 1997; Konings, 1999; Iwatani, Jayashree e Ashok, 2003). As vantagens do uso da CLAE incluem rapidez, alta sensibilidade e exatidão, além da melhor resolução na separação das diversas formas bioativas presente nos alimentos (Konings, 1999).

MATERIAL E MÉTODO

7 Material

Cinco diferentes peças de músculo bovino (*Supraspinatus*) comumente chamado de peixinho, de aproximadamente 700g, foram adquiridas em

supermercados na cidade de Campinas-SP, no período de novembro a dezembro de 2002. Toda a carne foi homogeneizada em multiprocessador de alimentos antes da retirada da amostra analítica. Quatro diferentes lotes de murici e jenipapo, de aproximadamente 1,0kg, foram obtidos no comércio local das cidades de Belém (Pará) e de Fortaleza (Ceará). As frutas estavam em estágio adequado de maturação para o consumo de acordo com a aparência e foram previamente congeladas (-18°C) e, posteriormente, transportadas via aérea para Campinas (São Paulo). Todas as frutas, que compunham cada lote, tiveram as cascas e os caroços retirados e a polpa homogeneizada em liquidificador. Foram analisados ainda cinco diferentes lotes de vinho tinto seco (*Vitis labrusca*) de cinco diferentes marcas, todos produzidos na região sul do país, das safras de 2001 e 2002, todos adquiridos no comércio de Campinas, assim como os cinco lotes de cerveja pilsen de cinco diferentes fabricantes. Para a composição de cada lote foram tomadas e homogeneizadas duas garrafas de vinho e quatro latas (350mL) de cerveja. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

8 Reagentes

Os padrões de folatos, 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio, tetraidrofolato, 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio, 10-formil-ácido fólico, 10-metil-ácido fólico, foram adquiridos do laboratório SCHIRCKS (Suíça), e o ácido fólico (F-7876) foi cedido pela SIGMA, (USA). A acetonitrila, grau cromatográfico, os ácidos acético e tricloroacético, bem como, o sal de acetato de amônio, todos grau analítico, foram adquiridos da MERCK, (Brasil) A água utilizada no preparo das amostras e da fase móvel foi purificada no sistema

Milli-Q (MILLIPORE). A fase móvel foi filtrada em membrana MILLIPORE, com poros de 0,45 μ m de diâmetro.

9 Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100 μ L e detectores de arranjo de diodos (DAD) (UV-Visível) e de fluorescência dispostos em série. Ambos permitem a detecção simultânea em vários comprimentos de onda. Todo o sistema foi controlado pelo programa Chemstation-HP, que também gerência o sistema de aquisição e tratamento de dados.

Para separação das formas vitamínicas foi utilizada uma coluna cromatográfica Microsorb ODS-2, 5 μ m, 250mm x 4,6mm d.i. (RAIMIN), protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5 μ m, 10mm x 4,6 mm d.i. (VARIAN).

Método

O método utilizado neste trabalho foi desenvolvido por Catharino et al. (2002). Para a extração dos folatos da carne foram tomadas 5.0g da amostra previamente homogeneizada, e trituradas com 20mL de acetato de amônio (0,05mol/L). A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25mL, adicionando-se mais 750 μ L de ácido tricloroacético (TCA) e, por fim, o volume foi aferido com solução de acetato. Já para a extração das frutas tomaram-se 10g da polpa homogeneizada, que foram trituradas com 40mL de acetato de amônio (0,05mol/L), adicionando-se mais

2,5 mL de ácido tricloroacético e, por fim, o volume foi aferido com solução de acetato. Após homogeneização, tanto do extrato de carne como o das frutas, seguiram-se duas etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a segunda em membrana Durapore (HVLP 01300, MILLIPORE), com poros de 0,45 μ m, e em seguida o extrato foi injetado no cromatógrafo (100 μ L). As amostras de vinho e cerveja foram apenas filtrados em membranas Durapore de 0,45 μ m e injetadas diretamente no cromatógrafo a líquido, sem nenhuma preparação prévia de amostra.

O sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min, foi desenvolvido, no início com 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2,8 com KOH), chegando em 25 minutos a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se essas condições até o final da corrida, em 31 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada por 15 minutos, antes da próxima injeção. O 5MTHF, 5FTHF e THF foram detectados utilizando-se a fluorescência natural desses compostos, utilizando como λ_{exc} 290nm e λ_{emis} 360nm, para o 10FAF utilizou-se o λ_{exc} 360nm e λ_{emis} 445nm. O AF e o 10MAF foram detectados na região do ultravioleta a 290nm.

As identificações foram feitas por comparação entre os tempos de retenção, obtidos com os padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros obtidos com a utilização do detector de arranjo de diodos e fluorescência. O grau de pureza das vitaminas foi avaliado pelo sistema disponível no software Chemstation-HP. A quantificação foi realizada por padronização externa (**Anexo 2**). Todas as precauções necessárias para evitar a degradação das vitaminas durante a análise foram tomadas,

realizando-se os ensaios o mais rápido possível e protegendo as vitaminas da ação da luz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As **Tabelas 1 a 4** apresentam os teores de folatos determinados neste trabalho. Nas **Figuras 1 e 2** estão apresentados os perfis cromatográficos da solução de padrões e dos extratos de algumas das amostras aqui analisadas.

Os teores de folatos determinados nas amostras de carne bovina, (*Supraspinatus*) peça comumente chamada de peixinho, estão apresentados na **Tabela 1**. Foram apenas detectadas as presenças do THF e do 5MTHF, em quantidades quase que eqüitativas dos folatos totais, em média 57% ($8,01 \pm 0,04 \mu\text{g}/100\text{g}$) de THF para 43% ($6,01 \pm 0,05 \mu\text{g}/100\text{g}$) de 5MTHF. Em comparação com os dados da literatura, que só determinaram folatos totais em carnes, os valores encontrados neste trabalho para folatos totais no músculo *Supraspinatus* ($14,01 \pm 0,06 \mu\text{g}/100\text{g}$) estão próximos aos determinados por Ndaw et al. (2001), mas distantes dos teores apontados por Konings et al. (2001) que foram de $200 \mu\text{g}/100\text{g}$, que além de não especificar o corte de carne bovina escolhido para análise, também utilizou o método microbiológico para a determinação de folatos totais. O tipo de criação do gado também poderia interferir na quantidade de folatos encontrada na carne. As amostras de carne brasileira analisadas neste trabalho de animais confinados.

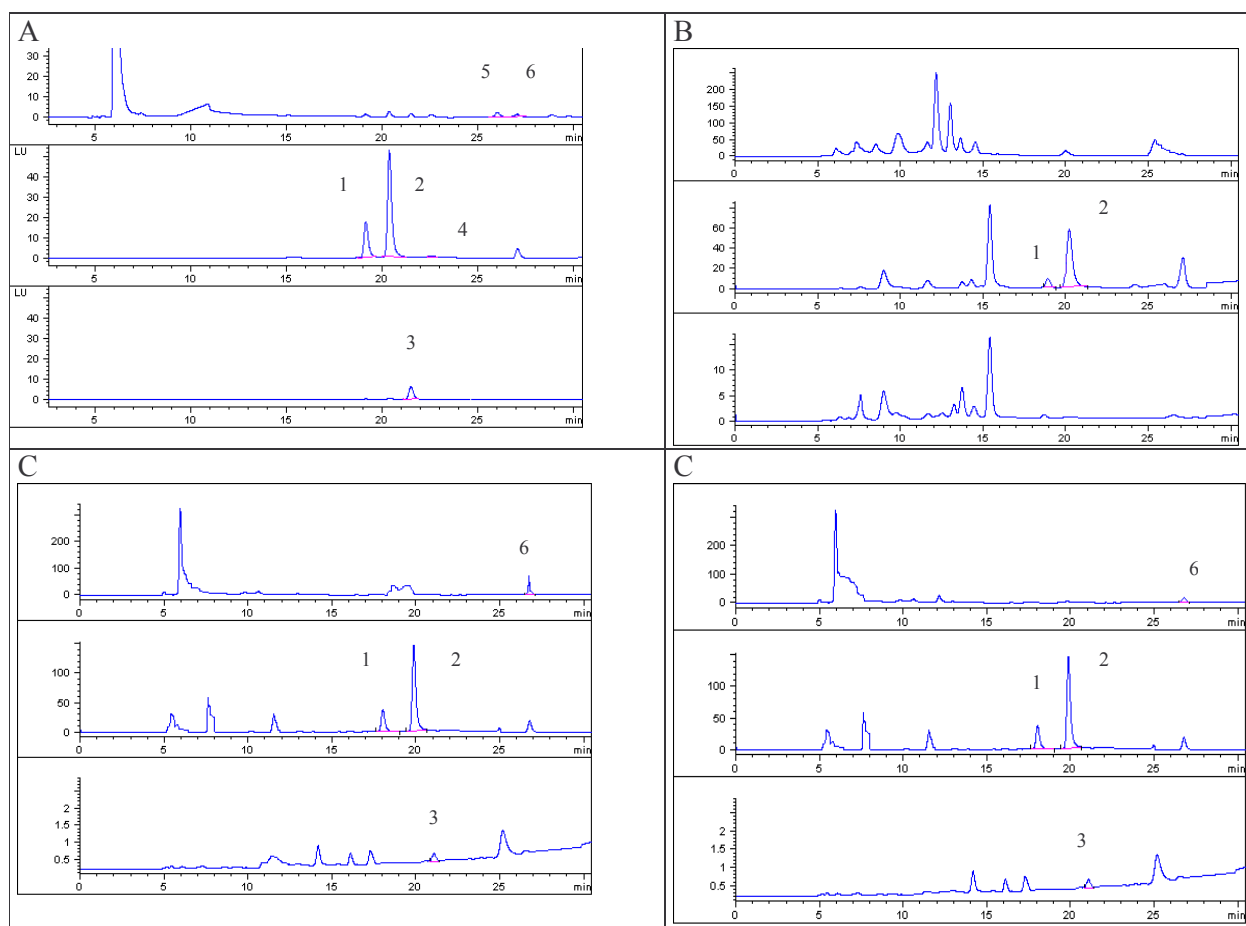


Figura 1: Perfis cromatográficos de padrões (A) e dos extratos de carne boniva (B), murici (C), jenipapo (D), utilizando detector de fluorescência (λ_{exc} 290nm e λ_{emis} 360nm e λ_{exc} 360nm e λ_{emis} 445 nm e o AF usando um detector de arranjo de diodos (UV-VIS) a 290nm (B). Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 250X4,6mm. Fase móvel: 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2.8 com KOH), chegando em 25 minutos a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v), mante-o-se nessas codições até 31 minutos. Vazão de 0.5mL/minuto. Identificação dos picos: (1) THF; (2) 5MTHF; (3) 10FAF; (4) 5 FAF; (5) AF; e (6) 10MAF.

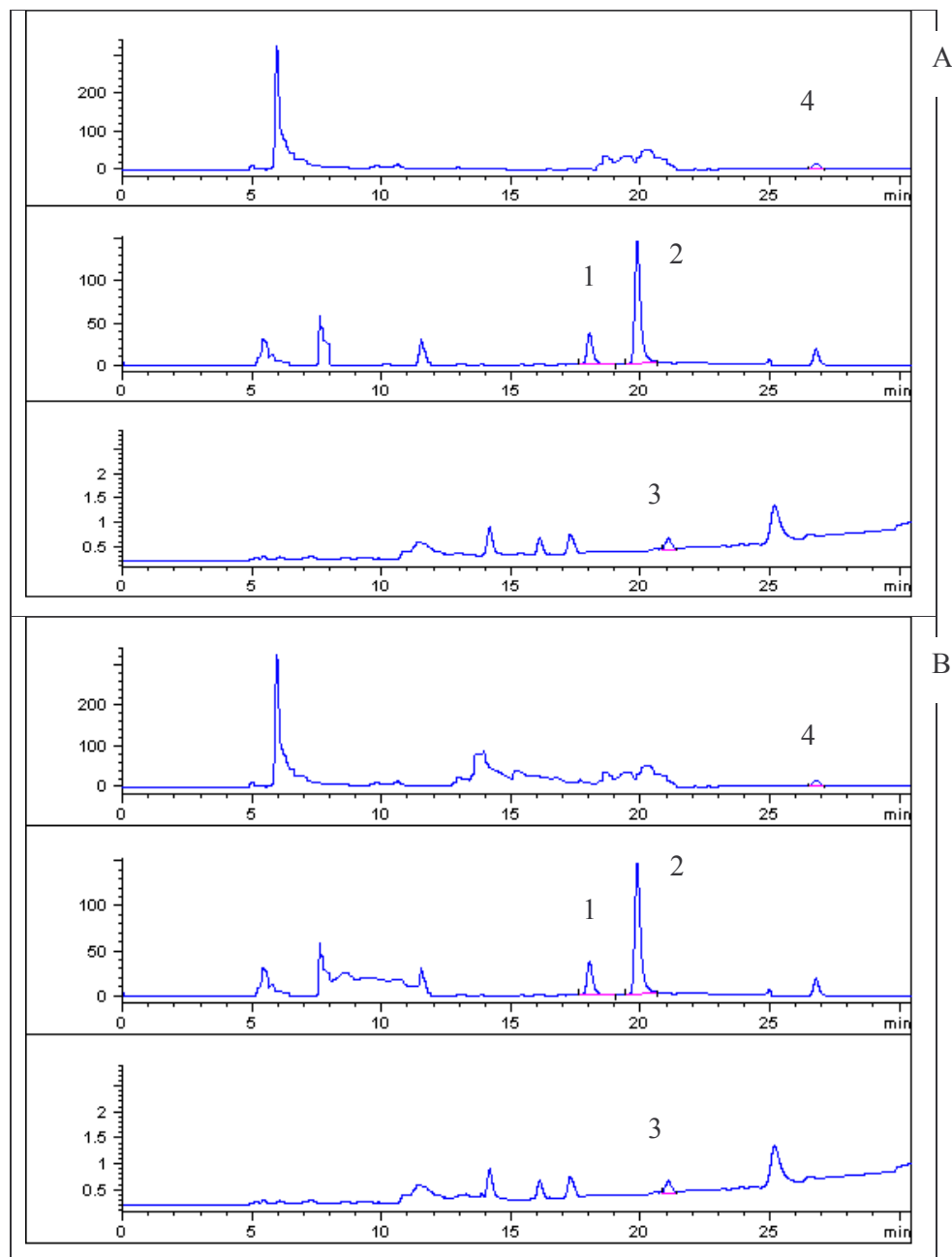


Figura 2: Perfis cromatográficos de vinho (A) e cerveja (B), utilizando detector de fluorescência (λ_{exc} 290nm e λ_{emis} 360nm e λ_{exc} 360nm e λ_{emis} 445 nm e o AF usando um detector de arranjo de diodos (UV-VIS) a 290nm (B). Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 250X4,6mm. Fase móvel: 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2.8 com KOH), chegando em 25 minutos a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 31 minutos. Vazão de 0.5mL/minuto. Identificação dos picos: (1) THF; (2) 5MTHF; (3) 10FAF; (4) 10MAF.

Tabela 1. Teores de folatos (μ g/100g) em amostras de carne bovina (músculo *Supraspinatus* – “peixinho”).

THF			5MTHF		Folatos Totais
Lotes	M±D	CV %	M±D	CV %	M±D
A	7.96±0.13	1.3	6.04±0.09	1.5	14.0
B	8.02±0.11	1.2	5.94±0.08	1.3	13.9
C	7.98±0.21	2.5	6.05±0.06	1.0	14.0
D	8.04±0.20	2.5	5.94±0.07	1.2	13.9
E	8.06±0.12	1.2	6.06±0.06	1.0	14.1
Média	8.01±0.04	0.5	6.01±0.05	0.9	14.01±0.06

THF – tetraidrofolato; 5MTHF – 5-metiltetraidrofolato; M ± D média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação.

Os folatos quantificados no murici e jenipapo (**Tabela 2**) foram o tetraidrofolato, 5-metiltetraidrofolato (5MTHF), 10-formil-ácido fólico e 10-metil-ácido fólico(10MAF). O 5-formil-ácido fólico foi encontrado em quantidade de traços e apenas em algumas amostras. A forma predominante no murici foi o 5MTHF, enquanto que no jenipapo a distribuição de teores individuais se deu de forma mais equilibrada, embora a concentração do 10MAF tenha se destacado mais em comparação com a procedência dos frutos. O teor de folatos totais variou entre 41,3 a 66,9µg/100g no murici, no entanto para o jenipapo a quantidade de folatos totais variou muito entre os quatro lotes. As frutas provenientes da cidade de Fortaleza apresentaram teores de folatos totais (80,1 a 86,3µg/100g) superiores aos teores determinados nas frutas adquiridas na cidade de Belém (11,2 a 16,9µg/100g), comprovando dessa forma a grande influência do clima (temperatura, chuva) e do solo nos teores dessa vitamina nos frutos.

Tabela 2. Teores de folatos ($\mu\text{g}/100\text{g}$) em murici e jenipapo.

Lotes	THF		5MTHF		10FAF		10MAF		Folatos totais	
	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%
Murici										
L1	1,2 $\pm$ 0,1	8,3	29,5 $\pm$ 0,4	1,4	1,2 $\pm$ 0,1	8,3	9,5 $\pm$ 0,7	7,4	41,3 $\pm$ 1,8	4,4
L2	2,4 $\pm$ 0,2	8,3	27,1 $\pm$ 0,6	2,2	1,5 $\pm$ 0,1	6,7	11,6 $\pm$ 0,6	5,2	42,6 $\pm$ 2,1	4,9
L3	2,1 $\pm$ 0,2	9,5	47,5 $\pm$ 0,5	1,1	1,2 $\pm$ 0,1	8,3	16,1 $\pm$ 0,5	3,1	66,9 $\pm$ 1,8	2,7
L4	1,1 $\pm$ 0,03	2,7	34,9 $\pm$ 1,3	3,7	2,2 $\pm$ 0,1	4,5	6,5 $\pm$ 0,3	4,6	44,7 $\pm$ 1,9	4,3
Média	1,7$\pm$0,65	38	34,7$\pm$9,1	26	1,5$\pm$0,05	33	10,9$\pm$4,0	36	48,9$\pm$12,1	25
Jenipapo										
L1	0,35 $\pm$ 0,03	8,5	12,6 $\pm$ 0,7	5,6	19,6 $\pm$ 0,9	4,6	47,5 $\pm$ 1,7	3,6	80,1 $\pm$ 1,9	2,4
L2	0,31 $\pm$ 0,01	3,2	5,6 $\pm$ 0,6	11	23,9 $\pm$ 1,5	6,3	56,5 $\pm$ 2,8	5,0	86,3 $\pm$ 2,5	2,9
L3	0,42 $\pm$ 0,01	2,5	4,3 $\pm$ 0,2	4,7	2,1 $\pm$ 0,1	4,8	4,5 $\pm$ 0,2	4,4	11,2 $\pm$ 1,1	9,8
L4	0,45 $\pm$ 0,01	2,2	4,6 $\pm$ 0,3	6,5	1,5 $\pm$ 0,1	6,7	10,4 $\pm$ 0,7	6,7	16,9 $\pm$ 1,0	5,9
Média	0,38$\pm$0,06	16	6,8$\pm$3,9	58	11,8$\pm$11,7	99	29,7$\pm$26,1	88	48,6$\pm$40,1	83

THF – tetraidrofolato; 5MTHF – 5-etil-tetraidrofolato; 10FAF – 10-formil-ácido fólico; 10MAF – 10-metil ácido fólico;

M $\pm$ D - média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV - coeficiente de variação. L1 e L2 – Fortaleza. L3 e L4 – Belém.

Os folatos encontrados no vinho tinto brasileiro após a análise foram o THF, 5MTHF, 10FAF e 10MAF (**Tabela 3**), sendo o 10MAF e o 5MTHF os de maior predominância entre as diferentes formas. Tanto as concentrações individuais, como os teores de folatos totais, variaram muito dependendo do fabricante, isto quer dizer que não só a uva, cuja composição é influenciada por fatores edofaclimáticos, mas o processo de fabricação pode influenciar nos teores de folatos. Inicialmente, no processo de fermentação do mosto, as

bactérias acéticas consomem, para seu próprio crescimento, os folatos presentes na uva, mas numa fase posterior iniciam a produção de folatos (Scott, Rébeille e Fletcher, 2000). A amostra de vinho VM foi a que apresentou a maior concentração de folatos 23,7 μ g/100mL, enquanto que o vinho da marca VPIA foi o que apresentou a menor concentração (6,5 μ g/100mL).

Tabela 3. Teores de folatos (μ g/100mL) em amostras de vinho tinto seco.

Vinhos marcas	Folatos									
	THF		5MTHF		10FAF		10MAF		Ftotais	
	M $\pm$ D	CV %	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%
VM	0,49 $\pm$ 0,01	2,0	12,8 $\pm$ 0,1	0,5	0,51 $\pm$ 0,02	3,9	9,9 $\pm$ 0,2	2,0	23,7$\pm$1,5	6,3
VAN	9,3 $\pm$ 0,1	0,5	1,3 $\pm$ 0,1	7,7	0,33 $\pm$ 0,03	9,1	4,7 $\pm$ 0,1	1,3	15,6$\pm$0,9	5,8
VFO	1,8 $\pm$ 0,1	3,8	3,9 $\pm$ 0,1	2,6	0,45 $\pm$ 0,04	8,9	7,5 $\pm$ 0,1	0,67	13,7$\pm$0,5	3,6
VPET	0,69 $\pm$ 0,02	2,9	3,75 $\pm$ 0,04	0	1,1 $\pm$ 0,1	6,7	2,64 $\pm$ 0,03	1,1	9,6$\pm$0,8	8,3
VPIA	0,84 $\pm$ 0,03	3,6	3,0 $\pm$ 0,1	1,7	0,84 $\pm$ 0,03	3,6	1,87 $\pm$ 0,04	2,1	6,5$\pm$0,9	13,8

M $\pm$ D - média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV - coeficiente de variação; Ftotais - folatos totais.

A **Tabela 4** apresenta os valores encontrados em cerveja pilsen. Os mesmos folatos, presentes tanto nas frutas como nos vinhos, foram determinados nas cervejas, destacando-se aqui as quantidades do 5MTHF. As amostras de cerveja apresentaram teores de folatos totais numa faixa de 292,8 a 652,6 μ g/100mL, desta forma demonstrando ser uma excelente fonte de folatos.

Tabela 4. Teores de folatos (μ g/100mL) em amostras de cerveja pilsen.

Cerveja marcas	Folatos									
	THF		5MTHF		10FAF		10MAF		Ftotais	
	M±D	CV%	M±D	CV%	M±D	CV%	M±D	CV%	M±D	CV%
CS	9,6±0,3	3,1	628,8±0,5	0,08	2,57±0,06	2,3	0,97±0,01	1	652,6±0,6	0,09
CI	7,5±0,05	0,67	383,7±0,1	0,26	0,95±0,03	3,1	4,18±0,05	1,31	396,3±0,9	0,23
CK	9,83±0,07	0,71	279,1±0,1	0,03	0,24±0,02	8,3	5,31±0,07	1,31	292,8±0,5	0,17
CB	0,69±0,02	2,9	575,4±0,3	0,05	4,32±0,05	1,1	1,93±0,01	0,5	577,9±0,8	0,14
CSC	7,82±0,01	0,12	471,7±0,2	0,04	4,56±0,02	0,4	2,67±0,01	0,4	484,9±0,2	0,04

M ± D - média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV - coeficiente de variação; Ftotais - folatos totais.

CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida por CLAE e aqui aplicada se mostrou bastante eficaz e versátil para a quantificação dos folatos nas diferentes matrizes alimentícias aqui analisadas.

Das amostras analisadas, as cervejas pilsen foram as que apresentaram os maiores níveis de folatos, seguido das frutas tropicais. A carne bovina e o vinho também podem contribuir para o aporte dessa vitamina na dieta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pelo suporte financeiro concedido à pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. Handbook of vitamins. 2ed. rev. and Expanded. New York: Marcel Decker, 1991.
- CHARMICHAEL, S.L., SHAW, G.M., SELVI, S., SCHAFFER, D.M. Diet quality and risk of neural tube defects. Medical Hypotheses, 60, 3, p. 351-355, 2003.

- CLARKE, R.; SMITH, A.D.; JOBST, K.A.; REFSUM, H.; SUTTON, L.; UELAND, P.M. Folate, vitamin B12 and serum homocysteine levels in confirmed Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*, 111: 449-453, 1998.
- CRANE, N.T., WILSON, D.B., COOK, D.A., LEWIS, C.J., YETLEY, E.A., RADER, J. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. *American Journal of Public Health*, 85 (5): 660-666, 1995.
- CZEIZE, A.E., DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New England Journal of Medicine*, 327 (226): 1832-1835, 1992.
- DALY S., MILLS, J.R., MOLLOY, A.M., CONLEY, M., LEE, Y.J, KIRKE, P.N, WEIR, D.G., SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet*, 350 (9092): 1666-1669, 1997.
- DEVLIN, T.M. *Manual de Bioquímica com correlações clínicas*. 1ed. Ed. Edgard Blücher, 1997.
- DIERKES, J., KROESEN, M., PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B₆ supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. *International Journal of Vitamin and Nutrient Research*, 68: 98-103, 1998.
- FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 9ed. São Paulo: Atheneu, 1992.**
- GREGORY, J.F. Determination of folacin in foods and other biological materials. *Journal of Association Official of Analytical Chemistry*, 67: 1015-1019, 1984.**
- IWATANI, Y., ARCOT, J., SHRESTHA, A.K. Determination of folate contents in some Australian vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, p. 37-48, 2003.
- KATZUNG, B. G. *Farmacologia básica e clínica*. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- KONINGS, E.J.M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. *Journal of AOAC International*, 82 (1): 119-127, 1999.

- KONINGS, E.J.M. Folate intake of the dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. American Journal Clinical Nutrition, 73 , p. 765-776, 2001.
- LARA, G. M.; TEDESCO, J. S.; BEMFICA, C. S.; WIECZORREK, PL L. Assessoria Científica-Centerlab. Endereço eletrônico: <http://www.newslab.com.br/homocisteína.htm>. 12/03/04.**
- MALINOW, M. R., DUELL, P. B., HESS, D. L., ANDERSON, P. H. KRUGER, W. D., PHILLIPSON, B. E., GLUCKMAN, R.A., BLOCK, P.C., UPSON, B.M. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by Breakfast cereal fortified with Folic acid in patients with coronary disease. New England Journal of Medicine, 338 (15): 1009-1015, 1998.
- MOSHFEGH, A.J., COOK, A.J., HO, J.M., FRIDAY, J.E. Folate intakes. Food surveys Research Group. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.**
- NDAW, S.; BERGAENTZLÉ, M; AOUDÉ-WERNER, D.; LAHÉLY, S.; HASSELMANN, C.**Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates. Journal Chromatography A. 928, p. 77-90, 2001.
- NIGARD, O.; NORDREHAUG, J.E.; REFSUM, H.; UELAND, P.M.; FARSTAD, M.; VOLLSET, S.E.** Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. New England Journal of Medicine, 337: 230-236, 1997.
- OAKLEY, G. P. Jr., ERICKSON, J. D., ADAMS, M. J. Urgent need to increase folic acid consumption. Journal of American Medical Association, 274 (21): 1717-1718, 1995.
- PARODI, P.W.** Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. The Australian Journal of Dairy Technology, 52: 109-118, october, 1997.
- QUINLIVAN, E.P.; McPARTIN, J.; McNULTY, H; WARD, M.; STRAIN, J.J.; WEIR D.G.; SCOTT J.M.** Inportance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. The Lancet, 359, p. 227-228, 2002.

- RANG, H.P., RITTER, J .M., DALE, M. M. Farmacologia. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.**
- SCOTT, J.; RÉBEILLE F.; FLETCHER, J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, p. 795-824, 2000.**
- TSAI, M.Y.; WELGE, B.G.; HANSON, N.Q.; BIGNELL, M.K.; VESSEY, J.; SHWICHTENBERG, K.; YANG, F.; BULLEMER, F.E.; RASMUSSEN, R.; GRAHAM, K.J. Genetic cause of mild hiperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery disease. Atherosclerosis, 143: 163-169, 1999.**
- ULENE, A., ULENE, V. Vitaminas. 1ed. Blumenal:EKO, 1995.**
- VAHTERISTO, L.T.; OLLILAINEN, V.; VARO, P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg and dairy products consumed in Finland. Journal of AOAC International, 80 (2): 373-378, 1997.**

CAPÍTULO 4

FOLATOS EM FRUTAS TÍPICAS DA REGIÃO NORTE E NORDESTE DO BRASIL

Artigo enviado para o Journal Food Science
Catharino, R. R., Azevedo, J.L., Godoy, H.T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
C.P. 6121 CEP - 13083-970
robit@bol.com.br

FOLATOS EM FRUTAS TÍPICAS DA REGIÃO NORTE E NORDESTE DO BRASIL

Catharino, R. R., Azevedo, J.L., Godoy, H.T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
C.P. 6121 CEP - 13083-970
robit@bol.com.br

RESUMO

Considerando que as frutas tropicais podem ser fontes de importantes nutrientes, aliado ao fato da falta de conhecimento de algumas dessas frutas e seu potencial de consumo, os conteúdos de folatos do jenipapo e murici foram determinados. Foram analisadas neste trabalho frutas da região norte e nordeste, adquiridos nas cidades de Belém (PA) e Fortaleza (CE), respectivamente, em dois diferentes anos de safra (2001 e 2002). Foram encontrados nas frutas cinco formas de folatos, o tetraidrofolato (THF), 5-metil-tetraidrofolato (5MTHF), 10-formil-ácido fólico (10FAF) e o 10-metil-ácido fólico (10MAF). No jenipapo o 10MAF foi a forma predominante, representando de 50 a 72% dos folatos totais. Já no murici a forma predominante foi o 5MTH, representando de 60 a 94% dos folatos totais. Ainda em termos de folatos totais, o murici apresentou teores superiores aos encontrados no jenipapo. Os frutos de jenipapo, provenientes da cidade de Fortaleza, apresentaram teores muito maiores (70,2 a 80,4 μ g/100g) do que os frutos da cidade de Belém (14,5 a 25,2 μ g/100g), nas duas safras analisadas. Por outro lado, os frutos do murici da cidade de Belém mostraram teores mais elevados de folatos totais. Não houve diferença significativa entre os frutos das duas safras analisadas da cidade de Fortaleza, entretanto as duas safras de frutas, tanto do jenipapo

quanto do murici, provenientes da cidade de Belém apresentaram diferença significativa. Os dados mostram que há uma forte influência das condições edafoclimáticas sobre os teores de folatos.

ABSTRACT

Considering that tropical fruits can be sources of important nutrients, added to the fact that there is a lack of knowledge of some of these fruits and their potential for consumption, the amounts of folates in genipapo and murici were determined. Fruits from the north and northeastern region of Brazil, Belem (PA) and Fortaleza (CE), respectively, were analyzed in this study, in two consecutive harvests (2001 and 2002). Five different forms of folate were found in these fruits, tetrahydrofolate (THF), 5-methyl-tetrahydrofolate (5MTHF), 10-formyl-folic acid (10FAF) and 10-methyl-folic acid (10MAF). In genipapo, 10MAF was the predominant form, representing 50 to 72% of the total folates. In murici the predominant form was 5MTHF, representing 60 to 94% of the total folates. In terms of total folates, murici presented more than genipapo. The genipapo fruits, from Fortaleza presented greater contents (70.2 to 80.4 µg/100g) than those from Belem city (14.5 to 25.2 µg/100g) for both the harvests analyzed. On the other hand, murici fruits from Belem city showed higher levels of total folates. There was no significant difference between the two harvests analyzed for either fruit coming from Fortaleza, however there were significant differences between the two harvests for both genipapo and murici, from Belem city. The data show a considerable influence of the climatic conditions on the levels of folates.

INTRODUÇÃO

A estreita relação entre os componentes da dieta e saúde fez com que aumentasse a preocupação dos consumidores em ingerir alimentos nutritivos e/ou de alta qualidade. Entre os nutrientes hoje destacam-se os folatos, uma classe de vitaminas do complexo B, que ganharam a atenção os pesquisadores em virtude das novas descobertas sobre as ações benéficas à saúde do homem (BRODY, 1991; CZEIZE e DUDAS, 1992; KATZUNG, 1994; ULENE e ULENE, 1995; OAKLEY *et al.*, 1995; CRANE *et al.*, 1995; DALY *et al.*, 1997; DEVLIN, 1997; PARODI, 1997; RANG *et al.*, 1997; DIERKS *et al.*, 1998; MALINOW *et al.*, 1998; QUIMLIVAN *et al.*, 2002; CHARMICHAEL *et al.*, 2003). Aliados a esses estudos, outros apontaram a relação entre a deficiência de congêneres do ácido fólico com câncer de colon, leucemia, doenças mieloproliferativas, enfermidades crônicas de pele, além de outras doenças debilitantes crônicas (DALY *et al.*, 1997; DEVLIN, 1997; RANG *et al.*, 1997; HORNE e HOLLAWAY, 1997; NIGARD *et al.*, 1997; MALINOW *et al.*, 1998; MOSHFEGH *et al.*, 1998; CLARKE *et al.*, 1998). O Brasil já reconheceu a importância dos folatos, através da Resolução nº 344 de 13/12/2002, obriga o enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico (Brasil, 2002).

Os folatos estão distribuídos em muitos alimentos, principalmente em verduras frescas, fígado, leveduras e algumas frutas (VAHTERISTO *et al.*, 1997; GREGORY, 1984; LUCOCK, *et al.*, 1995; SCOTT *et al.*, 2000). Principalmente em relação às frutas, há muito poucos dados na literatura, e

mesmo assim apenas apresentando o conteúdo de folatos totais (BRODY, 1991, SCOTT *et al.*, 2000).

Entre as frutas regionais brasileiras que costumam aparecer nos pregões matinais dos vendedores ambulantes, em especial em algumas capitais da região Nordeste, o murici, certamente, tem um lugar de destaque e, dependendo da época do ano, ocupa o mesmo espaço destinado a frutas tão importantes como a graviola, o jambo e a pitomba. O murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich) (**Anexo 3**) é um fruto de forma arredondada, de coloração alaranjada com polpa carnosa e translúcida e sementes de coloração creme, frutificando de abril a junho. O jenipapo (*Genipa americana*, L.) (**Anexo 4**) é um fruto formado por uma baga ovóide, de cor parda, com 5-12cm de diâmetro, com polpa parda, sucosa, aromática e comestível. Embora seja consumido ao natural, seu mais frequente consumo é sob a forma de licor.

A descoberta de novas fontes naturais de folatos vem contribuir no sentido de garantir a ingestão dessa vitamina na dieta. As frutas fazem parte da dieta do brasileiro, tornando assim muito importante o conhecimento dos teores presentes nas mesmas, principalmente nas frutas regionais, que podem estar contribuindo significativamente para o aporte da vitamina em populações carentes. Nesse sentido, o presente trabalho estabeleceu a composição qualitativa e quantitativa dos folatos presentes em duas frutas regionais, jenipapo e murici.

MATERIAL E MÉTODO

10 Material

Três diferentes lotes de murici e jenipapo, de aproximadamente 1,0kg cada, foram obtidos no comércio local das cidades de Belém (PA) e de Fortaleza (CE), em duas safras (2001 e 2002). As frutas encontravam-se em estágio de consumo adequado de maturação, de acordo com a aparência e a textura. As frutas foram congeladas (-18°C) e transportadas via aérea para Campinas (São Paulo) para posterior análise. Todas as frutas que compunham cada lote tiveram as cascas e os caroços retirados e a polpa homogeneizada em liquidificador, antes da retirada da amostra analítica. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

11 Reagentes

Os padrões de folatos, 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato sal de cálcio, tetraidrofolato, 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato sal de cálcio, 10-formil-ácido fólico, 10-metil-ácido fólico, foram adquiridos do laboratório SCHIRCKS (Suíça), e o ácido fólico (F-7876) foi cedido pela (SIGMA, USA). A acetonitrila, grau cromatográfico, os ácidos acético e tricloroacético, bem como, o sal de acetato de amônio, todos grau analítico, foram adquiridos da MERCK (Brasil). A água utilizada no preparo das amostras e da fase móvel foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fase móvel foi filtrada em filtros MILLIPORE, com poros de 0,45µm de diâmetro.

12 Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100µL e detectores de arranjo de diodos (DAD) (UV-Visível)

e de fluorescência dispostos em série. Ambos permitem a detecção simultânea em vários comprimentos de onda. Todo o sistema foi controlado pelo programa Chemstation-HP, que também gerencia o sistema de aquisição e tratamento de dados.

Para separação das vitaminas foi utilizada uma coluna cromatográfica Microsorb ODS-2, 5µm, 250mm x 4,6mm d.i. (RAIMIN), protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5µm, 10mm x 4,6 mm d.i. (VARIAN).

Método

O método utilizado neste trabalho foi desenvolvido por CATHARINO *et al.* (2002). Para a extração dos folatos nas frutas foram tomadas 10,0g da polpa previamente homogeneizada, que foram trituradas com 40mL de acetato de amônio (0,05mol/L). A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50mL, adicionando-se mais 2,5mL de ácido tricloroacético (TCA) e, por fim, o volume aferido com solução de acetato de amônio. Após homogeneização, seguiram-se duas etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a segunda em membrana durapore (HVLP 01300, MILLIPORE), com poros de 0,45µm, e em seguida o extrato foi injetado no cromatógrafo (100µL).

O sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min, foi desenvolvido com 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2,8 com KOH) no início, chegando em 25 minutos a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se essas condições até o final da corrida em 31 minutos. As condições iniciais foram retomadas e com coluna re-equilibrada por 15 minutos, antes da próxima injeção. O 5MTHF,

5FTHF e THF foram detectados utilizando-se a fluorescência natural destes compostos, utilizando como λ_{exc} 290nm e λ_{emis} 360nm, para o 10FAF utilizou-se o λ_{exc} 360nm e λ_{emis} 445nm. O AF e o 10MAF foram detectados na região do ultra-violeta a 290nm.

As identificações foram feitas por comparação entre os tempos de retenção, obtidos com os padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros obtidos com a utilização do detector de arranjo de diodos e fluorescência. O grau de pureza das vitaminas foi avaliado pelo sistema disponível no software Chemstation-HP. A quantificação foi realizada por padronização externa (**Anexo 2**). Todas as precauções necessárias para evitar a degradação das vitaminas durante a análise foram tomadas, realizando-se os ensaios o mais rápido possível e protegendo as vitaminas da ação da luz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os folatos encontrados em maiores quantidades nas duas frutas analisadas foram 5-metiltetraidrofolato, tetraidrofolato, 10- metil-ácido fólico e 10-formil-ácido fólico. Já o 5-formil-ácido fólico foi encontrado em quantidade de traços e em lotes. Os perfis cromatográficos obtidos da composição dos folatos para as duas frutas estão apresentados na **Figura 1**. O folato de maior concentração no jenipapo foi o 10MAF, representando de 50 a 72% dos folatos totais (**Tabela 1**), enquanto que no murici a forma predominante foi o 5MTHF, representando em média de 60 a 94% dos folatos totais (**Tabela 2**).

A quantidade de folatos totais no jenipapo (**Tabela 1**) apresentou uma variação menor na região nordeste (63,6 a 81,3µg/100g para a safra de 2001 e 74,7 a 86,3µg/100g para a safra de 2002) em comparação com os frutos da região norte, que tiveram uma quantidade de folatos totais determinada numa faixa de 11,2 a 47,6µg/100g para a safra de 2001 e 9,9 a 21,2µg/100g para safra de 2002. Houve diferença significativa ($p < 5\%$) entre as quantidades determinadas para as diferentes formas de folatos nos três lotes analisados para a mesma safra e região, o mesmo ocorrendo entre as regiões nordeste e norte. Os frutos da região nordeste apresentaram, nas duas safras, concentrações de folatos bem superiores, em particular para o 10FAF e o 10MAF, aos frutos da região norte. Em média, os frutos da região nordeste apresentaram uma quantidade de folatos, praticamente, quatro vezes maior que os frutos da região norte.

Os frutos do muricizeiro (**Tabela 2**) apresentaram, em relação aos teores de folatos totais, um comportamento inverso ao do jenipapo, para os frutos comparados entre as duas regiões estudadas. Os frutos da região norte apresentaram os teores de folatos totais entre 73,2 a 146,5µg/100g, enquanto que os frutos da região nordeste tiveram teores entre 49,5 a 50,3µg/100g. As variações entre os diferentes lotes, de uma mesma região e safra, foram menores do que as apresentadas pelo jenipapo, embora também apresentassem diferença significativa ($P < 5\%$) entre as quantidades dos folatos, talvez em virtude de uma maior facilidade na determinação, principalmente, do estágio de maturação dos frutos (cor e textura). Não houve diferença significativa entre as duas safras da região nordeste, no entanto a safra de 2002 da região norte apresentou teores 50% superiores em relação à

safras de 2001. De uma forma geral os frutos do murici da região norte apresentaram níveis de folatos superiores aos encontrados no jenipapo desta mesma região.

A falta de dados na literatura não permite uma comparação quanto à composição dos folatos encontrados nas duas frutas analisadas, possibilitando apenas uma comparação entre os teores de folatos totais e mesmo assim para outras frutas com características muito diferentes das aqui analisadas. Tanto o murici quanto o jenipapo mostraram-se, em comparação com os dados fornecidos por BRODY (1991) e SCOTT *et al.* (2000) para suco de laranja e banana, como fontes ricas em folatos.

Tabela 1. Teores de folatos ($\mu\text{g}/100\text{g}$) em jenipapo das regiões norte e nordeste das safras 2001 a 2002.

Lotes	THF		5MTHF		10FAF		10MAF		Folatos totais	
	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%
Jenipapo (nordeste) (2001)										
L1	0,32 $\pm$ 0,02a	6,6	11,1 $\pm$ 0,2a	1,8	22,3 $\pm$ 1,4a	6,3	47,6 $\pm$ 1,1a	2,3	81,3 $\pm$ 1,8a	2,2
L2	0,38 $\pm$ 0,05a	13	9,5 $\pm$ 0,7b	7,4	12,3 $\pm$ 0,5b	4,0	52,5 $\pm$ 1,0b	1,9	65,7 $\pm$ 1,2b	1,8
L3	0,41 $\pm$ 0,02b	4,8	8,2 $\pm$ 0,4b	4,8	13,8 $\pm$ 0,2b	1,4	51,2 $\pm$ 1,1b	2,1	63,6 $\pm$ 1,1b	1,7
média	0,37$\pm$0,04	11	9,6$\pm$1,8	12	16,1$\pm$4,4	27	50,4$\pm$2,1	4,1	70,2$\pm$7,9	11
Jenipapo (nordeste) (2002)										
L1	0,26 $\pm$ 0,01a	3,8	4,1 $\pm$ 0,3a	7,3	14,9 $\pm$ 1,4a	9,4	55,3 $\pm$ 1,3a	2,4	74,7 $\pm$ 2,1a	2,8
L2	0,35 $\pm$ 0,03b	8,5	12,6 $\pm$ 0,7b	5,6	19,6 $\pm$ 0,9b	4,6	47,5 $\pm$ 1,7b	3,6	80,1 $\pm$ 1,9b	2,4

L3	0,31±0,01b	3,2	5,6±0,6c	10,7	23,9±1,5c	6,3	56,5±2,8a	5,0	86,3±2,5c	2,9
média	0,31±0,04	12	7,4±3,7	50	19,5±3,7	19	53,2±4,0	7,5	80,4±4,7	5,9

Jenipapo (norte) (2001)

L1	0,40±0,01a	2,5	4,3±0,2a	4,7	2,1±0,1a	4,8	4,5±0,2a	4,4	11,2±1,1a	9,8
L2	0,45±0,01b	2,2	4,6±0,3a	6,5	1,5±0,1b	6,7	10,4±0,7b	6,7	16,9±1,0b	5,9
L3	0,67±0,03c	4,5	10,8±0,8b	7,4	3,5±0,2c	5,7	32,7±1,0c	3,1	47,6±1,3c	2,7
média	0,51±0,12	23	6,6±3,0	45	2,4±0,8	35	15,9±12,1	76	25,2±16,0	63

Jenipapo (norte) (2002)

L1	0,41±0,01a	2,4	6,3±0,2a	6,0	2,8±0,1a	3,6	11,7±0,2a	3,5	21,2±0,7a	5,7
L2	0,38±0,01a	2,6	2,7±0,1b	3,7	1,7±0,1b	5,9	5,1±0,3b	5,9	9,9±0,9b	9,1
L3	0,52±0,03b	5,8	3,1±0,1c	3,2	2,5±0,2a	8,0	6,3±0,3b	4,6	12,4±0,6c	8,7
média	0,44±0,06	14	4,0±1,6	40	2,3±0,5	20	7,7±2,9	37	14,5±4,8	33

M ± D média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação; Folatos T folatos totais.

Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os valores (P<5%)

Tabela 2. Teores de folatos ($\mu\text{g}/100\text{g}$) em murici das regiões norte e nordeste das safras 2001 a 2002.

Lotes	THF		5MTHF		10FAF		10MAF		Folatos totais	
	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%
Murici região (nordeste) (2001)										
L1	2,2 $\pm$ 0,4a	18	20,6 $\pm$ 0,3a	1,4	1,6 $\pm$ 0,0a	-	15,9 $\pm$ 0,5a	3,1	40,3 $\pm$ 1,8a	4,5
L2	2,7 $\pm$ 0,2a	7,4	31,1 $\pm$ 0,2b	0,6	2,4 $\pm$ 0,1b	4,1	17,6 $\pm$ 0,3b	1,7	53,8 $\pm$ 2,1b	3,9
L3	2,1 $\pm$ 0,1a	4,7	37,9 $\pm$ 0,3b	0,8	2,2 $\pm$ 0,2b	9,0	12,1 $\pm$ 0,2c	1,7	54,3 $\pm$ 1,8b	3,3
média	2,3$\pm$0,2	8,7	29,9$\pm$7,1	24	2,1$\pm$0,3	16	15,2$\pm$2,3	15	49,5$\pm$6,5	13
Murici (nordeste) (2002)										
L1	1,2 $\pm$ 0,1a	8,3	29,5 $\pm$ 0,4a	1,4	1,2 $\pm$ 0,1a	8,3	9,5 $\pm$ 0,7a	7,4	41,3 $\pm$ 1,8a	4,4
L2	2,4 $\pm$ 0,2b	8,3	27,1 $\pm$ 0,6a	2,2	1,5 $\pm$ 0,1a	6,7	11,6 $\pm$ 0,6a	5,2	42,6 $\pm$ 2,1a	4,9
L3	2,1 $\pm$ 0,2b	9,5	47,5 $\pm$ 0,5c	1,1	1,2 $\pm$ 0,1a	8,3	16,1 $\pm$ 0,5b	3,1	66,9 $\pm$ 1,8b	2,7
média	1,9$\pm$0,5	27	34,7$\pm$9,1	26	1,3$\pm$0,1	7,7	12,4$\pm$2,7	22	50,3$\pm$11,8	23
Murici (norte) (2001)										
L1	0,35 $\pm$ 0,02a	5,7	63,4 $\pm$ 0,9a	7,5	2,5 $\pm$ 0,2a	8,0	2,5 $\pm$ 0,2a	8,0	68,7 $\pm$ 0,8a	4,3
L2	0,28 $\pm$ 0,01a	3,6	70,3 $\pm$ 1,1b	1,6	1,0 $\pm$ 0,1b	10	4,5 $\pm$ 0,2b	4,4	76,1 $\pm$ 1,4b	1,8
L3	1,15 $\pm$ 0,03b	2,7	64,9 $\pm$ 1,3a	3,7	2,2 $\pm$ 0,1a	4,5	6,5 $\pm$ 0,3c	4,6	74,7 $\pm$ 1,9b	4,3
média	0,6$\pm$0,4	67	66,2$\pm$2,9	4,5	1,9$\pm$0,6	34	4,5$\pm$1,6	36	73,2$\pm$3,2	4,4
Murici (norte) (2002)										
L1	0,28 $\pm$ 0,01a	3,6	130,1 $\pm$ 2,0a	1,5	2,5 $\pm$ 0,2a	8	13,9 $\pm$ 0,9a	6,5	146,9 $\pm$ 2,8a	1,9
L2	0,49 $\pm$ 0,02b	4,1	151,7 $\pm$ 1,8b	1,2	1,1 $\pm$ 0,1b	9,1	5,9 $\pm$ 0,2b	3,4	159,2 $\pm$ 2,5b	1,6
L3	0,60 $\pm$ 0,03c	5,0	129,9 $\pm$ 2,3a	1,8	1,0 $\pm$ 0,1b	10	2,1 $\pm$ 0,1c	4,8	133,4 $\pm$ 3,0c	2,2
média	0,6$\pm$0,1	22	137,2$\pm$10,2	7,5	1,5$\pm$0,7	45	7,3$\pm$4,9	67	146,5$\pm$10,5	7,2

M $\pm$ D média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação; Folatos T folatos totais.

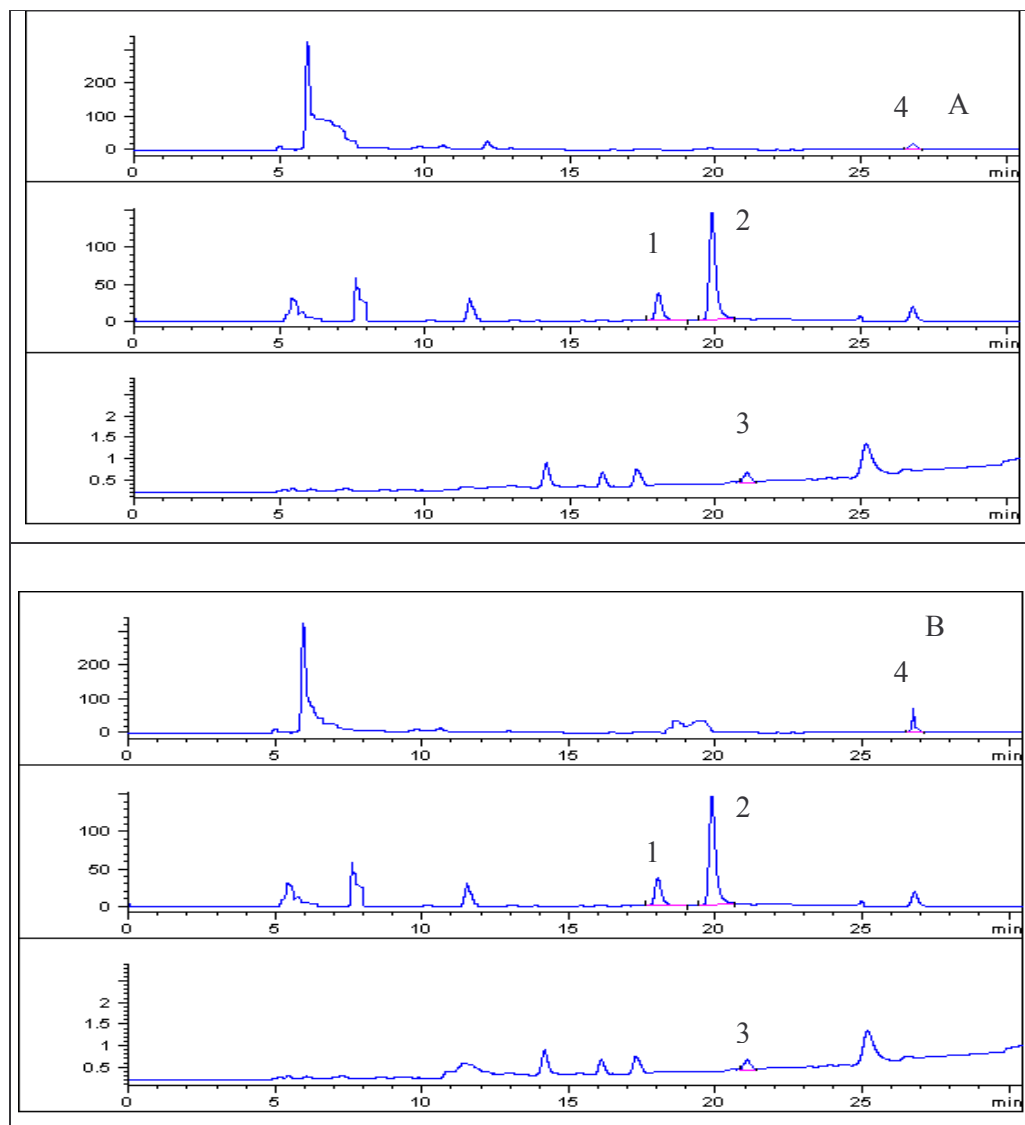


Figura 1: Perfis cromatográficos do extrato de jenipapo (a) e murici (b), utilizando detector de fluorescência (λ_{exc} 290nm e λ_{emis} 360nm para folatos e λ_{exc} 360nm e λ_{emis} 445 nm para) (A) e o AF usando um detector de arranjo de diodos (UV-VIS) a 290nm (B). Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 250X4,6mm. Fase móvel: 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2.8 com KOH), chegando em 25 minutos a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v), mante-o-se nessas condições até 31 minutos. Vazão de 0.5mL/minuto. Identificação dos picos: (1) TMF; (2) 5MTHF; (3) 10FAF; e (4) 10MAF.

CONCLUSÕES

As frutas regionais podem contribuir de forma significativa para o aporte de folatos na dieta. Há, entretanto, uma grande influência das condições edafoclimáticas sobre os teores de folatos.

E os jenipapos do nordeste apresentaram teores maiores de folatos totais em comparação com a região norte, porém para o murici da região norte os teores foram maiores quando comparados aos frutos do nordeste.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pelo apoio financeiro concedido à pesquisa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Resolução- RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. Diário oficial da União, Brasília, 18 de dezembro de 2002.
- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. Handbook of vitamins. 2ed. rev. and Expanded. New York: Marcel Decker, 1991.
- CATHARINO, R. R., Lima, J. A., GODOY, H. T. Metodologia para determinação simultânea de folatos, B2 e B12 por cromatografia líquida de alta eficiência. *Analytica*, 2: 19-23, 2002
- CHARMICHAEAL, S.L., SHAW, G.M., SELVI, S., SCHAFFER, D.M. Diet quality and risk of neural tube defects. *Medical Hypotheses*, 60, 3, p. 351-355, 2003.
- CLARKE, R.; SMITH, A.D.; JOBST, K.A.; REFSUM, H.; SUTTON, L.; UELAND, P.M. Folate, vitamin B12 and serum homocysteine levels in cofirmed Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*, 111: 449-1453, 1998.
- CRANE, N.T., WILSON, D.B., COOK, D.A., LEWIS, C.J., YETLEY, E.A., RADER, J. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. *American Journal of Public Health*, 85 (5): 660-666, 1995.
- CZEIZE, A.E., DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by perioconceptional vitamin supplementation. *New England Journal of Medicine*, 327 (226): 1832-1835, 1992.
- DALY S., MILLS, J.R., MOLLOY, A.M., CONLEY, M., LEE, Y.J, KIRKE, P.N, WEIR, D.G., SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet*, 350 (9092): 1666-1669, 1997.

- DEVLIN, T.M. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. 1ed. Ed. Edgard Blücher, 1997.
- DIERKES, J., KROESEN, M., PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B₆ supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. *International Journal of Vitamin and Nutrient Research*, 68: 98-103, 1998.
- GREGORY, J.F. Determination of folacin in foods and other biological materials. *Journal of Association Official of Analytical Chemistry*, 67: 1015-1019, 1984.**
- HORNE, D.W., HOLLOWAY R.S. Compartmentation of folate metabolism in rat pancreas: nitrous oxide inactivation of methionine synthase leads to accumulation of 5-methyltetrahydrofolate in cytosol. *Journal of Nutrition*, 127 (9): 1772-1775, 1997.**
- KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- LUCOCK, M.D., GREEN, M., PRIESTNALL, M., DASKALAKIS, I., LEVENE, H.M.I. Optimization of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. *Food Chemistry*, 329-338, 1995.
- MALINOW, M. R., DUELL, P. B., HESS, D. L., ANDERSON, P. H. KRUGER, W. D., PHILLIPSON, B. E., GLUCKMAN, R.A., BLOCK, P.C., UPSON, B.M. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by Breakfast cereal fortified with Folic acid in patients with coronary disease. *New England Journal of Medicine*, 338 (15): 1009-1015, 1998.
- MOSHFEGH, A.J., COOK, A.J., HO, J.M., FRIDAY, J.E. Folate intakes. Food surveys Research Group. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.**
- NIGARD, O.; NORDREHAUG, J.E.; REFSUM, H.; UELAND, P.M.; FARSTAD, M.; VOLLSET, S.E. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*, 337: 230-236, 1997.**
- OAKLEY, G. P. Jr., ERICKSON, J. D., ADAMS, M. J. Urgent need to increase folic acid consumption. *Journal of American Medical Association*, 274 (21): 1717-1718, 1995.

- PARODI, P.W.** Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 52: 109-118, october, 1997.
- QUINLIVAN, E.P.; McPARTIN, J.; McNULTY, H; WARD, M.; STRAIN, J.J.; WEIR D.G.; SCOTT J.M.** Inportance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *The Lancet*, 359, p. 227-228, 2002.
- RANG, H.P., RITTER, J .M., DALE, M. M.** *Farmacologia*. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE F.; FLETCHER, J.** Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, p. 795-824, 2000.
- ULENE, A., ULENE, V.** *Vitaminas*. 1ed. Blumenal: EKO, 1995.
- VAHTERISTO, L.T.; OLLILAINEN, V.; VARO, P.** Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg and dairy products consumed in Finland. *Journal of AOAC International*, 80 (2): 373-378, 1997.

CONCLUSÕES GERAIS e PERSPECTIVAS FUTURAS

CONCLUSÕES GERAIS

A simplicidade e rapidez da etapa de extração, aliadas aos dados de recuperação e repetibilidade, indicam a eficiência da aplicação da metodologia na determinação simultânea de folatos. A retirada da etapa de hidrólise enzimática foi a principal alteração em relação aos métodos da literatura, tornando o método aqui desenvolvido mais rápido, prático, viável e com menor custo. No entanto, a aplicação do método a outras matrizes alimentícias só deve ser feita após estudos de validação nessas matrizes.

O método por CLAE, utilizando a eluição por gradiente, permitiu a separação de pelo menos cinco formas diferentes de folatos. A utilização do detector de fluorescência foi fundamental para a detecção nos alimentos aqui analisados, possibilitando além de um cromatograma mais limpo, limites de detecção baixos do que os encontrados na literatura para as diferentes formas de folatos.

O método aqui desenvolvido com certeza permitirá um avanço nos estudos sobre os folatos em alimentos.

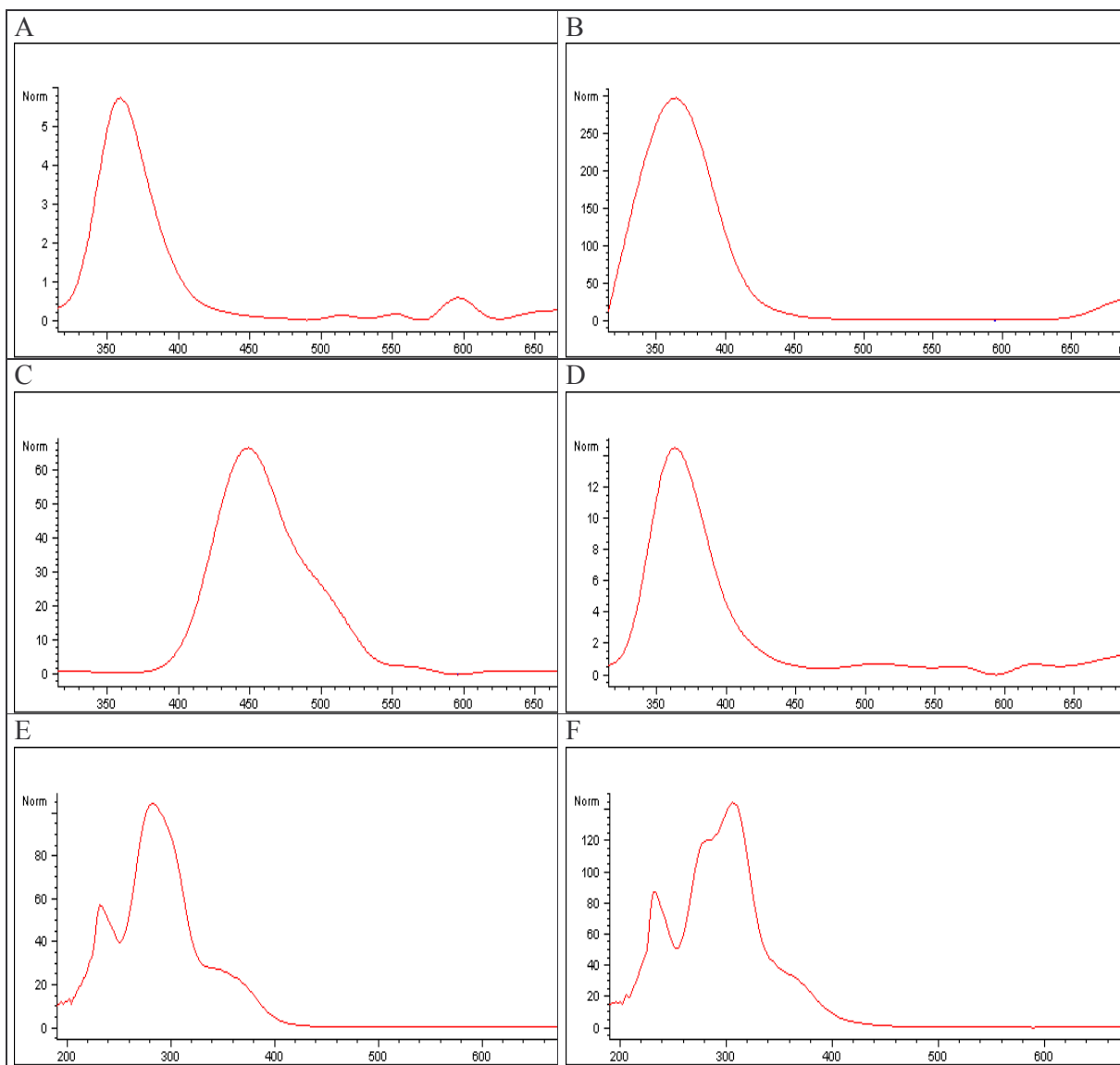
Em relação aos alimentos aqui analisados, destaca-se as frutas regionais (murici e jenipapo) como fontes de folatos. A cerveja pilsen também se destaca como fonte dessa vitamina, no entanto deve-se tomar cuidado por ser uma bebida alcoólica

PERSPECTIVAS FUTURAS

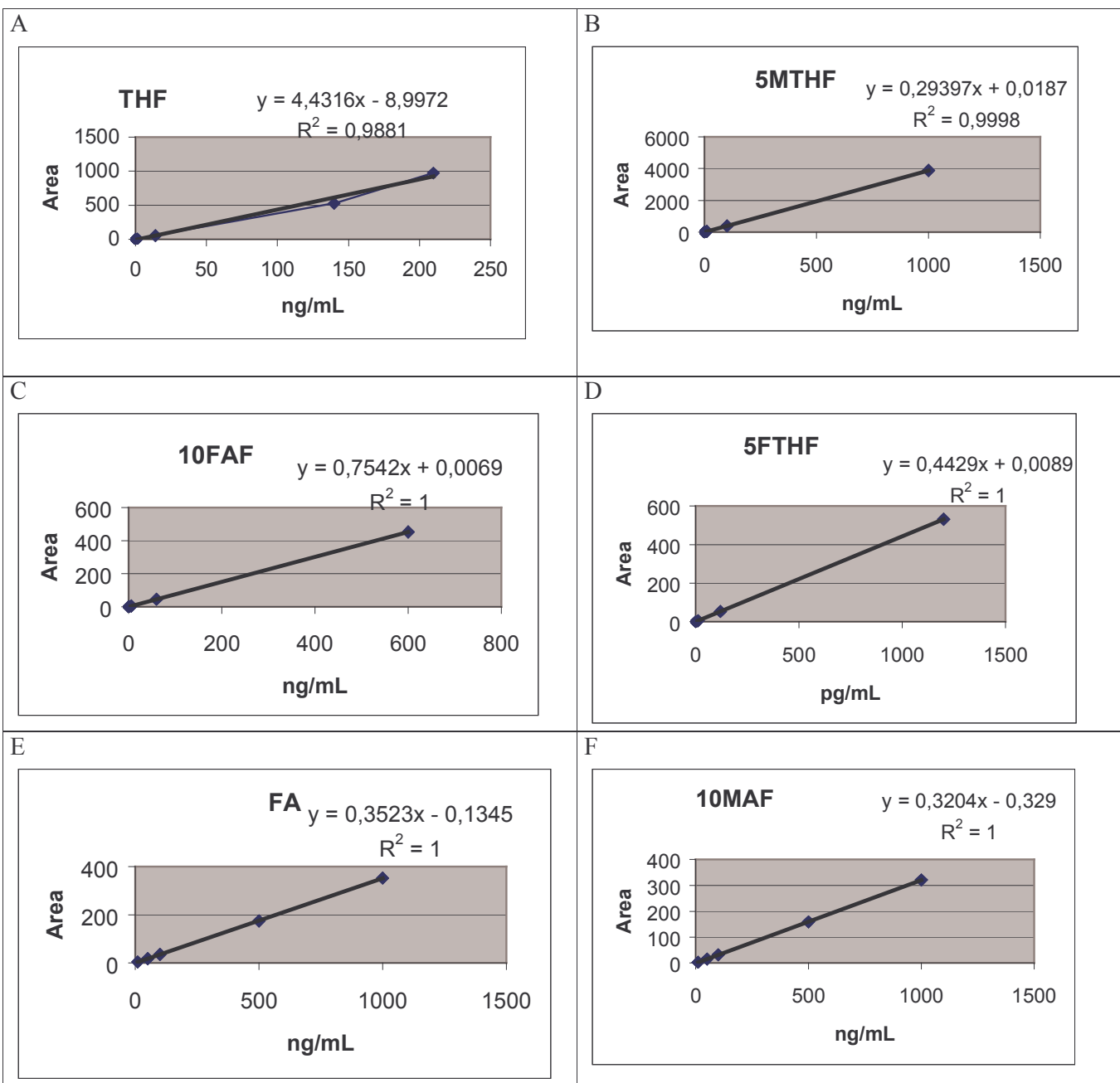
Como proposição de trabalhos futuros sugerimos o estudo do comportamento de folatos durante a produção de alimentos industrializados o que poderia vir a trazer uma contribuição significativa para os pesquisadores, produtos e consumidores.

E sugerimos também um estudo da biodisponibilidade dos folatos em alimentos.

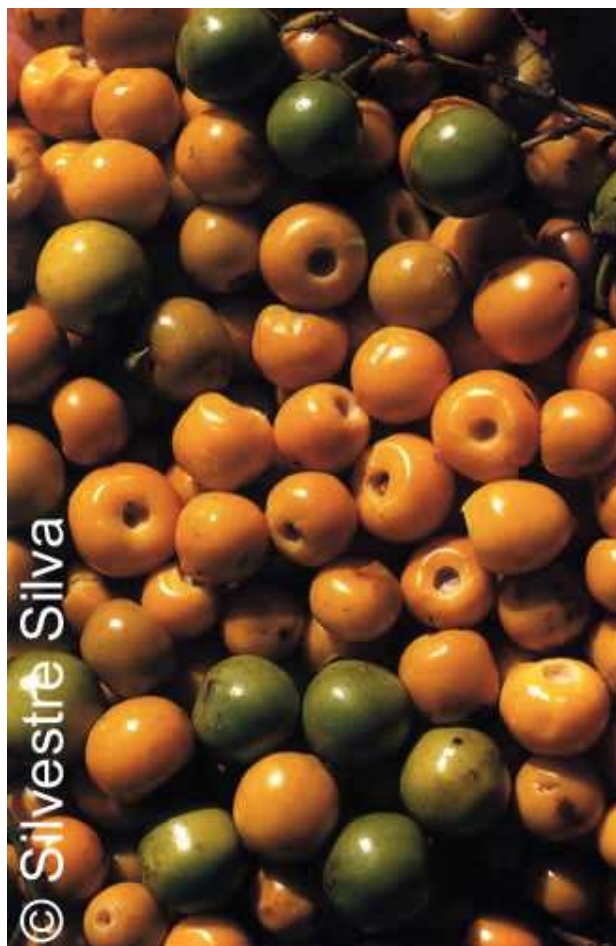
ANEXOS



Anexo 1 : Espectros de excitação e absorção dos diferentes folatos: (A) THF; (B) 5MTHF; (C) 10FFA; (D) 5FFA; (E) AF; (F) 10MAF.



Anexo 2 : Curvas analíticas para os diferentes folatos: (A) tetraidrofolato; (B) 5-metiltetraidrofolato; (C) 10-formil-ácido fólico; (D) 5-metil ácido fólico; (E) ácido fólico; e (F)10-metil-ácido fólico.



Nome popular: murici

Nome científico: *Byrsonima crassifolia* (L.) Rich

Família botânica: Malpighiaceae

Origem: Norte e Nordeste do Brasil

Anexo 3: Foto dos frutos de murici.



Nome popular: jenipapo
Nome científico: *Genipa americana*, L.
Família botânica: Rubiaceae
Origem: Norte dos estados de Minas Gerais e São

Anexo 4: Fotos dos frutos de jenipapo