



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

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS
DO COMPLEXO B
EM CREMES VEGETAIS
ENRIQUECIDOS**

Goreti Aparecida Guedes de Moraes Trevisan

Prof^a. Dra. Helena Teixeira Godoy
Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por **Goreti Aparecida Guedes de Moraes Trevisan** aprovado pela Comissão Julgadora em 31 de agosto de 2010.

CAMPINAS – SP
2010

Campinas, 31 de agosto de 2010.

Prof^a. Dra. Helena Teixeira Godoy
Presidente da Banca

UNIDADE BC
Nº CHAMADA _____
T/UNICAMP T729d
V _____
TOMBO BC/ 88190
PROC 16.134.10
C _____ D x _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 8-10-10
CÓD T 774689

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

T729d

Trevisan, Goreti Aparecida Guedes de Moraes
Determinação de vitaminas do complexo B em cremes vegetais
enriquecidos / Goreti Aparecida Guedes Moraes Trevisan . --
Campinas, SP: [s.n], 2010.

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

1. Vitamina B - Complexo. 2. Alimentos enriquecidos. 3.
Margarina. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Godoy,
Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfca

Título em inglês: Determination of B-group vitamins in enriched vegetable spreads
Palavras-chave em inglês (Keywords): Vitamins B - , Fortified foods, Margarine,
HPLC, Vegetable spread

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy

Renato Grimaldi

Gisele Cristina Maziero de Campos Bannwart

Marcelo Alexandre Prado

Rosa Maria Vercelino Alves

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

E,
R3393



Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy

Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA – UNICAMP
(Orientadora)

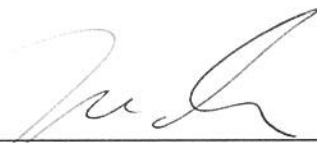
Prof. Dr. Renato Grimaldi

Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA – UNICAMP
(Membro)



Dra. Gisele Cristina Maziero de Campos Bannwart

Unilever Brasil Alimentos – Pesquisa & Desenvolvimento
(Membro)



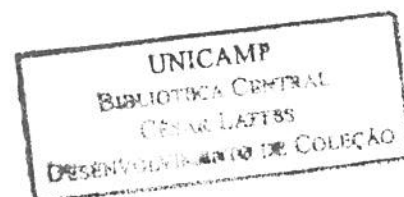
Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado

Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA – UNICAMP
(Membro)

Dra. Rosa Maria Vercelino Alves

Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL - CETEA
(Membro)

201026216



Ainda que eu falasse as línguas
dos homens e dos anjos...

Mesmo que eu tivesse o dom da profecia,
e conhecesse todos os mistérios e
toda a ciência;

... se não tiver o amor,
não sou nada.

1 Cor. 13, 1-2

Aos meus pais,
Mário (*em memória*) e Ditinha,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À estimada Prof^a. Dra. Helena Teixeira Godoy pela orientação, ensinamentos, apoio e paciência durante a realização deste trabalho. A ela toda a minha gratidão, respeito e admiração.

À banca composta pelo Prof. Dr. Renato Grimaldi, Dra. Gisele Cristina Maziero de Campos Bannwart, Dra. Rosa Maria Vercelino Alves e Prof. Dr. Marcelo Prado, pelas valiosas críticas e sugestões na correção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Prado e Dra. Regina Prado Zanes Furlani pelas sugestões efetuadas no exame de qualificação.

À Unilever Brasil Alimentos, por toda a contribuição na realização deste trabalho. De forma muito especial, agradeço à Adriana Aoki e Adriana Picchi que acreditaram neste trabalho e me incentivaram a levá-lo adiante.

Aos meus queridos colegas da Unilever Brasil Alimentos, Gláucia Marton, Luis Guatelli, Luis Baraçal e Ana Paula Contel Kohn pelas sugestões e por todo apoio na realização deste trabalho.

À Unicamp, ao Departamento de Engenharia de Alimentos.

À Secretaria de Pós-Graduação, em especial ao Cosme e Marcos, agradeço por toda a atenção e ajuda nesta etapa.

Aos meus queridos pais, Mário e Ditinha, e aos meus queridos irmãos Celso, Célio, Graça, Cássio e Marcos, agradeço por tudo, pelo amor incondicional e por estarem sempre presentes em minha vida.

Ao meu marido Marcos, por estar ao meu lado, por todo o carinho e incentivo.

Aos meus segundos pais Oswaldo e Yolanda, e segundos irmãos Beto, Mauro, Rose, Ivone, Elaine, Cláudia, Ângela e, a todos meus queridos sobrinhos, por existirem, por todos momentos de alegria e descontração e por todo incentivo.

A todos que contribuíram e incentivaram para a realização deste trabalho.

A Deus, por tudo.

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
Vitaminas	11
Tiamina	13
Niacina	17
Ácido Pantotênico	20
Piridoxina	23
Ácido Fólico	26
Vitamina B ₁₂	30
Necessidades Nutricionais.....	35
Estabilidade	38
Métodos de análise	42
Métodos biológicos ou bioensaio	43
Métodos bioespecíficos	43
Métodos microbiológicos	44
Métodos físico-químicos	44
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	46
Técnicas de Extração para Vitaminas Hidrossolúveis	52
MATERIAIS E MÉTODO.....	57
Amostras.....	57
Reagentes	57
Equipamento.....	58
Extração	58

Condições cromatográficas	59
Validação do método	61
 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 63
Etapas analíticas e validação da metodologia.....	63
Limites de detecção	67
Exatidão do método	69
Repetibilidade do método	69
Avaliação das amostras	71
 CONCLUSÕES	 81
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 83
 ANEXOS.....	99
ANEXO 1 - Espectros de absorção das vitaminas B ₁ , B ₃ e B ₅	99
ANEXO 2 - Espectros de absorção das vitaminas B ₆ , B ₉ e B ₁₂	100
ANEXO 3 – Curvas analíticas das vitaminas B ₁ , B ₃ , B ₅ e B ₆	101
ANEXO 4 – Curvas analíticas das vitaminas B ₆ , B ₉ e B ₁₂	102

RESUMO

Devido à carência de métodos de análise oficiais atualizados, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para a determinação simultânea de vitaminas do complexo B em alimentos enriquecidos, neste trabalho foi proposto um método que visa sua aplicação em cremes vegetais enriquecidos com as vitaminas tiamina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, ácido fólico e cianocobalamina. A margarina e creme vegetal são alimentos a base de óleos e gorduras vegetais, consumidos por grande maioria dos brasileiros e, por este motivo, é um veículo interessante para o enriquecimento com vitaminas, incluindo as do complexo B. Desta forma, torna-se importante o controle destas vitaminas hidrossolúveis adicionadas a uma matriz deste tipo, uma emulsão água em óleo. O método proposto apresentou simplicidade, rapidez e fácil aplicação. As maiores vantagens foram a determinação simultânea de cinco vitaminas de uso comum em alimentos enriquecidos e uma redução do tempo requerido para a extração. Além disto, o método emprega uma quantidade menor de reagentes, quando comparado a métodos oficiais, e mínima manipulação da amostra foi alcançada, devido aos poucos passos requeridos. A separação cromatográfica foi conduzida em uma coluna de fase reversa C18, com vazão de 1,0 mL/min, por eluição com gradiente da fase móvel (KH_2PO_4 0,05 M - pH ajustado a 2,25 com H_3PO_4 como solução A e metanol, como solução B. Para agilização das análises, duas programações de gradiente foram utilizadas (Gradiente 1 e Gradiente 2). Para a condição de Gradiente 1 utilizou-se: 0 min – 0,3 % da fase móvel B; 0,3 min – 0,3% da fase móvel B; 5,0 min – 15,0% da fase móvel B; 10,0 min – 25,0 % da fase móvel B;

20,0 min – 40,0 % da fase móvel B; o volume de injeção utilizado foi de 10 µL. Para a condição de Gradiente 2 (amostras contendo as vitaminas piridoxina, ácido fólico e cianocobalamina), utilizou-se: 0 min – 7,5 % da fase móvel B; 0,3 min – 7,5% da fase móvel B; 0,6 min – 15,0% da fase móvel B; 15,0 min – 40,0 % da fase móvel B; 15,1 min – 60,0 % da fase móvel B; 20,0 min – 60,0 % da fase móvel B; o volume de injeção utilizado foi de 100 µL. As vitaminas foram detectadas a diferentes comprimentos de onda, utilizando detector de arranjo de diodos, com faixa de recuperação entre 98 a 110%. A repetibilidade foi aceitável (CV% entre 2,0 a 6,9) e os limites de detecção foram 0, 045; 0,05; 2,3; 0,04; 0,03 e 0,1 µg/mL para as vitaminas tiamina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, ácido fólico e cianocobalamina, respectivamente, na condição de Gradiente 1. Limites de detecção de 0,0025; 0,003 e 0,005 µg/mL foram obtidos, respectivamente, para as vitaminas piridoxina, ácido fólico e cianocobalamina, na condição de Gradiente 2.

SUMMARY

Due to the lack of official up-to-date methods of analysis using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the simultaneous B-group vitamins determination in fortified foods, in this work a method was proposed focusing on its application in vegetable spread supplemented with the vitamins thiamine, niacin, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and cyanocobalamin. The margarine and vegetable spread are foods made with vegetable oils and fats base that are commonly used by Brazilians and, for this reason, it is an interesting vehicle for the enrichment with vitamins including the B-group vitamins. So, the control of these water-soluble vitamins is potentially valuable in this kind of matrix, a water in oil emulsion. The proposed method showed simplicity, speed and easy application. The most relevant advantages were the simultaneous determination of five common vitamins in enriched food products, and a reduction of the time required for the extraction. Furthermore, the method uses a smaller amount of reagents if compared with official methods where minimal sample manipulation was achieved due to the few steps required. The chromatographic separation was carried out in a reverse phase C18 column and gradient elution with KH_2PO_4 0,05 M (pH at 2,25 with H_3PO_4), as solvent A, and methanol, as solvent B. The flow rate was 1,0 mL/min during the run. For the agility of the analyses, two gradient conditions were used (Gradient 1 and Gradient 2). The following gradient was applied for the Gradient 1 condition: at 0 min - 0,3% B; at 0,3 min - 0,3% B; at 5,0 min - 15,0% B; at 10,0 min - 25,0% B; at 20,0 min - 40% B; the injection volume was 10 μL . And the following gradient was applied for the Gradient 2 condition (samples containing the

vitamins pyridoxine, folic acid and cyanocobalamin): at 0 min - 7,5% B; at 0,3 min - 7,5%B; 0,6 min – 15,0% B; at 15,0 min – 40,0% B; at 15,1 min – 60,0% B; at 20,0 min – 60,0% B; the injection volume was 100 μ L. The vitamins were detected at different wavelengths by UV-visible detection and the recovery rates ranging from 98 to 110 %. The repeatability was acceptable (CV% varied from 2,0 to 6,9) and the limits of detection were 0,045; 0,05; 2,3; 0,04; 0,03 and 0,1 μ g/mL for the vitamins thiamine, niacin, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and cyanocobalamin respectively under Gradient 1 conditions. Limits of detection of 0,0025; 0,003 and 0,005 μ g/mL were obtained for the vitamins pyridoxine, folic acid and cyanocabalamin, respectively, under Gradient 2 conditions.

INTRODUÇÃO

A margarina foi inicialmente desenvolvida em 1869, pelo químico francês Hippolyte Mège-Mouriés, que ganhou um prêmio oferecido pelo governo de Napoleão III por descobrir um produto similar à manteiga, mas de origem vegetal (HUY, 1996a; IMACE, 2009; MARGARINE, 2009). Atualmente, a margarina é um produto de alta tecnologia, com características próprias e muitas variações (RODRIGUES *et al.*, 2004). Muitas diferentes combinações de óleos vegetais e gorduras são utilizadas para criar a ampla variedade de margarinas e produtos “spreads” que hoje o consumidor utiliza (MARGARINE, 2006).

Uma emulsão geralmente é definida como uma dispersão de gotículas de um líquido em outro, sendo que os dois são imiscíveis. Em alimentos, as emulsões têm um significado mais amplo, visto que em vários sistemas, sólidos e/ou gases também podem estar presentes (ROSSEAU, 2000). Margarinas e cremes vegetais são emulsões do tipo água em óleo (A/O), em que os glóbulos de água são conservados separados por cristais de gordura (SEGURA *et al.*, 1995), tendo como uma das principais características o fato de manter-se consistente à temperatura ambiente (BANNWART, 2009). As condições de processamento de margarinas e cremes vegetais são tão importantes na determinação de suas propriedades físicas quanto à composição de sua fase gordurosa. As principais propriedades, como consistência e plasticidade, dependem, basicamente, de fatores como método de resfriamento, tratamento térmico após o resfriamento (temperagem), tempo e grau de trabalho mecânico, tamanho e forma dos cristais (estrutura cristalina) e estado de emulsão (GIOIELLI, 1996).

Para que a estabilidade da margarina seja melhorada, é realizada também a utilização parcial de óleos cujo ponto de fusão foi modificado para torná-los mais consistentes, dependendo do produto final desejado, além da utilização de alguns aditivos, como a lecitina de soja e outros produtos de origem vegetal, que conferem maior consistência à emulsão (BANNWART, 2009). A preferência pela interesterificação como alternativa à hidrogenação para a modificação da base gordurosa é devida à tendência atual em diminuir a presença de ácidos graxos trans (GIOIELLI, 2002; LICHTENSTEIN *et al.*, 2003).

A Figura 1 apresenta esquematicamente um fluxo de processo típico para produção de margarina.

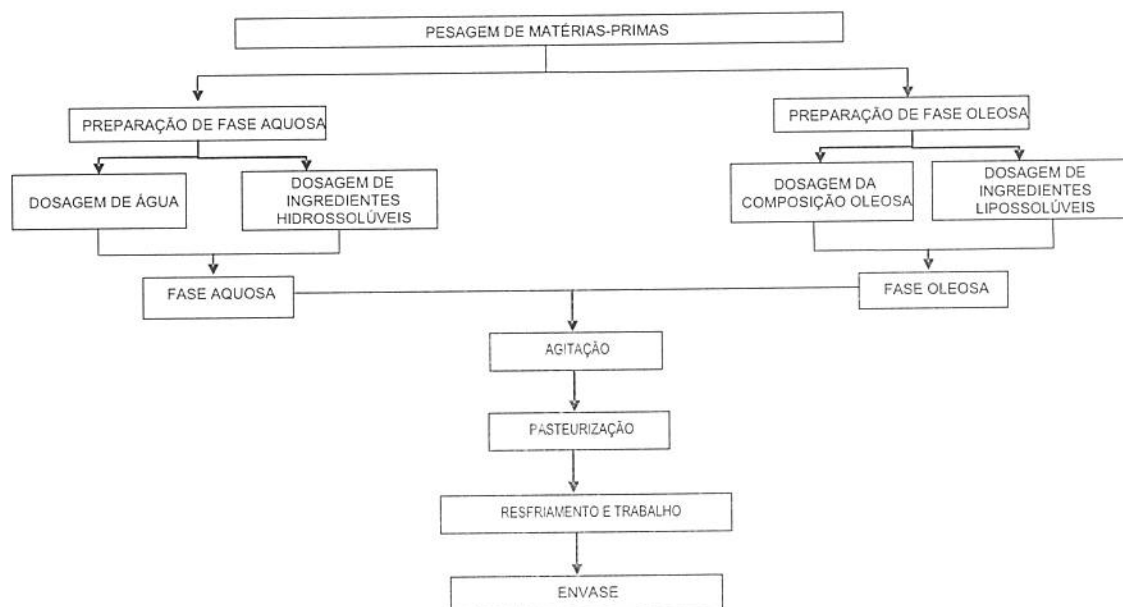


Figura 1: Fluxo de processo para margarinas (Fontes: HUI, 1996b; MARGARINE, 2006).

Segundo a legislação brasileira, de acordo com a Portaria 372 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, entende-se por margarina o produto gorduroso em emulsão estável com leite ou seus constituintes ou derivados, e outros ingredientes, destinado à alimentação humana com cheiro e sabor característico. A gordura láctea, quando presente, não deverá exceder a 3% (m/m) do teor de lipídios totais (BRASIL, 1997). O creme vegetal é comercializado juntamente com a margarina, porém o consumidor não tem consciência de que há diferença entre os dois produtos. De acordo com a Resolução RDC nº 270 da ANVISA, creme vegetal é o produto em forma de emulsão plástica ou fluida, constituído principalmente de água e óleo vegetal e ou gordura vegetal, podendo ser adicionado de outro(s) ingrediente(s) (BRASIL, 2005).

Atualmente, é comum a comparação entre a margarina, incluindo os cremes vegetais, e a manteiga. O INMETRO (2009) através do Programa de Análises de Produtos, da Divisão de Educação para Qualidade, tem efetuado análises comparativas dos teores de colesterol e gordura saturada presentes em vários alimentos, divulgado periodicamente os resultados aos consumidores, contribuindo assim para que façam melhores escolhas e torná-los mais conscientes de seus direitos e responsabilidades. Dessa forma, os resultados de 5 marcas de manteiga x 5 marcas de margarina expressos pela média são apresentados no gráfico 1 (INMETRO, 2009). De acordo com estes resultados, as manteigas apresentaram altos teores de colesterol e gordura saturada. A média de consumo diário desse produto é de 20 g, o que representa em valores, metade do que podemos consumir de gordura saturada diariamente. A margarina obteve, na média, menos da metade do valor de

gordura saturada das manteigas, o que indica uma vantagem para quem possui problemas com alta taxa de colesterol. Uma outra vantagem é que, por ser um produto de origem vegetal, a margarina não contém colesterol.

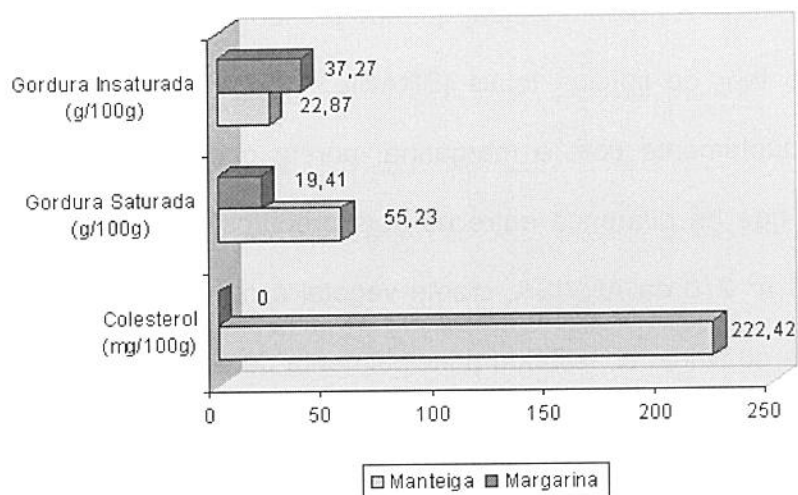


Gráfico 1: Resultados de gordura e colesterol em manteiga e margarina (Fonte: INMETRO, 2009).

Evidências na literatura demonstram que a dieta rica em ácidos graxos saturados está diretamente relacionada a riscos cardiovasculares (WHO, 2009) e algumas organizações recomendam, para a prevenção de doenças cardiovasculares, a substituição de gorduras saturadas por gorduras insaturadas de origem vegetal como as margarinas “softs” e os cremes vegetais (NHLBI, 2009; AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2009; NAKAZATU, 2009; MAHAN & SCOTT-STUMP, 2005).

Outros benefícios das margarinas e cremes vegetais, além da ausência de colesterol e baixas concentrações de gordura saturada comparada à manteiga, é o fornecimento de gorduras poliinsaturadas (ômega 6 e 3, ácidos linoléico e linolênico), ou seja, ácidos graxos essenciais, que nosso organismo

não consegue sintetizar, mas que são fundamentais ao seu bom funcionamento e são obtidos através da dieta. Geralmente, estes produtos são fontes das vitaminas lipossolúveis: vitamina A, importante para o sistema imunitário, vitamina D, essencial para absorção de cálcio e vitamina E, de forte poder antioxidante. Podem, também, serem fontes de vitaminas do complexo B, tais como B₁ (tiamina), B₃ (niacina), B₅ (ácido pantotênico) e B₆ (piridoxina), que estão relacionadas com o aproveitamento dos macroconstituintes dos alimentos (gordura, proteína e carboidratos), auxiliando na obtenção de energia para o organismo.

Atualmente, a redução de gordura para obtenção de alimentos “light” pode conduzir à falta de ácidos graxos na alimentação e, portanto, o pouco que é ingerido, deveria conter vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₅, B₆) para catalisar sua absorção. O mesmo ocorre para proteínas e carboidratos (LEITE, 2006).

As margarinas e cremes vegetais também podem ser fontes das vitaminas B₆ (piridoxina), B₉ (ácido fólico) e B₁₂ (cianocobalamina), que podem ajudar a combater doenças do coração e alguns tipos de câncer. Rimm *et al.* (1998) relatam que o risco de doenças coronárias foi reduzido com o consumo regular de vitaminas B₆ e B₉ em mulheres e Zhang *et al.* (2003) relatam uma associação inversa altamente significativa entre os níveis plasmáticos de folatos e vitamina B₁₂ com o câncer de mama. No entanto, ainda é muito cedo para afirmar se há meramente uma associação entre as doses de folatos, vitamina B₆ e vitamina B₁₂ e doenças do coração e câncer, ou se altas doses previnem estas doenças crônicas (HARVARD, 2009). Tem sido reportado que o ácido fólico, juntamente com a vitamina B₆ e vitamina B₁₂, diminui os níveis

plasmáticos de homocisteína e que esta última está inversamente associada com o desenvolvimento de doenças isquêmicas do coração. Porém investigação adicional dessas relações é relevante para a adequação das práticas de fortificação atuais (FAO, 2010). Saposnisk *et al.* (2009) relatam que a diminuição da homocisteína com ácido fólico e as vitaminas B₆ e B₁₂ reduziram o risco de todos os derrames cerebrais (“strokes”), porém não a severidade ou inabilidade. Tucker *et al.* (2005) observaram que baixas concentrações de vitaminas B (B₆, B₉ e B₁₂) e altas concentrações de homocisteína prognosticaram declínio cognitivo em homens de idade avançada.

Um estudo foi realizado para verificar a absorção do ácido fólico a partir de uma margarina fortificada com esta vitamina e os resultados obtidos comprovam que a absorção foi efetiva (PENTIEVA *et al.*, 2003). Em outro estudo, demonstrou-se que o consumo de margarina fortificada com as vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico promoveu um significativo aumento das concentrações plasmáticas dessas vitaminas e uma significativa redução do nível de homocisteína no plasma (van VLIET *et al.*, 2007).

A margarina faz parte dos 22 produtos de alimentação que constituem a Cesta Básica elaborada com base no consumo de uma família paulistana padrão, com renda média de 10,3 salários mínimos e composta de 4 pessoas que comprem em supermercados alimentos, material de limpeza doméstica e higiene pessoal. Este perfil foi traçado a partir de dados obtidos da Pesquisa de Orçamento Familiar de São Paulo (POF) e das Pesquisas de Consumo Alimentar no Município de São Paulo (DIEESE - Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Sócio-Econômicos). Na Cesta Básica, a quantidade de

margarina é de 4 unidades de potes de 250g e participa de 1,71% em média do valor total da cesta (PROCON SP, 2009).

O mercado brasileiro de margarinas e cremes vegetais, registrado no ano 2000, foi de cerca de 400 mil toneladas/ano ou R\$ 1 bilhão em faturamento (DANTAS, 2000). No ano de 2003, foi de 458 mil toneladas/ano (IMACE, 2009), chegando em 2007 e 2008, respectivamente, a 690 e 738 mil toneladas/ano ou R\$1,5 e 1,7 bilhões, representando um volume per capita de 1,75 Kg/ano¹, indicando que se trata de um mercado que ainda está em crescimento, visto que o consumo per capita de margarina e “fat spreads” na Europa é de cerca de 5 Kg/ano (IMACE, 2009). A taxa de crescimento regional observada em 2006 - 2007 para a América Latina, considerando os produtos de manteiga/substitutos de manteiga, foi de 32% (ACNIELSEN, 2008).

O preço de uma margarina comum comparada a um creme vegetal com adição de vitaminas do complexo B teve um aumento de 25% para creme vegetal contendo as vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ e um aumento de 35 a 50% para o creme vegetal contendo as vitaminas B₆, B₉ e B₁₂, o que indica que o custo de uma margarina contendo essas vitaminas do complexo B ainda seria acessível a grupos de consumidores interessados na aquisição deste produto.

A partir da descoberta e síntese das vitaminas nos anos 30, sua adição aos alimentos visando à melhoria de seu conteúdo nutricional, é uma prática que vem sendo adotada com o objetivo de corrigir ou prevenir deficiências nutricionais em populações, como também para restaurar nutrientes perdidos durante o processamento de alimentos (MEJIA, 2009; WATSON, 1981).

¹Dados obtidos resultante da pesquisa realizada em 14 de julho de 2009 através do programa “Retail Measurement Services” – Tendências 2007 e 2008 através de serviço prestado pela ACNIELSEN.

De acordo com a Portaria nº 31 do Ministério da Saúde, considera-se alimento fortificado/ enriquecido ou simplesmente adicionado de nutrientes todo alimento ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais, contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo e ou prevenir ou corrigir deficiência(s) demonstrada(s) em um ou mais nutrientes na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma (BRASIL, 1998). Deste modo, a fortificação de alimentos é um meio de melhorar a condição nutricional de uma população (ou potencialmente uma sub-população), sendo que considerações técnicas e de segurança devem ser levadas em conta quando decisões forem tomadas sobre quais alimentos a serem fortificados e a que nível.

Alguns produtos são fortificados por lei, (por exemplo, a fortificação da margarina com a vitamina A), e outros voluntariamente (por exemplo, o cálcio adicionado a algumas bebidas à base de soja, vendidas como um substituto para o leite de vaca). Por outro lado, a fortificação de alimentos também pode ser vista como uma estratégia de marketing, especialmente quando os consumidores têm certo conhecimento dos benefícios dos nutrientes que tenham sido adicionados (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 2009).

A margarina é um ótimo veículo alimentício para ser fortificado com vitamina A, que já é adicionada a este tipo de produto há bastante tempo. Esse processo foi utilizado inicialmente na Dinamarca, em 1920 (ZANCUL, 2004). A margarina é fortificada com vitamina A em muitos países para repor esta vitamina que é perdida a partir da dieta quando a manteiga é substituída pela margarina. A vitamina D é adicionada à margarina em níveis mais altos que os encontrados na manteiga, como uma medida de saúde pública, visto que um

aumento é considerado necessário para a população como um todo (BALL, 2006). O enriquecimento da margarina com vitamina D é obrigatório no Reino Unido, porém no Brasil, assim como a vitamina E, trata-se de um enriquecimento voluntário.

Muitos alimentos básicos têm sido fortificados, como produtos a base de cereais (por exemplo, farinhas e cereais matinais) e leite (por exemplo, leite com baixos teores de gordura é fortificado com as vitaminas A, D e cálcio). Atualmente outros alimentos como açúcar, óleo e sal são também fortificados em algumas partes do mundo, no entanto para alguns alimentos específicos como bebidas alcoólicas, a fortificação não é permitida. Nos EUA, a fortificação de cereais e grãos com ácido fólico teve início em 1996 e, desde janeiro de 1998, todos os cereais e produtos de grãos são fortificados com 140 µg de ácido fólico/100g. No Reino Unido, a fortificação de alimentos com ácido fólico é ainda voluntária (BALL, 2006), porém é obrigatória a adição de ferro, tiamina e niacina em farinhas, exceto nas versões integrais (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 2009). Já no Brasil, é obrigatório o enriquecimento com ácido fólico (150 µg/100 g) e ferro (4,2 mg/100g) em farinha de trigo e milho (BRASIL, 2002).

No estudo da carência de nutrientes e sua tabulação realizados em relação aos alimentos ingeridos, efetuado por Enes & Silva (2006), a partir do levantamento feito pelo IBGE (2004) nos domicílios brasileiros, concluiu-se que os valores médios recomendados não foram alcançados para o expressivo rol dos micronutrientes com exceção das vitaminas B₁ e B₂, e dos minerais manganês e ferro. Este resultado desperta preocupação, uma vez que o consumo adequado dos referidos nutrientes tem sido associado à prevenção

de inúmeras enfermidades crônicas, além de serem considerados elementos essenciais à manutenção das diversas funções metabólicas do organismo. A deficiência em micronutrientes pode resultar em crescimento e desenvolvimento cognitivo prejudicados, resposta imune deficiente, perda de energia e produtividade, e aumento da morbidez e mortalidade (ROWE *et al.*, 2009). Dessa forma, é importante o consumo de produtos ou outras fontes que contribuam com o fornecimento destes micronutrientes e vitaminas.

A fortificação de alimentos por vitaminas é uma ferramenta importante de que as empresas dispõem para aumentar o valor agregado a seus produtos, oferecendo um produto diferenciado ao consumidor frente a seus competidores. Entre os importantes controles necessários para a prática de enriquecimento dos alimentos visando atender a legislação vigente e a saúde do consumidor, se encontra o método de análise empregado para o controle de vitaminas no produto final.

O presente trabalho teve por objetivos desenvolver uma metodologia por CLAE para a determinação simultânea das vitaminas B₁, B₃, B₅, B₆, B₉ e B₁₂ em cremes vegetais enriquecidos e aplicá-la em produtos obtidos no mercado, avaliando o teor das vitaminas e a estimativa de sua estabilidade durante a vida de prateleira dos produtos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

VITAMINAS

Vitaminas são nutrientes orgânicos essenciais requeridos em quantidades muito pequenas para o metabolismo e crescimento normal, e bem estar físico. Muitas das vitaminas não são sintetizadas pelo organismo, ou apenas em quantidades insuficientes, e são principalmente obtidas através dos alimentos (SPITZER, 2007). As vitaminas, especialmente as hidrossolúveis, catalisam numerosas reações bioquímicas. Elas não são fontes diretas de energia, no entanto facilitam o metabolismo energético, tornando possíveis as numerosas transformações dos macronutrientes: carboidratos, proteínas e gorduras.

Podem ser classificadas de acordo com sua solubilidade em dois grupos: lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis, (vitamina C e as do complexo B). Devido à sua solubilidade em água, a maior parte das vitaminas hidrossolúveis não é armazenada em quantidades apreciáveis, tornando o seu consumo regular uma necessidade (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005; MAYES, 1994).

As vitaminas possuem composição química e funções biológicas diversas. São agentes essenciais ativos para manutenção das funções biológicas, podendo ocorrer na natureza como tal ou sob forma de precursores, as provitaminas (FRANCO, 1992).

Para várias vitaminas, um número de compostos quimicamente relacionados mostram a mesma atividade biológica, devido a tais compostos também serem convertidos ao mesmo metabólito ativo final ou terem

similaridade estrutural suficiente para possuir a mesma atividade. Diferentes compostos químicos que apresentam a mesma atividade biológica são coletivamente chamados de vitâmeros (BENDER, 2003). A Tabela 1 apresenta resumidamente as formas ativas das vitaminas e suas respectivas funções.

Tabela 1: Principais formas ativas e funções das vitaminas

Vitamina	Forma ativa (ou forma coenzimica)	Função
A	11-cis retinal, ácido retinóico e retinol	Mecanismo da visão e integridade epitelial
D	1,25-dihidroxi-colecalciferol	Metabolismo de Ca e P
E	α , β , γ , δ -tocoferol	Proteção contra oxidação dos lipídeos de membranas
K	2-metil-1,4-naftoquinona; 2-metil-3-fenil-1,4-naftoquinona;	Cofator em reações de carboxilação. Ativa em vários fatores sanguíneos
C	Ácido L-ascórbico e deidroascórbico	Coenzima - Hidroxilação da prolina e lisina na síntese do colágeno; Ação Antioxidante
Tiamina (B ₁)	TPP (tiamina pirofosfato)	Transferência de aldeídos. Metabolismo de carboidratos e aminoácidos
Riboflavina (B ₂)	FMN e FAD	Regula canal Cl ⁻ na condução do nervo
Niacina (B ₃)	NAD e NADP	Transferência de Hidrogênio
Ác. Pantotênico (B ₅)	Coenzima A	Coenzima em reações de oxido-redução
B ₆ (Piridoxina)	PLP (piridoxal fosfato)	Transferência de Hidreto
		Coenzima em reações de oxido-redução
		Regulação Ca intracelular
		Transferência de grupos acila
		Síntese e metabolismo ácidos graxos
		Transferência de grupos amino
		Coenzima p/ muitas enzimas envolvidas no metabolismo celular
		Atua no sistema imune
Biotina	Biocitina	Transferência de CO ₂
		Coenzima em reações de carboxilação na gluconeogênese, síntese de ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos e catabolismo de ácidos graxos
Ácido Fólico (B ₉)	Tetraidrofolato	Transferência de Carbono
		Síntese de purina e pirimidina
		Doa grupo metil à homocisteína para formação de metionina
B ₁₂	Metil cobalamina	Transferência de Metil
	Adenosil cobalamina	Reação de isomerização, desidrogenação e metilação (homocisteína); Ação metabolismo folato

FMN- flavina mononucleotídeo; FAD- flavina adenina dinucleotídeo; NAD- nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADP- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.

Fontes: LEHNINGHER *et al.* 1993; LEHNINGHER *et al.* 2006; BENDER 2003; MARZZOCO & TORRES 2007; BALL 2006; GREGORY 1996; PENTEADO 2003.

Na Tabela 2, são apresentadas de forma resumida algumas doenças relacionadas às carências de vitaminas.

Tabela 2: Carências de Vitaminas x Doenças

Vitamina	Doenças
A	Xeroftalmia, cegueira noturna, pele áspera e seca ou queratinização da pele
B ₁	Perda de apetite, fraqueza, irritabilidade e dificuldade p/ caminhar; dano do nervo periférico (beribéri) ou lesões do sistema nervoso central
B ₂	Feridas na boca e nariz, inchaço nos lábios e língua. Diminuição da resistência a doenças comuns. Dermatite seborréica.
Niacina (B ₃)	Disenterias graves, alterações mentais, psicose depressiva, dermatite foto-sensível (Pelagra)
B ₅	Lesões na pele e inibição do crescimento. Cansaço, problemas de coordenação motora, gastrintestinais e suprarenais. Dano do nervo periférico.
B ₆	Irritabilidade, insônia, depressão, dermatite e TPM. Desordens do metabolismo do aminoácido, convulsões.
B ₉	Má formação do tubo neural em fetos. Anemia megaloblástica
B ₁₂	Anemia perniciosa ou macrocítica
C	Escorbuto. Diminuição da resistência a infecções, cansaço em geral, dificuldades de restabelecimento pós-cirúrgico e gangrena
D	Raquitismo, deformações no peito, na coluna vertebral e na pélvis. Dentes fracos. Aumento de risco de osteoporose. Osteomalacia.
E	Dermatite e problemas na produção de hormônios sexuais. Disfunção neurológica séria (muito raro).
H	Perda de apetite, náuseas, dores musculares, anemia e dermatites. Metabolismo do carboidrato e gordura prejudicados
K	Hemorragias, que podem acontecer após longos períodos de tratamento com antibióticos. Dificuldade na coagulação do sangue

Fontes: LEITE, 2006; BENDER, 2003.

Tiamina (B₁)

A vitamina B₁, também chamada tiamina, aneurina e orizanina é largamente distribuída na natureza em animais e vegetais (BOBBIO & BOBBIO, 2003). Segundo Ball (2006) e Mayes (1994) todas as plantas e tecidos animais contêm tiamina, conseqüentemente a mesma está presente em todos alimentos naturais não processados. As fontes mais ricas são levedo e fígado, todavia, os grãos de cereais compreendem a fonte mais importante

desta vitamina na maioria das dietas dos seres humanos (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005). O conteúdo de tiamina em alguns alimentos é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Teor de Tiamina (mg/100g) em alguns alimentos

Alimentos	Tiamina (mg/100g)			
	*	**	***	****
Levedura em Pó	14,5			
Extrato de levedura			4,10	
Castanha do Pará	1,09		0,67	0,62 ^b
Carne de porco magra	0,95	1,00	0,98	0,81 ^c
Carne de vaca magra	0,23	0,07	0,10	0,08 ^d
Carneiro (sem gordura)		0,15	0,09	0,13 ^c
Carne de frango	0,08	0,10	0,14 (crua)	0,07 ^e
Fígado de Vaca	0,24		0,38 (frito)	
Atum	0,10		0,10	0,24 ^f ; 0,04 ^g
Bacalhau (cru)			0,04	0,09 ^h ; 0,02 ⁱ
Ervilha seca	0,91		0,70	
Ervilhas frescas	0,35	0,35		0,27
Farinha de Trigo integral	0,66	0,45	0,47 ^a	0,45
Farinha de trigo branca	0,06		0,31 ^a	0,12
Pão de farinha integral		0,25	0,25	0,35
Centeio		0,40	0,40	0,32
Arroz integral	0,36	0,50	0,59	0,41 ^j ; 0,10 ^k
Arroz polido	0,09	0,02	0,10	0,16 ^l
Farelo de Arroz		2,50		2,75
Feijão branco seco	0,60			0,44 ^f ; 0,10 ^m
Feijão tipo vermelho seco			0,61	0,53 ^r ; 0,13 ^m
Amendoim			1,14	0,64 ^f ; 0,44 ⁿ
Soja	0,66		0,61	0,87 ^f ; 0,16 ^o
Ovos inteiros	0,10	0,10	0,09	0,04 ^p ; 0,08 ^q
Leite de vaca integral (cru)	0,04	0,05		
Leite de vaca integral pasteurizado	0,01		0,03	0,04 ^r
Brócolis	0,12		0,10	0,07 ^s
Repolho	0,11		0,15	0,06 ^s
Agrião		0,1	0,16	0,09 ^s
Laranja	0,09		0,11	0,09 ^s
Suco de Laranja (s/ açúcar)			0,08	0,09 ^s ; 0,04 ^t
Banana	0,09		0,04	0,03 ^s
Maçã (crua)			0,03	0,02 ^u
Tomates		0,06	0,09	0,04 ^s
Batatas		0,10	0,21 ^s	0,08 ^s ; 0,10 ^v

Fontes: * FRANCO, 1992; **BOBBIO & BOBBIO, 2003; *** FOOD STANDARDS AGENCY, 2002; **** USDA, 2009.

^a Resultados encontrados em farinhas fortificadas; ^b Seca, não branqueadas; ^c lombo magro cru; ^d carne magra cozida; ^e carne "light" crua; ^f fresco, cru "bluefin"; ^g "light", cozido em água, sólidos drenados; ^h Atlântico, cozido, sólidos e líquidos; ⁱ Pacífico, cozido; ^j grãos médios, cru; ^k grãos médios, cozido; ^l branco, grãos longos, regular, cozido; ^m feijão cozido; ⁿ todos os tipos, assado; ^o madura, cozida; ^p ovo inteiro, fresco, cru; ^q ovo cozido, frito; ^r leite fluido, com 2% de gordura, e vitaminas A e D adicionados; ^s cru ou crua; ^t cozido; ^u crua, sem pele; ^v sem pele, cozida, polpa.

A tiamina como difosfato de tiamina (também conhecida como pirofosfato de tiamina) atua como coenzima no metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Desta forma, há um aumento do requerimento para tiamina em situações em que o metabolismo é elevado, por exemplo, durante alta atividade muscular, gravidez e lactação, febre prolongada, e hipertireoidismo (BALL, 2006).

A tiamina apresenta estrutura química formada por duas moléculas, uma pirimidina substituída e um anel tiazol ligados por um metileno (Figura 2). É uma amina quaternária e existe como um cátion monovalente ou divalente, dependendo do pH da solução. Três formas fosforiladas da tiamina ocorrem na natureza. Em tecidos vivos, a forma predominante é a coenzima, tiamina difosfato (TDP) (Figura 2). Pequenas quantidades de ésteres monofosfato (TMP) e trifosfato (TTP) também ocorrem em tecidos animais (BALL, 2006).

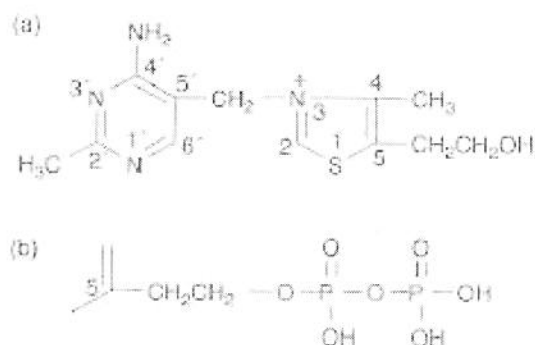


Figura 2: Estrutura química da Tiamina (a) e TDP(b). (Fonte: BALL, 2006).

A forma comercial hidrocloreto de tiamina é um pó branco ou quase branco, cristalino. É bastante solúvel em água, pouco solúvel em etanol 95% e absoluto, e insolúvel em solventes como clorofórmio e éter (BOBBIO &

BOBBIO, 2003; BALL, 2006). Sua fórmula é $C_{12}H_{17}H_4OSCl.HCl$, peso molecular 337,3; é higroscópico e usualmente existe como semihidratado contendo 4% de água. A outra forma da vitamina, o nitrato de tiamina é praticamente não higroscópico e é especialmente recomendada para enriquecimento de misturas de farinhas (BALL, 2006; BOBBIO & BOBBIO, 2003). Apresenta-se como pó cristalino branco ou quase branco. Ao contrário da forma hidrocloreto, é pouco solúvel em água (1:44). É também pouco solúvel em álcool e em clorofórmio (MARTINDALE, 1996). Em tecidos animais, está presente principalmente na forma fosforilada. Em produtos de origem vegetal, a vitamina B₁ ocorre predominantemente na forma livre, não fosforilada (BIANCHINI-PONTUSCHKA & PENTEADO, 2003; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

A deficiência da tiamina é caracterizada por anorexia e perda de peso, assim como sintomas cardíacos e neurológicos, e resulta eventualmente em beribéri, cujos sintomas englobam confusão mental, perda muscular, edema (beribéri úmido), neuropatia periférica, taquicardia e cardiomegalia (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

Na Ásia, no século XIX e início do século XX, o beribéri causou a morte de milhares de pessoas que tinham como dieta básica quase exclusivamente o arroz branco polido. A cutícula do arroz, que é removida no processo de polimento, contém quase toda a tiamina do arroz (LEHNINGER, 1984). Este problema ainda ocorre em partes rurais do sudeste da Ásia (SPITZER, 2007).

A deficiência de tiamina ocorre devido à ingestão insuficiente, aumento dos requerimentos como na gravidez, lactação, dieta rica em carboidrato e

infecções parasíticas crônicas. Esta deficiência tem sido encontrada em indivíduos subnutridos, pacientes com doenças crônicas, anorexia e em casos de alcoolismo crônico (SEBASTIAN & JATIVA, 1998; HALSTED, 1993). Algumas pessoas com idade mais avançada estão em risco de deficiência de tiamina, tendo em vista sua dieta desequilibrada e uso a longo prazo de diuréticos. Os indivíduos afetados apresentam um tipo de encefalopatia chamado síndrome de Wernicke-Korsakoff, cujos sintomas variam de confusão leve a coma (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005)

Sinais de toxicidade são evidentes dependendo da dose e/ou via de administração. Em humanos, doses orais elevadas não são deletérias, pois o excesso é eliminado rapidamente na urina. Altas doses via parenteral ou intravenosa podem ser tóxicas, levando até a morte, como já observado em animais (BIANCHINI-PONTUSCHKA & PENTEADO, 2003).

Niacina (B₃)

A niacina é composta pelo ácido nicotínico (3-ácido carboxílico piridina: C₆H₅O₂ N; PM 123,11) e nicotinamida (3-carboxamida piridina: C₆H₆ON; PM 122,12) (Figura 3), os quais têm igual bioatividade na forma livre. Em tecidos vivos, a nicotinamida é a porção ativa das coenzimas NAD (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) e NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato) (BALL, 2006; BENDER, 2003). As coenzimas funcionam como carreadores de próton e elétron em uma ampla variedade de reações de óxido-redução. Exemplos são reações relativas à liberação de energia a partir de carboidratos,

ácidos graxos e aminoácidos, e à síntese de aminoácidos, ácidos graxos e pentoses (BALL, 2006).

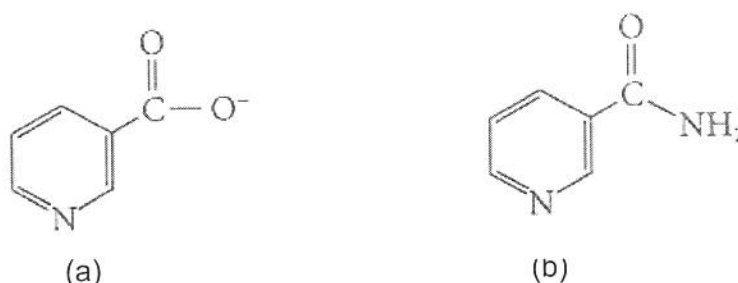


Figura 3: Estrutura química dos compostos de niacina: ácido nicotínico (a) e nicotinamida (b) (Fonte: LEHNINGER 2006).

A niacina pode ser sintetizada *in vivo* a partir do aminoácido essencial L-triptofano. Sua necessidade no organismo depende da quantidade deste aminoácido na dieta e da eficiência da conversão.

Nos alimentos, a niacina está presente como ácido nicotínico (maioria das plantas) e nicotinamida (tecidos animais), ocorrendo predominantemente na forma ligada a outros compostos (COMBS JR., 1998; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005). Muitos alimentos derivados dos vegetais, particularmente grãos, contêm niacina em complexos covalentemente ligados com peptídeos pequenos e carboidratos que não são liberados durante a digestão. Estas formas, chamadas de niacitina, não são biologicamente ativas, mas podem se tornar biodisponíveis por hidrólise alcalina (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

Os extratos de leveduras são fontes excepcionalmente ricas em niacina, enquanto as carnes, vísceras e pescados constituem fontes ricas. Frutas e vegetais fornecem quantidades úteis, dependendo da quantidade

ingerida. Os teores de niacina em vários alimentos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Teor de Niacina (mg/100g) em alguns alimentos

Alimentos	Niacina (mg/100g)					Total Niacina Equivalente
	*	**	***	Niacina	**** Niacina Equivalente a partir do Triptofano ^a	
Levedura em pó	57,0					
Levedura, extrato		58,0	97,0	64,0	9,0	73,0
Castanha do Pará			0,3	0,3	3	3,3
Carne de porco	5,1	0,8-5,6	4,9 ^b	6,9	4,5	11,4
Carne bovina	0,4	4,6	6,7 ^c	5,0	4,7	9,7
Carne de frango	9,0	4,7-14,7	10,6 ^c	7,8	4,3	12,1
Carne cordeiro			6,5 ^b	5,4	3,9	9,3
Fígado bovino	16,7	13,4	13,2	13,4	4,5	17,9
Fígado de cordeiro, frito			16,7	19,9	4,9	24,8
Atum	10,0	13,3	12,4 ^d	16,1	5,1	21,2
Bacalhau cru			2,1	2,4	3,4	5,8
Ervilha seca	5,6			3,2	3,5	6,7
Ervilha crua		0,9-25,0	2,1	2,5	1,1	3,6
Farinha de Trigo integral	4,0		6,4	5,7 ^e	2,5	8,2
Farinha de trigo branca	0,8		1,3	1,7 ^e	1,9	3,6
Arroz integral	5,2	4,7	4,3	5,3	1,5	6,8
Arroz	0,8	1,6	1,6 ^f ; 0,4 ^g	0,9 ^h	0,6	1,5
Feijão branco	0,7 ⁱ		0,5 ^j ; 0,1 ^k			
Feijão		0,5-2,4		0,9	0,5	1,4
Feijão tipo vermelho			2,1 ^j ; 0,6 ^k	2,1 ^{ij}	3,5	5,6
Soja	2,2	1,4	1,7 ^j ; 1,3 ^k	2,2 ^{ij}	5,7	7,9
Amendoim		17,2	13,5 ^l	13,8	5,5	19,3
Ovos inteiros	0,1	0,1	0,1	0,1	6,8	6,9
Leite de vaca integral cru	0,2	0,2				
Leite de vaca integral pasteurizado	0,2		0,1 ^m	0,2	0,6	0,8
Queijo		1,2	0,1 ^{n o}	0,1	6,8	6,9 ⁿ
Espinafre		0,6	0,7 ^p ; 0,5 ^q	1,2	0,7	1,9
Brócolis	0,4	0,9	0,6 ^p	0,9	0,8	1,7 ^p
Repolho	0,4	0,3	0,2 ^p	0,5	0,3	0,8
Batata			0,9 ^q	0,6	0,5	1,1 ^p
Laranja	0,2	0,4	0,3	0,4	0,1	0,5
Suco de laranja			0,4 ^p ; 0,2 ^q	0,2	0,1	0,3
Maçã			0,1	0,1	0,1	0,2
Banana	0,8	0,7	0,7	0,7	0,2	0,9
Café solúvel, em pó			28,2	24,8	2,9	27,7
Café solúvel preparado			0,2 ^r	0,2	0,1	0,3

Fontes: * FRANCO, 1992; **COMBS JR. 1998; *** USDA, 2009; **** FOOD STANDARDS AGENCY 2002.

^a Niacina equivalente = mg triptofano/60; ^b Lombo, magro; ^c carne magra crua; ^d "light", cozido em óleo, sólidos drenado; ^e farinha fortificada; ^f arroz branco, grãos longos, regular, cru; ^g arroz branco, grãos longos, regular, cozido; ^h fácil cozimento, cozido; ⁱ seco ou seca; ^j cru; ^k feijão cozido; ^l soja verde cozida; ^m amendoim assado; ⁿ leite fluido, com 2% de gordura, e vitaminas A e D adicionados; ^o queijo cheddar; ^p queijo mussarela; ^q in natura; ^r café solúvel preparado com água.

A deficiência em niacina conduz à pelagra, doença nutricional endêmica entre as comunidades que sobrevivem à base de cereais como milho e sorgo (JACOB & SWENDSEID, 1991). A doença é diagnosticada nos estágios iniciais por dermatites semelhantes a queimaduras solares e pela sensibilidade da pele à exposição da luz. Pelagra mais adiantada é também acompanhada por demência ou psicose depressiva, e pode haver diarreia (BENDER, 2003). A resposta à terapia com nicotinamida é rápida e dramática: a pelagra não tratada resulta eventualmente em morte (BALL, 2006).

Doses elevadas de ácido nicotínico causam liberação de histamina vasodilatadora (rubor nas faces). O uso de altas doses por longos períodos causa irritação intestinal, possíveis danos ao fígado e outros efeitos adversos (McCORMICK, 2000).

Ácido Pantotênico (B₅)

O ácido pantotênico, também conhecido como vitamina B₅, tem importância metabólica por ser parte da coenzima A (CoA) e da proteína carreadora de grupos acila (ACP). A CoA e a ACP funcionam metabolicamente como carreadores do grupo acil. A CoA é crítica na formação de acetil-CoA, que condensa o oxaloacetato e entra no ciclo de TCA para liberar energia. Ela também é o composto dos primeiros passos da síntese de ácidos graxos ou colesterol, ou na acetilação de álcoois, aminas e aminoácidos; além de ativar os ácidos graxos antes de sua incorporação em triglicerídeos e atua como doador acil para proteínas. A ACP é um componente do complexo

multienzimático ácido graxo sintetase, que é necessário para a síntese de ácidos graxos (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

O ácido pantotênico (Figura 4) é composto por um derivado do ácido butírico, ligado por uma ligação peptídica ao aminoácido β -alanina e tem o seu nome sistemático d (+) – N- (2,4-dihidróxi-3,3 dimetil-1- oxobutil)- β -alanina, cuja fórmula estrutural é $C_9H_{17}O_5N$ (BOBBIO & BOBBIO, 2003; GREGORY, 1996).

A fórmula é opticamente ativa, mas somente o enantiômero d (+) ocorre na natureza. Devido a seu alto grau de higroscopicidade, para suplemento alimentar, o d-pantotenato é utilizado. Em produtos farmacêuticos líquidos, o pantotenol é amplamente usado, sendo convertido à vitamina B₅ in vivo (BALL, 2006).

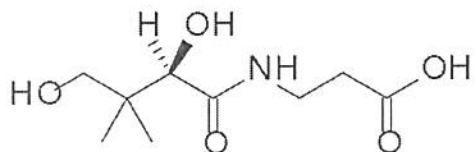


Figura 4: Estrutura do ácido pantotênico (Fonte: WIKIPEDIA, 2009).

O ácido pantotênico atua como um antioxidante e auxilia no funcionamento dos linfócitos B, células responsáveis pela produção de anticorpos, sendo, portanto fundamental para a defesa celular (TOLONEN, 1995). Como parte da coenzima A, o ácido pantotênico, apresenta função fundamental no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, conseqüentemente, é importante para a manutenção e reparo de todas as

células e tecidos. A coenzima A também está envolvida na síntese de lipídios essenciais, esteróis, hormônios, neurotransmissores, porfirina, no metabolismo de drogas e na desintoxicação alcoólica (SPITZER, 2007).

O ácido pantotênico é amplamente distribuído em alimentos de origens animal e vegetal. As melhores fontes são: vísceras (fígado e coração), ovo e levedura. A geléia real produzida por abelhas apresenta níveis altos de ácido pantotênico (BALL, 2006). Na Tabela 5, está apresentado o conteúdo de ácido pantotênico de alguns alimentos.

Tabela 5: Teor de Ácido Pantotênico (mg/100g) em alguns alimentos

Fontes	Ácido Pantotênico (mg/100g)					Total
	*	**	***	Livre	Livre e ligado em CoA	
Fígado de vaca	7,3	5,91	7,17 ^a			
Fígado de porco	6,8	-		3,07	6,3	7,3
Fígado de frango	-	6,10	6,23			
Coração de vaca	2,78	2,78				
Coração de frango	-	2,56				
Leite em pó integral	2,70	2,00	2,27			
Leite em pó fortificado				4,63	5,4	5,71
Leite de vaca	0,35	0,31	0,36 ^b			
Leite humano	0,21	0,22				
Arroz integral	1,70	1,49	1,49			
Feijão francês				0,18	0,2	0,25
Feijão preto cozido			0,24			
Lentilha			2,14 ^c	1,06	1,47	1,77
Ervilha			0,60 ^d	0,2	0,44	0,5
Ovo de galinha	1,60	1,20	1,44	1,78	2,23	2,3
Flocos de aveia	1,09	-				
Germe de trigo	1,00	-	2,26			
Levedura				2,41	7,3	8
Nozes	0,82	-	0,86 ^e			
Atum	0,66	1,05	0,37 ^f			
Salmão			0,56 ^g	1,12	1,19	1,53
Carne de vaca	0,58	-	0,66			
Carne de porco	0,53	0,56	0,49			
Carne de frango			1,18	1,02	1,3	1,51
Cenoura	0,27	0,30	0,27	0,345	0,36	0,39
Batata	0,40	0,38	0,51 ^h			
Espinafre			0,07	0,08	0,11	0,113
Abacate			0,93 ⁱ	0,82	0,84	0,89

Fontes: *GUILLAND & LEQUEU 1995; **PHILIPPI 2001; *** USDA, 2009; ****PAKIN *et al.* 2004.

^a Sub-produtos de carne de vaca crus, incluindo fígado; ^b leite fluido, com 2% de gordura, e vitaminas A e D adicionados; ^c Lentilha crua; ^d Ervilha seca, madura, cozida; ^e Noz-pecã; ^f Atum cozido em óleo; ^g Rosa, cozido, sólidos drenado com espinha; ^h Batata cozida, sem pele; ⁱ Abacate Flórida-EUA.

A deficiência do ácido pantotênico está associada a distúrbios metabólicos e energéticos em seres humanos (ALMEIDA-MURADIAN, 2003; MITTERMAYR *et al.*, 2004; OTTAWAY, 1993). Como esta vitamina é amplamente distribuída nos alimentos, sua deficiência é rara, sendo observada apenas em pacientes muito desnutridos (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005; BALL, 2006). Os principais efeitos da deficiência do ácido pantotênico estão apresentados na Tabela 6.

Não há evidências de que doses terapêuticas (10-100 mg) produzam efeitos nocivos. Até mesmo com doses mais altas (10 a 20 g do seu sal de cálcio), o único efeito colateral reportado foi a ocorrência de diarreia (BALL, 2006).

Tabela 6: Efeitos da deficiência do ácido pantotênico:

Sinais moderados	Sinais graves
Diminuição do consumo alimentar	Desordens do sistema nervoso
Redução no crescimento e reprodução	Desidratação
Lesões na pele	Necrose hemorrágica do córtex
Problemas gastrointestinais	Paralisia
Dores de cabeça, cansaço e náuseas	Diminuição da produção de anticorpos
Parestesia das extremidades	Morte súbita

Fontes: BOBBIO & BOBBIO, 2003; GUILLAND & LEQUEU, 1995; TOLONEN, 1995; SMITH & SONG, 1996.

Piridoxina (B₆)

Vitamina B₆ é o termo genérico para o grupo 2-metil-3-hidroxi-5-hidroximetilpiridinas, apresentando a atividade da piridoxina. As várias formas da vitamina B₆ diferem entre si quanto ao grupo substituinte no carbono da posição 4, como mostrado na figura 5.

Para a piridoxina ou piridoxol (PN), o substituinte é um álcool, para o piridoxal (PL) é um aldeído e a para piridoxamina (PM) é uma amina. Estas três formas básicas podem ser fosforiladas a piridoxina-5'-fosfato (PNP), o piridoxal-5-fosfato (PLP) e a piridoxamina-5'fosfato (PMP). A vitamina B₆ na forma de PLP, e menos como PMP, funciona como uma coenzima em cerca de 100 reações enzimáticas envolvendo o metabolismo de aminoácidos, carboidratos, neurotransmissores e lipídeos. Todas as formas mencionadas possuem atividade vitamínica porque elas são convertidas in vivo para estas coenzimas. (GREGORY, 1996).

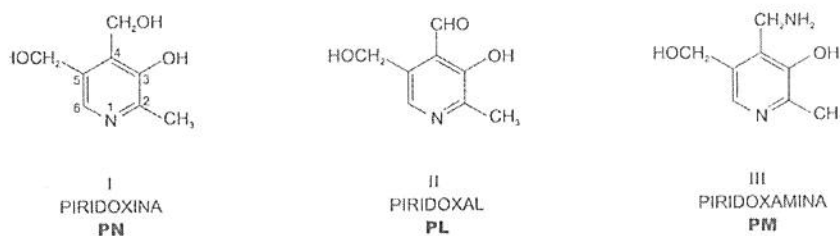


Figura 5: Estrutura dos homólogos da vitamina B₆. (Fonte: PENTEADO, 2003).

Comercialmente está disponível o hidrocloreto de piridoxina (PN.HCl), que é a forma empregada no enriquecimento de alimentos. Constitui um pó branco ou quase branco, cristalino. É solúvel em água (1g em 5 mL), pouco solúvel em etanol (1g em 100 mL), praticamente insolúvel em clorofórmio e éter (BALL, 2006; BOBBIO & BOBBIO, 2003).

Teores relativamente altos de vitamina B₆ são encontrados em extrato de levedura, trigo integral, fígado e carne de frango. Outras fontes importantes incluem cereais integrais, castanhas e rins. Leite, ovos e frutas constituem

fontes com concentrações relativamente baixas. O conteúdo de vitamina B₆ em alguns alimentos é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Teor de Vitamina B₆ (mg/100g) em alguns alimentos

Alimentos	Vitamina B ₆ (mg/100g)					
	Vitamina B ₆ ¹	Vitamina B ₆ ²	PL	PN	PM	PMP Total
Maçã	0,06	0,041 ^b	0,015	0,043	0,004	0,06 ³
Banana	0,29	0,367	0,071	0,262	0,280	0,57 ³
Suco de laranja s/ açúcar	0,07	0,040				
Brócolis	0,14 ^a	0,175 ^a				
Couve de bruxelas			0,156	0,299	0,042	0,43 ³
Couve-flor	0,28 ^a	0,184 ^a	0,063	0,089	0,029	0,18 ³
Couve	0,05 ^a	0,124 ^a	0,033	0,036	0,038	0,10 ³
Espinafre	0,09 ^c	0,195 ^a	0,038	0,027	0,037	0,10 ³
Batata	0,44 ^a	0,269 ^c	0,05	0,23	0,035	0,31 ³
Ervilha	0,12 ^a	0,169				0,1
Ervilha, seca	0,53					
Amendoim	0,59	0,257 ^d				
Soja	0,38 ^a	0,234 ^f				
Lentilha	0,93 ^e	0,178 ^f				
Feijão vermelho	0,40 ^e	0,120 ^f				
Farinha de milho		0,37	0,034	0,217	0,051	0,29 ³
Arroz		0,093 ^c	0,038	0,093	0,042	0,17 ³
Escalope	0,65					0,722 ⁴
Levedura						2,78 ⁴
Extrato de Levedura	1,60	1,30				
Farinha de trigo	0,15	0,044				0,136 ⁴
Farinha de trigo integral	0,50	0,341				
Carne de vaca magra	0,53	0,652				
Carne de cordeiro magra	0,30	0,170 ^g				
Carne de porco magra	0,54	0,470 ^g				
Carne de galinha	0,38	0,540 ^h				
Fígado de cordeiro	0,53 ⁱ	0,900 ^j				
Carne de porco, embutida	0,21 ^k	0,300 ^k				0,192 ⁵
Carne de vaca, embutida		0,350 ^l				0,211 ⁵
Carne de peru, embutida		0,230 ^m				0,169 ⁵
Lombo canadense cru						0,505 ⁶
Leite em pó		0,361 ⁿ		0,039 ⁷		
Leite de vaca	0,06 ^o	0,038 ^p				
Queijo Cheddar	0,15	0,074				
Ovo de galinha	0,12	0,143				
Bacalhau	0,18 ^a	0,245 ^q				
Biscoito	0,37 ^r	0,036 ^s				1,2 ^{8 t}

PL: piridoxal; PN: piridoxina; PM: piridoxamina; PMP: piridoxamina fosfato.

Fontes: ¹ FOOD STANDARDS AGENCY 2002; ² USDA, 2009; ³ SCHOONHOVEN *et al.* 1994; ⁴ NDAW *et al.*, 2000; ⁵ VALLS *et al.*, 2001; ⁶ DRISKELL *et al.*, 1998; ⁷ BIANCHINI & PENTEADO 2000; ⁸ AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2008.

^a Cru, "in natura"; ^b Com casca, crua; ^c Cozido, cozida; ^d Assado; ^e Crua, seca; ^f Sementes maduras, cozidas; ^g Lombo; ^h Carne "light", crua; ⁱ Frito; ^j Variedades de carne e subprodutos, fígado, cru; ^k Presunto, curado, cozido; ^l Carne defumada; ^m Presunto de peru fatiado; ⁿ Sem gordura, instantâneo, enriquecido com as vitaminas A e D; ^o Integral, pasteurizado; ^p leite fluido, com 2% de gordura, e vitaminas A e D adicionados; ^q Atlântico, cru; ^r Receita caseira, integral; ^s Manteiga; ^t Maisena, enriquecido.

Grande parte da vitamina B₆ em muitos alimentos está glicosilada ou ligada covalentemente a proteínas, cujas digestibilidades resultam no fato de muito dos teores da vitamina B₆ dos alimentos possuírem biodisponibilidades relativamente baixas. A piridoxina em alguns vegetais (por exemplo, batatas, espinafre, feijões e outras leguminosas) está com frequência glicosilada e possui baixa biodisponibilidade. A vitamina B₆ derivada de fontes animais tende a ter biodisponibilidade superior (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

Na literatura, há cogitações quanto ao suplemento de vitamina B₆ no tratamento e prevenção de doenças coronarianas, no tratamento da tensão pré-menstrual, da asma e anemia fauciforme (SPITZER, 2007).

Segundo Ball (2006) e Mahan & Escott-Stump (2005), a toxicidade aguda desta vitamina é relativamente baixa, porém sintomas de toxicidade relativa às altas doses da vitamina B₆ incluem o desenvolvimento de neuropatia periférica (MARTINDALE, 1996; BALL, 2006), além de outros sintomas, tais como fotossensibilidade ao sol, náuseas, desconforto nas mamas e diminuição da sensibilidade ao toque (LEKLEM, 1991).

Em condições naturais, a deficiência desta vitamina é muito rara. (LEHNINGER, 1984; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005). Os sintomas observados pela deficiência são: anemia, lesões dérmicas e convulsões (BOBBIO & BOBBIO, 2003).

Ácido Fólico (B₉)

Folato é o termo genérico para uma grande família de compostos quimicamente semelhantes. O ácido fólico ou pteroilmonoglutamato é um

análogo estável e sintético, que pode ser considerado um dos precursores desta família de coenzimas (DROGUETTI & PENTEADO, 2003).

O ácido fólico (Figura 6) compreende uma pteridina, um ácido p-amino benzóico e um ácido glutâmico.

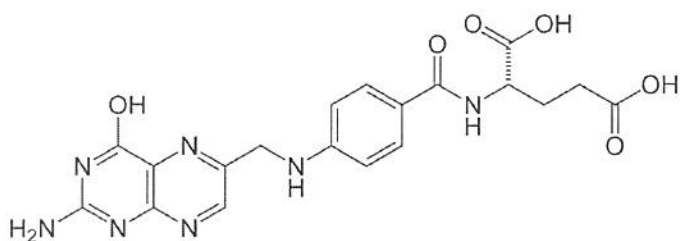


Figura 6: Estrutura química do ácido fólico (Fonte: WIKIPEDIA, 2009).

Os folatos de ocorrência natural são um grande grupo de derivados vindos da redução e substituição de estruturas de um carbono.

O ácido fólico é amarelo e seu peso molecular é 441,4; é levemente solúvel em água na forma ácida, mas bastante solúvel quando presente como um sal.

As várias coenzimas dos folatos facilitam a transferência de unidades de carbono a partir de moléculas doadoras em importantes processos de biossíntese, que levam à formação de metionina, purina e pirimidina. Elas também são mediadoras da interconversão de serina e glicina e participam do catabolismo da histidina (DROGUETTI & PENTEADO, 2003).

O teor de folatos em alguns alimentos é apresentado na Tabela 8. Fígado, feijões, brócolis, aspargos, espinafre e abacate proporcionam os mais altos níveis de folatos por porção média (BALL, 2006). Carne bovina magra,

batatas, pão de trigo integral, suco de laranja e feijões secos são boas fontes (MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005). Além destes, couve-flor, fungos e cerveja também são fontes de folatos (DROGUETTI & PENTEADO, 2003).

Tabela 8: Conteúdo de folatos em alimentos

Alimentos	Folatos (µg / 100g)	Folatos (µg / 100g) (4)	Folatos (µg / 100g) (5)	Concentração de Folato (µg/100g) (6)			
				5-metil- THF	THF	5-Formil- THF	Total (como Ác.Fólico)
Suco de laranja	30 ⁽¹⁾	30	18	16	<1	nd	15
Laranja		30	31	27	<1	msk	27
Banana		20	14	12	1	nd	13
Framboesa fresca	26 ⁽¹⁾	21	33				
Leite desnatado em pó	50 ⁽¹⁾	50	51				
Leite integral	5 ⁽¹⁾	5	9				
Carne bovina	7 ^{(1) a}	13 ^b	14 ^c				
Carne de frango	4 ^{(1) d}	7 ^e	10 ^f				
Linguado, cozido	9 ⁽¹⁾						
Fígado bovino	212 ^{(1) g}	253 ^h	330 ⁱ				
Batata, crua		18	31	21	3	nd	23
Cenoura crua	14 ⁽¹⁾	19	12	16	1	msk	16
Cogumelo seco	163 ^{(1) j}	163 ^j					
Cogumelo	658 ^{(2) j}	12 ^k	10 ^k				
Ervilha		65 ⁱ	62 ⁱ	51	10	nd	59 ^l
Lentilha seca	433 ⁽¹⁾	479	110 ^m				
Lentilha cozida, grãos	181 ⁽¹⁾	181	30 ^m				
Tomate	15 ⁽¹⁾	15	22	11	1	nd	11
Repolho	21 ^{(1) n}	43	75				
Alface		38	55	44	9	nd	51
Cebolinha verde	105 ⁽¹⁾						
Couve de Bruxelas		61 ^o	110 ^o	80	9	msk	85
Couveflor		57	66				
Brócolis, in natura	552 ⁽³⁾	71	90				
Brócolis, cozido	127 ⁽³⁾	108	64	98	18	nd	114

Fontes: ⁽¹⁾ PHILIPPI, 2001; ⁽²⁾ FURLANI & GODOY, 2007; ⁽³⁾ LIMA-PALLONE *et al* 2008; ⁽⁴⁾ USDA, 2009; ⁽⁵⁾ FOOD STANDARDS AGENCY 2002; ⁽⁶⁾ BALL 2006.

nd = não detectável; msk = pico mascarado por impurezas, CLAE

^a Lagarto, crua; ^b Magra, crua; ^c Lombo grelhado; ^d Filé cozido; ^e Carne, crua; ^f Carne, média, assada; ^g Cozido; ^h Refogado; ⁱ Cru, crua; ^j Shiitake; ^k Cozido, drenado; ^l Verde, congelada; ^m Lentilha verde e marrom, inteira, seca; ⁿ Roxo; ^o Cozida, drenada.

O folato é essencial para a formação de hemácias e leucócitos na medula óssea e para sua maturação e é um carreador de carbono simples na formação de heme (MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005).

O folato é encontrado em 150 formas diferentes, sendo que a sua biodisponibilidade nos alimentos varia consideravelmente (25 a 50%) em função das diferenças inerentes às formas das vitaminas, presença ou ausência de inibidores de conjugase e ligantes de folato, além do estado nutricional do indivíduo (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005). A disponibilidade relativa de folatos encontrados em uma determinada dieta é de 50% quando comparada com o ácido fólico (GREGORY, 1996; GREGORY, 2001).

Há indicações do aumento da homocisteína no sangue estar relacionada com a diminuição da ingestão de folatos e com doenças cardiovasculares. As vitaminas B₆ e B₁₂ também são fundamentais na eliminação da homocisteína do organismo (DROGUETTI & PENTEADO, 2003).

A deficiência de folatos está associada à anemia megaloblástica; defeitos do tubo neural resultante de deficiências subclínicas durante a gravidez (BOTTO *et al.*, 1999; DALY *et al.*, 1995); doença de Alzheimer (CLARKE *et al.*, 1998); síndrome de Down (HOBBS *et al.*, 2000); alterações do humor (GODFREY *et al.*, 1990); doenças cardiovasculares (TAVANI *et al.*, 2004; de BREE *et al.*, 2003; BRATTSTROM & WILCKEN, 2000) e alguns tipos de câncer (ZHANG *et al.* 2003,; SLATERRY *et al.*, 1999; GIOVANNUCCI *et al.*, 1998; SHARP & LITTLE, 2004).

O ácido fólico não é tóxico em humanos. Mesmo em doses tão altas como 15 mg, não foi relatado nenhum efeito tóxico substancial; um suplemento diário de 10 mg foi consumido por 5 anos sem efeito adverso (SPITZER, 2007). Nenhum sintoma de toxicidade foi observado em elevadas doses orais de folato em animais, apesar da administração parenteral de quantidades de cerca

de 1000 vezes a necessidade dietética ter produzido ataques semelhantes a epiléticos em ratos (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

Vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂ é conhecida como cobalamina, fator antianemia perniciosa e fator extrínseco ou de Castle. As principais cobalaminas em humanos e animais são a hidroxicobalamina, a adenosilcobalamina e a metilcobalamina, sendo as duas últimas formas coenzimáticas ativas. A cianocobalamina, uma forma sintética da vitamina B₁₂, que é largamente utilizada por sua disponibilidade e estabilidade, é transformada em fatores ativos após a ingestão (SPITZER, 2007).

A vitamina B₁₂ (Figura 7) é um importante intermediário no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, sendo essencial para a degradação de ácidos graxos e aminoácidos (BALL, 1994).

A vitamina B₁₂ é necessária na formação de glóbulos vermelhos, nervos e várias proteínas. Portanto, é essencial para a prevenção de certas formas de anemia e distúrbios neurológicos. Está também envolvida no metabolismo dos carboidratos e lipídeos, sendo essencial para o crescimento (SPITZER, 2007).

A inabilidade de sintetizar metionina a partir da homocisteína, na ausência de vitamina B₁₂, significa que o tetrahydrofolato (THF) não pode ser regenerado a partir da desmetilação do 5-metil-tetrahydrofolato. O folato acumulado na forma de 5-metil-tetrahydrofolato pode levar à inabilidade de formação de outros derivados de THF que são necessários para a síntese de purina e pirimidina. A conseqüente falta de síntese de DNA causa a morte de

muitas células hematopoiéticas na medula óssea. Neste evento resulta a anemia megaloblástica que é clinicamente indistinguível daquela induzida pela deficiência de folatos. Quando este tipo de anemia é causado pela deficiência de vitamina B₁₂, é chamada anemia perniciosa porque é acompanhada de uma neuropatia a qual não está relacionada à deficiência de folatos. A neuropatia é causada pela inabilidade para produzir o componente lipídico da mielina, que resulta na desmielinização do tecido nervoso (BALL, 2006). A neuropatia começa nos nervos periféricos, afetando os pés e dedos, avançando para a medula espinhal e cérebro (BALL, 2006, SPITZER, 2007). Os sintomas incluem entorpecimento, formigação e queimação dos pés, rigidez e fraqueza generalizada das pernas (MAHAN & SCOTT-STUMP, 2005).

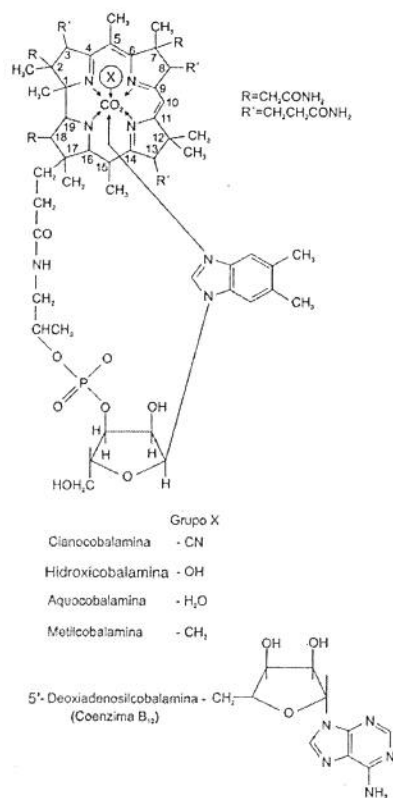


Figura 7: Estrutura química dos compostos da vitamina B₁₂ (Fonte BALL, 2006).

Na tabelas a seguir, estão apresentadas de forma esquematizada as funções da vitamina B₁₂ (Tabela 9) e as causas e origens da deficiência desta vitamina (Tabela 10).

Tabela 9: Funções metabólicas da vitamina B₁₂

Enzima	Função Metabólica
Adenosilcobalamina	
Metilmalonil-CoA mutase	Conversão de metilmalonil-CoA a succinil-CoA na degradação de propionato
L-α-leucina mutase	Conversão de L-α-leucina a aminoisocapronato como primeiro passo na síntese/degradação de aminoácidos
Metilcobalamina	
Metionina Sintetase	Metilação da homocisteína para produzir metionina

Fontes: COMBS JR., 1998; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005.

Tabela 10: Causas da deficiência da vitamina B₁₂

Causa	Origem
Falhas na Absorção	Falta do fator Intrínseco Insuficiência Pancreática Parasitoses Intestinais
Ingestão Inadequada	Usos de certos medicamentos Alimentos de origem vegetal Dieta não suplementada

Fontes: COMBS JR., 1998; SPITZER, 2007.

O organismo é extremamente eficiente para conservar a vitamina B₁₂. De modo diferente das outras vitaminas hidrossolúveis, esta é estocada principalmente no fígado. A deficiência de vitamina B₁₂ é raramente causada por carência na dieta, sendo mais geralmente atribuída a várias desordens de absorção e transporte. A absorção da vitamina B₁₂ é facilitada por um fator intrínseco, uma proteína secretada por células parietais da mucosa do estômago (BALL, 2006). A ausência do fator intrínseco (FI) pode resultar do envelhecimento associado à atrofia das células parietais gástricas, de deficiências hereditárias na síntese de FI ou incapacitação imunológica de FI.

Apesar de ser verdadeiro que o consumo crônico, após 5 a 6 anos, de dietas vegetarianas estritas sem suplementação da vitamina B₁₂ leva tipicamente a níveis circulantes muito baixos da vitamina, os sinais clínicos nesses indivíduos parecem ser raros e podem não se manifestar por vários anos, exceto em lactentes amamentados no peito. Isto não é verdadeiro para os ovolactovegetarianos, cujas dietas incluem fontes alimentares (MAHAN & SCOTT-STUMP, 2005). Para vegetarianos estritos, seria interessante a inclusão de fontes de vitamina B₁₂ em sua dieta, principalmente na gravidez, lactação e crianças (MANGELS, 2006). Alimentos fortificados com esta vitamina são disponíveis, tais como proteína texturizada de soja, leite de soja, margarinas vegetais, cereais matinais, etc. (VEGETARIAN SOCIETY, 2006).

Indivíduos que realizaram cirurgia para redução de estômago, dependendo do tipo de cirurgia empregado, podem apresentar ao longo do tempo problemas nutricionais, tais como a menor absorção de nutrientes, incluindo a vitamina B₁₂ (COLLINS, 2007). Assim como em cirurgias parciais do estômago em casos de câncer, é importante a avaliação da absorção adequada de vitamina B₁₂, além de outros nutrientes como cálcio, vitamina D e ferro (CANCER RESEARCH UK, 2008).

Segundo Spitzer (2007), a deficiência de vitamina B₁₂ afeta cerca de 10 a 15% dos indivíduos acima de 60 anos. Os sintomas com frequência incluem: anemia e icterícia por eritropoiese ineficaz; língua vermelha, lisa e carnuda; e distúrbios neurológicos. As manifestações psiquiátricas, como raciocínio prejudicado e depressão podem também estar presentes (MAHAN & SCOTT-STUMP, 2005).

Na Tabela 11, é apresentado o conteúdo de vitamina B₁₂ em alguns alimentos. Os alimentos de origem vegetal contêm a vitamina apenas por meio de contaminação ou síntese bacteriana. Um alimento fermentado tipo “tempeh” foi analisado e a concentração de vitamina B₁₂ encontrada foi desprezível. Em contraste, alguns vegetais marinhos cozidos continham vitamina B₁₂ na mesma proporção que o fígado bovino (MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005).

Tabela 11: Conteúdo de Vitamina B₁₂ (µg/100g) em alguns alimentos

Alimentos	B ₁₂ (µg/100g)		
	*	**	***
Fígado bovino	69,00-122,00	110,0	59,3
Fígado de galinha	24,10	35,0 ^a	16,58 ^a
Fígado de carneiro		54,0	90,05
Rim bovino	38,30	15,0	27,5
Rim de carneiro		17,0	52,41
Carne bovina	1,94-3,64	2,0 ^b	2,24 ^c
Carne de carneiro	1,00-2,00	2,0 ^b	2,21 ^d
Carne suína	0,55	1,0	0,84 ^d
Carne de peru	0,38	0,61 ^b	0,43 ^e
Carne de frango	0,32	(Traços)	0,36 ^f
Presunto	0,80	1,0	0,90 ^g
Leite	0,36	0,8	0,53 ^h
Leite integral	1,00 ^b	0,9	0,45 ⁱ
Queijos	0,36-1,71	1,1 ^j	0,83 ^j
Iogurte	0,06-0,62	0,3 ^k	0,47 ^k
Arenque	4,30	13,0	13,67
Salmão	3,20	4,0	3,23
Truta	7,80	5,0	4,45
Atum	2,80	5,0 ^l	2,20 ^l
Bacalhau	1,05	1,0	0,91 ^a ; 10,00 ^m
Ovo inteiro	1,00	2,5	1,29
Ovo, gema	3,11	6,9	1,95

Fontes: *COMBS JR. 1998; ** FOODS STANDARDS AGENCY 2002; *** USDA, 2009.

^a Cozido; ^b cru ou crua, “in natura”; ^c magra; ^d lombo, magro; ^e cozida, assada; ^f carne “light” grelhada ou frita; ^g não cozido; ^h com 2% de gordura e vitaminas A e D adicionadas; ⁱ com 3,25 % de gordura e vitamina D adicionada; ^j tipo cheddar; ^k baixa gordura, frutas; ^l cozido em óleo, drenado; ^m Atlântico, seco e salgado.

A vitamina B₁₂ não é tóxica ou apresenta baixa toxicidade quando administrada oralmente (BALL, 2006; MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005; SPITZER, 2007).

Necessidades Nutricionais

Os processos metabólicos devem responder às imediatas necessidades do organismo; os requerimentos vitamínicos estão, portanto, sujeitos a uma variação contínua, dentro de certos limites (BALL, 2006).

Segundo a legislação brasileira, de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC Nº 269 (BRASIL, 2005), foi aprovado o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. De acordo com este documento, a ingestão diária recomendada (IDR) é a quantidade de proteína, vitaminas e minerais que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia. Estas ingestões dietéticas diárias recomendadas para as vitaminas hidrossolúveis por dia para adultos, gestantes e crianças estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12: Ingestão Diária Recomendada

Grupo	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	B ₉	Biotina	B ₁₂
	mg	mg	mg	mg	mg	µg	µg	µg
0-6 meses	0,2	0,3	2	1,7	0,1	48	5	0,4
7-11 meses	0,3	0,4	4	1,8	0,1	48	6	0,5
1-3 anos	0,5	0,5	6	2	0,5	95	8	0,9
4-6 anos	0,6	0,6	8	3	0,5	118	12	1,2
7-10 anos	0,9	0,9	12	4	1,0	177	20	1,8
Adultos	1,2	1,3	16	5	1,3	240	30	2,4
Gestantes	1,4	1,4	18	6	1,9	355	30	2,6
Lactantes	1,5	1,6	17	7	2,0	295	35	2,8

Fonte: BRASIL, 2005.

Nos EUA, o “Food and Nutrition Board of Institute of Medicine” define um requerimento como o nível mais baixo de um nutriente, que ingerido de modo contínuo, para um indicador específico de adequação, deverá atender as necessidades nutricionais de um indivíduo. Uma recomendação nutricional (RDA - “recommended dietary allowance”) de um nutriente é o nível de ingestão dietético médio que é suficiente para satisfazer um requerimento de quase todos (97-98%) os indivíduos aparentemente saudáveis, em uma particular faixa de idade e sexo. A RDA é derivada a partir de um requerimento médio estimado (EAR), o qual é uma estimativa da ingestão na qual o risco de inadequação para um indivíduo é de 50%. As RDAs têm sido publicadas para as vitaminas A, D, E e K, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B₆, folato, vitamina B₁₂, e vitamina C. No caso de ácido pantotênico e biotina, há insuficiente evidência para calcular uma EAR e, desta forma, uma ingestão adequada de referência (AI) é proporcionada ao invés de uma RDA. O AI é um valor baseado em níveis de ingestão derivados experimentalmente ou aproximações de ingestões de nutrientes médias observadas em um grupo (ou grupos) de pessoas aparentemente saudáveis (BALL, 2006).

A tiamina (B₁) é expressa de maneira quantitativa, em termos de sua massa, normalmente em miligramas. Para esta vitamina, as recomendações nutricionais são baseadas nos níveis de ingestão calórica, em decorrência do seu papel direto no metabolismo de energia (MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005; SPITZER, 2007). Na revisão de Gubler (1991) foi apresentada uma série de fatores que influenciariam nos requerimentos de tiamina a partir de estudos feitos em animais, tais como: tamanho do animal, composição da dieta,

aumento da taxa metabólica, microflora intestinal, fatores genéticos, atividade física, idade e clima.

A niacina (B_3) é expressa em miligramas totais de niacina ou equivalentes de niacina (NE), calculados a partir do teor de niacina pré-formada mais 1/60 do teor de triptofano, para incluir estimativas de fontes diretas e indiretas da vitamina. Para a niacina, é estabelecido também o nível máximo tolerável de ingestão (UL), por exemplo, para adultos e mulheres, o valor de UL recomendado é de 35 mg NE/dia (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998). Para a Europa, foram desenvolvidos limites máximos diferentes para o ácido nicotínico (10 mg/dia) e nicotinamida (900 mg/dia) (SPITZER, 2007; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2006). As necessidades de niacina estão diretamente relacionadas à ingestão de energia, em virtude do papel desta vitamina nas reações de produção de energia no metabolismo (MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005).

O ácido pantotênico (B_5) é quantificado em miligramas. Nos EUA, as IDR são expressas como ingestão adequada (AI), (SPITZER, 2007; MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005).

Para a vitamina B_6 , o nível máximo tolerável de ingestão (UL) recomendado para adultos nos EUA é de 100 mg/dia (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998), e na Europa é de 25 mg/dia (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2006). Em geral, as necessidades de vitamina B_6 aumentam com o aumento das ingestões de proteína; o estado adequado de vitamina B_6 parece ser mantido quando esta vitamina é consumida numa proporção aproximada de 0,016 mg/g de proteína (DRISKELL, 1994).

Nos EUA, a ingestão dietética de folato é expressa como equivalentes de folato da dieta (DEF), que é uma tentativa de compensar as diferenças conhecidas na biodisponibilidade dos folatos. Uma DEF equivale a 1µg de folato alimentar, que é igual a 0,6 µg de ácido fólico (a partir de alimento fortificado ou suplemento consumido com o alimento) ou 0,5 µg de ácido fólico sintético (suplementar) tomado antes das refeições (MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005; SPITZER, 2007). Neste caso, são recomendados 400 µg/dia de DEF para adultos, 600 µg/dia durante a gravidez e 500 µg/dia durante a lactação. O nível máximo tolerável de ingestão (UL) recomendado para adultos é de 1 mg/dia (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2006).

A vitamina B₁₂ é expressa em microgramas. Como 10 a 30% das pessoas mais idosas podem não absorver adequadamente esta vitamina, é aconselhável que pessoas com mais de 50 anos de idade atinjam as suas recomendações nutricionais (RDA), principalmente pelo consumo de alimentos fortificados com vitamina B₁₂ ou um suplemento contendo esta vitamina (MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005).

Estabilidade de Vitaminas

No desenvolvimento de um novo produto também é importante reter, tanto quanto possível, o conteúdo das vitaminas naturalmente presentes ou proteger as vitaminas adicionadas e minimizar alterações indesejáveis de qualidade ao longo de sua vida útil. O processamento comercial de alimentos visa a conservar sua qualidade e estender a vida de prateleira pela destruição

de microorganismos deteriorantes e certas enzimas endógenas que poderiam promover deterioração e/ou reduzir seu valor nutritivo (BALL, 2006). Porém, o próprio processamento térmico a que grande parte de alimentos estão sujeitos antes de serem consumidos, podem reduzir muitos nutrientes (BURLINGAME, 2006). Devido a isto e a outros fatores que podem interferir na qualidade do produto obtido, é muito importante o controle adequado do processo de produção de alimentos, desde as matérias-primas até a obtenção do produto acabado. O controle de tempo e temperatura durante o processamento e estocagem também são importantes para a manutenção da qualidade dos produtos, incluindo o seu valor nutritivo. O acondicionamento dos alimentos utilizando uma embalagem adequada visa a proteger o alimento conservando suas características sensoriais e nutricionais, contribuindo na definição de sua vida útil.

Os principais fatores que influenciam a perda de vitaminas durante o processamento de alimentos são: oxidação (exposição ao oxigênio do ar atmosférico), calor (temperatura e tempo), efeito catalítico de metais, pH, ação de enzimas, umidade, irradiação (luz ou radiação ionizante), e várias combinações destes fatores (BALL, 2006; LESKOVA *et al.*, 2006; GREGORY, 1996). Algumas vitaminas são sensíveis ao processamento e estocagem, enquanto outras são mais ou menos estáveis.

Na Tabela 13 está apresentada, de forma resumida, a estabilidade das vitaminas, enfatizando as vitaminas envolvidas neste trabalho.

A tiamina é instável quando exposta ao calor, álcalis, oxigênio e radiação (SPITZER, 2007; HARRIS, 1988), sendo a mais termolábil das vitaminas do complexo B (BALL, 2006). As perdas de cozimento da vitamina

tendem a variar amplamente, dependendo do tempo de cozimento, pH, temperatura, quantidade de água utilizada e descartada, além do fato de a água ser ou não clorada (MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005). A tiamina não sofre destruição quando cozida em ácido por algumas horas, porém ocorrem perdas próximas a 100% quando cozida a pH 9 por 20 minutos (HARRIS, 1988; LESKOVA *et al.*, 2006). Alimentos congelados e desidratados incorrem a menores perdas desta vitamina durante a estocagem (BALL, 2006).

Tabela 13: Estabilidade das vitaminas

Vitamina / Condições	Calor	pH neutro	pH ácido	pH básico	Oxigênio	Luz
Carotenos (Pro-A)	I	E	I	E	I	I
Vitamina A	I	E	I	E	I	I
Vitamina D	I	E	E	I	I	I
Vitamina E	I	E	E	E	I	I
Vitamina K	E	E	I	I	E	I
Vitamina C	I	I	E	I	I	I
Tiamina	I	I	E	I	I	E
Riboflavina	I	E	E	I	E	I
Niacina	E	E	E	E	E	E
Ácido Pantotênico	I	E	I	I	E	E
Vitamina B₆	I	E	E	E	E	I
Ácido Fólico	I	I	I	E	I	I
Vitamina B₁₂	I	E	E	E	I	I
Biotina	I	E	E	E	E	E

E: estável (não importante destruição), I: instável (significante destruição).
Fontes: CARVALHO, 1996; GREGORY, 1996; HARRIS, 1988.

Desconsiderando as perdas por lixiviação, a niacina é estável durante processamento, estocagem e cozimento de alimentos (BALL, 2006). Tanto o ácido nicotínico como a nicotinamida são estáveis quando expostos ao calor, luz, oxigênio e álcali, sendo que pequenas perdas ocorrem no cozimento e estocagem de alimentos (SPITZER, 2007). A nicotinamida é parcialmente

hidrolisada por ácido e álcali, contudo a niacina resultante apresenta a mesma atividade biológica (HARRIS, 1988).

O ácido pantotênico é estável ao aquecimento ao pH 5,5 -7,0, porém é sensível ao cozimento prolongado em água (LESKOVA *et al.*, 2006). É prontamente destruído pelo aquecimento em soluções alcalinas ou fortemente ácidas (SPITZER, 2007) e também é lábil ao calor seco (HARRIS, 1988). É suscetível a lixiviação durante o branqueamento de vegetais e o cozimento caseiro (BALL, 2006), porém apresenta razoável estabilidade em muitos alimentos durante o cozimento comum. Como está localizada nas camadas externas dos grãos, cerca de metade dessa vitamina é perdida durante sua moagem (MAHAN & SCOOT-STUMP, 2005).

Em geral, a vitamina B₆ é instável durante tratamento térmico prolongado, e não é sensível à oxidação pelo ar. A estabilidade da vitamina B₆ em processamento e estocagem de alimentos depende, em certa extensão, do teor do vitâmero de vitamina B₆ presente no alimento, pois a piridoxina é consideravelmente mais estável ao calor do que o piridoxal e a piridoxamina (BALL, 2006). Deste modo, alimentos de origem vegetal (contendo mais piridoxina) são mais estáveis do que os alimentos de origem animal (contendo mais piridoxal e piridoxamina) (BALL, 2006; SPITZER, 2007). A piridoxina é também sensível à luz, especialmente à luz ultravioleta quando em soluções alcalinas (HARRIS, 1988).

Muitas formas de folatos em alimentos são instáveis (SPITZER, 2007). Segundo Harris (1988), o grupo do ácido fólico é estável durante fervura a pH 8 por 30 minutos, contudo grandes perdas ocorrem durante autoclavagem em ácidos e álcalis. Sua destruição é acelerada por oxigênio e luz (HARRIS, 1988).

Consideráveis perdas ocorrem através da lixiviação e tratamento térmico (BALL, 2006; SPITZER, 2007). Vegetais de folhas frescas estocados a temperatura ambiente podem perder cerca de 70% da atividade de folatos em três dias (SPITZER, 2007). As formas reduzidas nos alimentos são oxidadas com facilidade, com perdas típicas de 50 a 90% durante o armazenamento, cozimento ou processamento em altas temperaturas (MAHAN & SCOTT-STUMP, 2005).

A vitamina B₁₂ (cobalamina) é estável ao calor em pH neutro (HARRIS, 1988), porém pequenas perdas podem ocorrer quando exposta à luz, oxigênio e a meios alcalinos ou ácidos (SPITZER, 2007). Segundo Ottaway (2002), a vitamina B₁₂ é geralmente considerada estável sob muitas condições de processo de alimentos. Como a vitamina B₁₂ é encontrada ligada à proteína, aproximadamente 70% da atividade da vitamina é conservada durante o cozimento da maioria dos alimentos; entretanto, quantidades apreciáveis da vitamina podem ser perdidas quando o leite é pasteurizado ou evaporado (MAHAN & SCOTT-STUMP, 2005).

MÉTODOS DE ANÁLISE

A determinação de vitaminas em alimentos envolve alguns desafios em decorrência de vários fatores, tais como:

- devido às suas diferentes estruturas e propriedades, é extremamente difícil desenvolver um método geral adequado para a determinação simultânea de várias vitaminas em alimentos;
- os alimentos são geralmente matrizes muito complexas;

- baixa concentração em que se encontram;
- presença de inúmeros interferentes nos alimentos;
- exigência de cuidados especiais devido à baixa estabilidade destes nutrientes.

Dentre os métodos existentes para a determinação das vitaminas do complexo B, destacam-se:

Métodos biológicos ou bioensaio: avaliam o valor nutricional com relação à determinada vitamina pela obtenção da sua atividade biológica, baseando-se numa atividade fisiológica (BALL, 2006). Constituem testes muito interessantes para avaliação de um novo nutriente ou de uma dieta específica, porém apresentam longa duração, alto custo, e desta forma, são mais indicados para pesquisas. Não seriam métodos adequados para a quantificação rotineira das vitaminas em alimentos.

Métodos bioespecíficos: podem ser classificados em imunoensaios e ensaio proteína ligante. Imunoensaios são baseados na especificidade do antígeno (Ag) - anticorpo (Ac) e são representados pelo radioimunoensaio (RIA) e pelo método de ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay"). Os ensaios de proteína ligante utilizam proteínas de vitaminas ligantes de ocorrência natural com indicação radio ("RPBA: radiolabeled protein-binding assay") ou indicação enzima ("EPBA: enzyme-labeled protein-binding assay"). Os métodos bioespecíficos podem ser usados em matrizes biológicas complexas, porém requerem uma limpeza mínima da amostra, sendo também necessária a liberação das vitaminas a partir das formas ligantes, por meio de procedimentos de extração manual (BALL, 2006). Muitos Kits estão

disponíveis para este tipo de análises, porém são caros, importados e possuem validade limitada para seu uso. Algumas literaturas utilizam este tipo de ensaio para análise de vitaminas do complexo B (FINGLASS & MORGAN, 1994; WALSH *et al.*, 1979; GONTHIER *et al.*, 1998).

Métodos microbiológicos: são baseados nos requerimentos nutricionais de um microorganismo para determinada vitamina. Entretanto, muitos microrganismos podem sintetizar vitaminas a partir de certos precursores. Muitos métodos microbiológicos são ainda métodos oficiais para a análise de vitaminas, tais como niacina, ácido pantotênico, vitamina B₆, folatos e vitamina B₁₂, porém são métodos demorados (36 a 48 hs de incubação). Para a vitamina B₆, apesar dos métodos microbiológicos serem tradicionais, eles são de difícil execução em muitos laboratórios industriais e inexactidões podem ser introduzidas através de resposta diferenciada para as diferentes formas desta vitamina (MANN *et al.*, 2005). Os métodos microbiológicos são individuais, ou seja, não determinam as várias formas da vitamina B₆, e no caso da niacina, são detectados também derivados de ácido nicotínico sem atividade vitamínica, e não permite a determinação simultânea das diferentes formas de folatos, determinando apenas os totais (TAMURA & MESSING, 1997).

Métodos físico-químicos: permitem a quantificação das principais substâncias que são responsáveis pela atividade biológica e podem alcançar um alto grau de precisão. Nesta classificação, são incluídos os métodos:

- *Colorimétricos:* podem requerer cromatografia de coluna aberta ou de camada delgada para isolar as vitaminas de substâncias interferentes. As determinações espectrofotométricas são freqüentemente utilizadas em análises

de preparações farmacêuticas ou premix de vitaminas. Porém, no caso de alimentos, as dificuldades aumentam devido à complexidade da matriz e baixa concentração das vitaminas. Apesar de existir método oficial para determinação de niacina em alimentos, este utiliza o reagente brometo de cianogênio que é muito tóxico.

- *Métodos fluorimétricos*: existem métodos oficiais para a determinação de tiamina (conversão para tiocromo), riboflavina e vitamina B₆ em vários alimentos.

- *Cromatografia gasosa*: a partir de 1960, a cromatografia gasosa (CG) tornou-se a técnica dominante para a determinação das vitaminas D e E (BALL, 2006). A análise de vitaminas hidrossolúveis por esta técnica é muito difícil e requer geralmente a formação de derivados voláteis (COOLINS *et al.*, 2006), além do que muitas destas vitaminas são termolábeis. Porém, algumas vitaminas (tiamina, nicotinamida e ácido pantotênico) podem ser analisadas por esta técnica, sendo necessária a derivatização para aumentar a sua volatilidade e estabilidade térmica.

- *Eletroforese capilar*: tem sido utilizada com sucesso em vários campos de aplicação, como bioquímica, biotecnologia, análises farmacêuticas, e química clínica. Pouco impacto, porém, tem sido observado nas análises de alimentos. Comparativamente à CLAE, apresenta vantagens como superior resolução dos componentes da amostra, tempos de corrida menores, colunas mais robustas e menor custo de operação. Por outro lado, apresenta desvantagens como menor sensibilidade atribuída a volumes de injeções extremamente baixos (nanolitros) e pequeno volume da célula do detector (BALL, 2006). Alguns exemplos do uso desta técnica foram descritos, na determinação de tiamina

por cromatografia capilar eletrocinética micelar em carnes (VIDAL-VALVERDE & DIAZ-POLLÁN, 1999) e leite (VIDAL-VALVERDE & DIAZ-POLLÁN, 2000); niacina por eletroforese capilar de zona (WARD & TRENNERY, 1997; WINDAHL *et al.* 1999); ácido pantotênico em refrigerantes (KODAMA *et al.* 1998) e alimentos fortificados (SÁDECKÁ *et al.*, 2003); e vitaminas hidrossolúveis em refrigerantes (SCHREINER *et al.*, 2003).

- *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*: é considerada uma poderosa ferramenta para a análise de compostos lábeis como as vitaminas hidrossolúveis (OLLILAINEN *et al.*, 1993). As vantagens da utilização da CLAE para a determinação destas vitaminas incluem rapidez, simplicidade, alta sensibilidade, exatidão (SCOTT *et al.* 2000; KONINGS *et al.*, 2001) e possibilidade de determinação simultânea de várias vitaminas. Através desta técnica, é possível a análise de diferentes formas vitamínicas, como as da vitamina B₆, da niacina, folatos e ácido fólico.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação de vitaminas do complexo B naturalmente presentes em alimentos por CLAE é de grande interesse e aplicação, pois através desta técnica é possível a análise de diferentes formas vitamínicas, como por exemplo, todos os 6 vitâmeros da vitamina B₆, mais o ácido piridóxico (BALL, 2006); da niacina (nicotinamida e ácido nicotínico); e de folatos, sendo atualmente a técnica mais empregada na sua determinação (CATHARINO *et al.*, 2006).

A CLAE também é o método atual de escolha para a determinação de vitaminas lipossolúveis e permite distinguir entre vitaminas adicionadas e naturais. A alta repetibilidade da CLAE torna-a ideal para a determinação de tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina, ácido pantotênico e ácido fólico adicionados em alimentos fortificados (BALL, 2006).

Poucos métodos oficiais publicados pela AOAC (2005) utilizam a CLAE, no entanto, um estudo colaborativo para a determinação de vitamina B₆ em fórmulas infantis utilizando esta técnica foi realizado e está em fase de publicação. A importância da atualização destes métodos garantindo dados analíticos corretos extrapola os motivos de enriquecimentos de alimentos, uma vez que é extremamente importante também em estudos nutricionais como estudos de dieta e estudos epidemiológicos que examinam associações entre as dietas de vitaminas e o desenvolvimento de doenças. Por outro lado, a CEN (European Committee for Standardization) dos 6 métodos propostos na área de vitaminas hidrossolúveis, 4 deles são por CLAE (KONINGS, 2005).

Para a determinação simultânea de vitaminas do complexo B por CLAE, é comum a utilização de colunas de fase reversa, com tamanho de partículas variando de 5 a 3 µm (AGOSTINI & GODOY, 1997; ALBALÁ-HURTADO *et al.* 1997; CHU & TIN, 1998; SANT'ANA, 1998; MORENO & SALVADÓ, 2000; VIÑAS *et al.* 2003; HEUDI *et al.* 2005; CASTRO *et al.*, 2006; ZAFRA-GOMÉZ *et al.* 2006; LIMA-PALLONE *et al.*, 2008).

Além da cromatografia da fase reversa, outra técnica bastante utilizada em análises quantitativas de vitaminas hidrossolúveis é a cromatografia por pareamento iônico (AGOSTINI & GODOY, 1997; IVANOVIC *et al.*, 1999;

ALBALÁ-HURTADO *et al.* 1997; ALMAGRO *et al.* 2002; WOOLARD & INDYK, 2002; MANN *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2006).

Na cromatografia de fase reversa, uma fase estacionária não polar é utilizada em conjunção com uma fase móvel polar. Solutos polares são eluídos antes que solutos não polares. Compostos iônicos não podem ser analisados como tal por fase reversa se são eluídos próximos ao volume morto. A supressão iônica é uma técnica de cromatografia de fase reversa na qual o equilíbrio iônico da amostra é controlado pelo ajuste do pH da fase móvel para obter retenção e separação de acordo com seus valores de pK_a (BIDLINGMEYER, 1980). Pelo tamponamento da fase móvel a uma ou duas unidades abaixo do pK_a valor para ácido fraco, e a correspondente quantidade acima do valor de pK_b para a base fraca, a ionização é suprimida e o composto estará não dissociado, obtendo maior afinidade para a fase estacionária, ficando mais retido (BALL, 2006; COOLINS *et al.*, 2006).

A cromatografia por pareamento iônico utiliza a fase estacionária reversa e oferece seletividade adicional para melhorar a separação, ao permitir manipular a concentração do reagente que forma o par iônico (COLLINS *et al.*, 2006) e o ajuste do pH da fase móvel (BALL, 2006). Nesta modalidade, ajusta-se o pH da fase móvel, que é uma mistura de solvente orgânico e água, com ácido, base ou solução tampão, de modo a promover a ionização dos componentes da amostra. A seguir, adiciona-se o par iônico que deve ter carga oposta à dos solutos a serem separados, formando um par iônico de carga neutra, que passa a ser mais retido na fase reversa, devido à presença, no reagente, de grupo alifático que possui maior afinidade pelas cadeias da fase reversa, proporcionando a separação (COOLINS *et al.*, 2006). Assim,

compostos de mesma carga terão tempo de retenção reduzido; para compostos destituídos de carga, a adição do íon pareante praticamente não tem efeito. Desta forma, tanto compostos ionizados como não ionizados podem ser analisados na mesma corrida cromatográfica (BALL, 2006; BARTHA & STAHLBERG, 1994).

Como não existem para a CLAE detectores que são universalmente aplicados, se os componentes da amostra diferirem bastante em suas propriedades físico-químicas pode ser necessária a utilização de dois ou mais detectores em série, para assegurar que cada um dos componentes de interesse seja adequadamente medido (COOLINS *et al.*, 2006).

Os detectores mais comuns da CLAE são baseados na absorbância de luz ultravioleta ou visível pela molécula do analito. Estes detectores são populares devido ao seu baixo custo, robustez, razoável limite de detecção e facilidade de uso. Existem vários tipos de detectores de UV, incluindo configuração com comprimento de onda simples, comprimento de onda variável (espectrofotométrico) e arranjo de diodos, que confere habilidade para dinamicamente adquirir e estocar espectros para a análise de pureza e identidade dos picos. Vários outros tipos de detectores são disponíveis, tais como os de Fluorescência, Eletroquímico e de Condutividade Elétrica, os quais tendem a ser empregados quando alta sensibilidade é requerida e/ou a molécula do analito não absorve a radiação UV (EARL, 2009).

Para a análise de tiamina, tanto a detecção por UV (NICOLAS & PFENDER, 1990), como por fluorescência (FURLANI & GODOY, 2008; VALLS *et al.*, 1999) podem ser empregadas, porém a utilização da segunda é preferível quando se trata de amostras não enriquecidas, já que os teores

naturalmente presentes são baixos e por fluorescência a sensibilidade é maior. A tiamina deve então ser convertida em composto fluorescente, o tiocromo. A derivatização pode ser pré ou pós-coluna (BIANCHINI-PONTUSCHKA & PENTEADO, 2003).

A niacina pode ser detectada por UV, sendo que suas formas, ácido nicotínico e nicotinamida, exibem similar espectro na região UV. Sua absorvitude é bastante afetada pelo pH, porém a $\lambda_{\max}$ permanece inalterado em 261nm (BALL, 2006). Estas formas não são fluorescentes, porém derivados fluorescentes podem ser formados por tratamento com uma mistura de brometo de cianogênio e p-aminocetofenona (KRISHNAN *et al.*, 1999).

A molécula do ácido pantotênico não contém uma característica cromófora e, por esta razão, exibe apenas fraca absorção a 204 nm, devido à presença de grupos carbonila (BALL, 2006). Apesar disto, métodos para a determinação de ácido pantotênico utilizando detector UV em várias matrizes de alimentos têm sido reportados (TIMMONS *et al.*, 1987; ROMERA *et al.*, 1995; WOOLLARD *et al.*, 2000; CASTRO, 2006; MORESCHI & ALMEIDA-MURADIAN, 2007), e por fluorescência, para superar o problema de baixa de absorção a baixos comprimentos de onda, utilizando derivatização pós-coluna (PAKIN *et al.*, 2004), e detecção por espectrometria de massa (MITTERMAYR *et al.*, 2004; CHEN & WOLF, 2007).

Sendo naturalmente fluorescente, a vitamina B₆ é freqüentemente determinada por este sistema de detecção (ZAFRA-GOMÉZ *et al.*, 2006; ARGOUDELIS, 1997; BERGAENTZLÉ *et al.*, 1995; MANN *et al.*, 2005). A absorção da hidrocloreto de piridoxina no UV é fortemente dependente do pH: no pH 1,8, há um único pico máximo a 290 nm (BALL, 2006).

O ácido fólico está presente em quantidades significantes apenas em alimentos fortificados e tem sua detecção realizada por UV-VIS (ou por arranjo de diodos). Já os folatos naturalmente presentes nos alimentos encontram-se em baixas quantidades nos alimentos e são naturalmente fluorescentes, dessa forma sua detecção é normalmente efetuada por detector de fluorescência, com exceção do 10 MAF (10-metil-ácido fólico) que apresentou detecção por arranjo de diodos (LIMA-PALLONE *et al.*, 2008; CATHARINO *et al.*, 2006; FURLANI & GODOY, 2007).

A detecção da vitamina B₁₂ é realizada por UV-VIS ou arranjo de diodos, no entanto, falta sensibilidade para medir as concentrações extremamente baixas desta vitamina naturalmente presentes em alimentos e o método microbiológico ainda é mais sensível (BALL, 2006; SANT'ANA, 2003). No entanto, determinação por UV foi possível com a utilização de uma coluna por imunoafinidade na extração da amostra (HEUDI *et al.*, 2006). A detecção por fluorescência também foi possível, para tabletes multi-vitamínicos e meio de fermentação, alcançando limite de detecção de 0,1ng/mL (LI & CHEN, 2000). A utilização de espectrômetro de massa também vem sendo utilizada na determinação da vitamina B₁₂ (GENTILI *et al.*, 2008; LUO *et al.*, 2006).

Os detectores para CLAE mais utilizados para a determinação simultânea de vitaminas hidrossolúveis são: detectores por arranjo de diodos para alimentos enriquecidos (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2008), para um cereal tradicional turco "tarhana" (EKINCI, 2005) e para formulação de leite infantil (ALBALÁ-HURTADO *et al.*, 1997); ou uma combinação dos detectores de arranjo de diodos e de fluorescência para alimentos enriquecidos (ZAFRA-GOMÉZ *et al.*, 2006; CASTRO *et al.*, 2006); arranjo de diodos e espectrometria

de massa para suplementos dietéticos multi-vitamínicos (CHEN & WOLF, 2006); espectrometria de massas para “Italian pasta” (LEPORATI *et al.*, 2005).

Técnicas de extração para as vitaminas hidrossolúveis

Técnicas analíticas *in vitro* requerem extração prévia das vitaminas a partir da matriz de alimentos, a fim de facilitar a sua determinação. O apropriado método de extração depende do seguinte critério: a informação analítica requerida, a natureza da matriz de alimentos, a forma na qual a vitamina ocorre naturalmente ou está adicionada (diferentes formas de vitaminas são freqüentemente encontradas em produtos cárneos, vegetais e lácteos), a natureza e relativas quantidades de substâncias interferentes em potencial, a estabilidade da vitamina quanto ao aquecimento e extremos de pH e a seletividade e especificidade do método analítico a ser utilizado. Procedimentos de extração para vitaminas hidrossolúveis incluem hidrólises da amostra com um ácido mineral (ácido clorídrico) ou ácido sulfúrico, hidrólise alcalina com hidróxido de cálcio, desproteinização com ácido tricloroacético ou agente de ação similar, como o ácido perclórico, e digestão com enzima apropriada (BALL, 2006).

Para a análise de vitaminas, a etapa de extração tem uma grande importância, já que extrações incompletas, limpeza inadequada dos extratos podendo levar à presença de interferentes e, ainda, a degradação de vitaminas pode acarretar erros na quantificação (FURLANI, 2004).

Extração utilizando hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática, para a liberação das vitaminas das proteínas e transformação das formas

fosforiladas das vitaminas em formas livres, tem sido utilizada por diversos autores para determinação dessas vitaminas em matrizes alimentícias (LEBIEDZINSKA *et al.*, 2007; ESTEVE *et al.*, 2001; OLLILAINEN *et al.*, 2001; NDAW *et al.*, 2000; BOGNÅR & OLLILAINEN 1997; ARELLA *et al.*, 1996; van der BERG *et al.*, 1996).

O procedimento de extração geralmente utilizado para a determinação da tiamina total envolve uma digestão a quente com ácido mineral para a liberação da tiamina livre e ésteres de fosfato de tiamina das associações com proteínas, seguida por hidrólise enzimática. Uma preparação de enzima diastática comercial de origem fúngica (como Takadiastase, Claradiastase ou Mylase) é adequada para a etapa de hidrólise. Tais preparações contêm atividade fosfatase em adição a α -amilase e outras enzimas (DEFIBAUGH, 1987).

Para a análise do conteúdo natural de niacina, o procedimento de extração geralmente envolve extensiva hidrólise ácida das amostras, com a finalidade de romper os complexos protéicos, resultando em um extrato que contém também quantidades apreciáveis de compostos interferentes (DAWSON *et al.*, 1988). Ndaw *et al.* (2002) substituiu a extração ácida 0,1 N usual por hidrólise enzimática, utilizando uma enzima específica que hidrolisa apenas as formas ligadas da niacina. Esta hidrólise enzimática não induz a uma subsequente conversão da nicotinamida a ácido nicotínico. Quando a hidrólise ácida foi aplicada para as soluções padrões de NAD (1,35 μ M) e NADP (1,17 μ M), cerca de 10% da nicotinamida liberada foi convertida a ácido nicotínico (BALL, 2006).

Devido aos tecidos animais e vegetais diferirem muito com relação às formas das vitaminas B₆ neles contidas, não há um simples estabelecimento de condições para a extração quantitativa de vitamina B₆ a partir de produtos animais e vegetais. O tratamento de amostras utilizando agentes desproteinizantes tais como ácido metafosfórico, perclórico, tricloroacético ou sulfosalicílico à temperatura ambiente prontamente hidrolisa as bases de Schiff, enquanto preserva os vitâmeros fosforilados e a forma PN-glicosídeo. Por esta razão, seu uso proporciona melhor estimativa da vitamina B₆ disponível do que o uso de ácidos minerais (BALL, 2006).

Para a determinação do ácido pantotênico, com exceção do método biológico, é necessária a liberação da vitamina a partir de sua forma ligada, principalmente a coenzima A. Porém, nem hidrólise ácida ou alcalina pode ser utilizada já que esta vitamina é degradada por tais tratamentos. O tratamento enzimático seria uma possibilidade, como por exemplo, a simultânea ação da fosfatase intestinal e enzima do fígado de aves (NOVELLI *et al.*, 1949), porém esta combinação de enzimas libera praticamente todo o ácido pantotênico a partir da coenzima A, mas não libera a vitamina da proteína carreadora do grupo acil (WYSE *et al.*, 1985). Na determinação do ácido pantotênico em leite e fórmulas infantis (WOOLLARD *et al.*, 2000), foi utilizada uma simples preparação da amostra com a adição de água a cerca de 40°C, agitação com aplicação de vórtex, repouso por 20 minutos, adição de 0,5 mL de ácido acético (3% v/v), agitação por vórtex e centrifugação. Outro procedimento para a extração do ácido pantotênico em fórmulas infantis em pó foi realizado em ultrassom por 15 minutos com solução tampão fosfato (MORESCHI & ALMEIDA-MURADIAN, 2007).

A quantificação de folatos em alimentos e amostras biológicas é difícil, devido às suas diferentes formas naturais. Uma quebra enzimática é essencial antes da quantificação do folato poliglutamato e as condições desta quebra precisam ser otimizadas para cada tipo de alimento (DROGUETTI & PENTEADO, 2003). Por outro lado, a utilização de enzimas no processo de extração dificulta muito a aplicação do método e aumenta o tempo de análise, além de promover perdas de folatos (CATHARINO *et al.*, 2006). Para a extração enzimática de folatos, utiliza-se conjugases de origem diferente para método microbiológico e para CLAE (BALL, 2006). Foi desenvolvida uma metodologia para a determinação de folatos por CLAE, cuja extração foi muito simples em relação aos métodos existentes, utilizando tampão fosfato e homogeneizador tipo Turatec, seguida da limpeza do extrato com ácido tricloroacético, possibilitando a determinação simultânea de seis formas naturalmente e mais comumente presentes de folatos em alimentos, além da forma sintética, ácido fólico (LIMA-PALLONE *et al.*, 2008).

Procedimentos de extração de vitamina B₁₂ têm em geral dois propósitos, liberação das cobalaminas ligadas a proteínas e conversão das formas de ocorrência natural e lábeis para uma forma simples e estável, cianocobalamina ou sulfitocobalamina. Conversão para a sulfitocobalamina por reação com metabissulfito evita o uso de soluções letalmente tóxicas de cianeto requeridas para formar a cianocobalamina. O tratamento por aquecimento (autoclavagem por 10 minutos a 121°C) denatura as proteínas, inativa as enzimas e acelera a conversão das cobalaminas liberadas a sulfitocobalamina (BALL, 2006).

Exemplos de determinações simultâneas destas vitaminas: para leite infantil, foi utilizada uma preparação simples da amostra utilizando extrações com ácido tricloroacético para precipitar as proteínas, centrifugação e filtração (ALBALLÁ-HURTADO *et al.*, 1997); para biscoitos enriquecidos, foi utilizada a adição de ácido sulfúrico 0,05 mol/L, ultrassom por 60 min, limpeza do extrato com adição de metanol e refrigeração por 60 min a -18°C (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2008); para alimentos enriquecidos, foi também utilizada uma preparação simples da amostra com agitação por vórtex por 1 minuto, ultrassom por 5 minutos, repouso por 60 min, adição de 1g da solução de precipitação (consistindo de 9,10g de acetato de zinco, 5,46g de ácido fosfotungístico polihidratado, e 5,8 mL de ácido acético glacial, completando o volume com água pra 100 mL), agitação por vórtex por 1 minuto, repouso de 15 min e centrifugação (ZAFRA-GOMÉZ *et al.*, 2006). Em bebidas isotônicas, em virtude de sua simples composição, as amostras foram apenas filtradas (CASTRO *et al.*, 2006). Trabalhos utilizando a preparação da amostra com cartuchos SPE também têm sido reportados (EKINCI, R., 2005; MORENO & SALVADÓ, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

No Brasil, três empresas fabricam cremes vegetais enriquecidos com vitaminas do complexo B. Uma marca comercial contendo as vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ e outras contendo as vitaminas B₆, B₉ e B₁₂. Quatro diferentes amostras foram coletadas nos principais supermercados na região de Campinas - SP, com a preocupação de se adquirir lotes com diferentes datas de fabricação, cobrindo diferentes períodos da vida de prateleira destes produtos. Foram analisados entre 4 e 5 lotes diferentes de cada produto, sendo que para cada lote, dois potes de 250 ou 500 g do produto foram homogeneizados para análise em duplicata. Todas as amostras analisadas apresentaram conteúdo de 35% de gorduras totais e vida de prateleira de 6 meses.

Reagentes

Os padrões cloridrato de tiamina (vitamina B₁), nicotinamida (vitamina B₃), D(+) pantotenato de cálcio (vitamina B₅), cloridrato de piridoxina (vitamina B₆), ácido fólico (vitamina B₉) e cianocobalamina (vitamina B₁₂) marca Sigma foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os demais reagentes utilizados foram: metanol, grau HPLC, diidrogenofosfato de potássio P.A., ácido orto-fosfórico 85% P.A. e água grau HPLC.

A fase móvel aquosa (KH₂PO₄) foi filtrada em membrana Millipore HATF04700; as amostras injetadas no sistema cromatográfico foram filtradas em filtro de celulose regenerada de 0,45 µm de tamanho de poro (Minisart-RC

15 mm). O modificador orgânico metanol também foi filtrado em membrana Millipore HVH04700 de 0,45 μm .

Equipamento

Para a extração da amostra, utilizou-se um aparelho de microondas convencional, e banho de ultrassom marca Unique, modelo USC-2850A (frequência 25 KHz).

Utilizou-se um cromatógrafo líquido AGILENT TECHNOLOGIES série 1200, com injetor automático com capacidade de 1 a 100 μL (G1329A), degaseificador (G1329A), bomba quaternária (G1311A), termostato da coluna (G1316A), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível (G1315D). O sistema foi controlado pelo software ChemStation (Rev.B.03.02), o qual também gerencia o sistema de aquisição e tratamento de dados. A coluna utilizada foi a Agilent Zorbax SB-C18 3,5 μm 4,6 x 150 mm, utilizando pré-coluna Agilent Zorbax SB-C18 5 μm 4,6 x 12,5mm.

Extração

A extração foi uma adaptação mais simples do trabalho de Lima (2001) com o estabelecimento do procedimento descrito a seguir.

Após a homogeneização do conteúdo de dois potes do produto, foi tomada uma porção de cerca de 40 g da amostra e colocada em microondas por aproximadamente 12 segundos. A amostra fundida foi homogeneizada e imediatamente tomada uma alíquota próxima de 1g em balão de 10 mL. Adicionou-se cerca de 5 mL de água a 50°C e aqueceu-se novamente em

banho de microondas por aproximadamente 7 segundos. Realizou-se homogeneização total da amostra, utilizando-se vórtex por um minuto. O balão contendo a amostra foi colocado em banho ultrassom a 50°C por 15 minutos. Após este tempo, adicionou-se água completando o volume do balão e efetuou-se nova homogeneização e aplicação de vórtex por 1 minuto. Resfriou-se a amostra até temperatura ambiente e, quando necessário, completou-se novamente o volume do balão com água. Realizou-se a agitação da amostra e posterior filtração em membrana de celulose regenerada de 0,45 µm. O filtrado foi injetado imediatamente no cromatógrafo líquido. Todas as etapas desenvolvidas foram protegidas da luz.

Condições cromatográficas

As vitaminas foram separadas em sistema de eluição por gradiente, com vazão de 1,0 mL/min tendo como **solução A**, KH_2PO_4 0,05M (ajustando-se o pH a 2,25 com ácido orto-fosfórico P.A.) e, como **solução B**, o modificador orgânico metanol. A programação (1) do gradiente utilizada foi a seguinte:

- 0 min – 0,3 % da fase móvel B
- 0,3 min – 0,3% da fase móvel B
- 5,0 min – 15,0% da fase móvel B
- 10,0 min – 25,0 % da fase móvel B
- 20,0 min – 40,0 % da fase móvel B

Utilizando-se este gradiente, foi possível obter um cromatograma com todos os padrões das vitaminas envolvidas neste trabalho e, neste caso, o volume de injeção utilizado foi de 10 µL. As condições foram retomadas e a coluna reequilibrada em cerca de 10 minutos. Para a agilização da análise para

as amostras contendo apenas as vitaminas B₆, B₉ e B₁₂, entretanto, outra programação (2) foi utilizada:

- 0 min – 7,5 % da fase móvel B
- 0,3 min – 7,5% da fase móvel B
- 0,6 min – 15,0% da fase móvel B
- 15,0 min – 40,0 % da fase móvel B
- 15,1 min – 60,0 % da fase móvel B
- 20,0 min – 60,0 % da fase móvel B

Dessa forma, os tempos de retenção destas vitaminas foram menores e o reequilíbrio da amostra foi obtido em menor tempo (cerca de 5 minutos). O volume de injeção utilizado nesta condição foi de 100 µL.

A detecção das vitaminas foi realizada em detector de arranjo de diodos (UV-VIS) nos seguintes comprimentos de onda: 246 nm para a tiamina; 261 nm para a niacina; 195 nm para ácido pantotênico; 290 nm para piridoxina; 282 para ácido fólico e 362 para vitamina B₁₂. As vitaminas foram identificadas por comparação de seu tempo de retenção, por co-cromatografia, e pelos espectros de absorção, fornecidos pelo detector de arranjo de diodos. A quantificação das vitaminas foi realizada por padronização externa, com curvas de calibração construídas com no mínimo 5 níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de pelo menos 2 determinações.

As concentrações utilizadas nas curvas analíticas para as vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ com programação de gradiente 1 e volume de injeção de 10 µL, estão apresentadas na Tabela 14. E as concentrações utilizadas nas curvas analíticas para as vitaminas B₆, B₉ e B₁₂ com programação de gradiente 2 e volume de injeção de 100 µL, estão apresentadas na Tabela 15. As vitaminas foram diluídas em água, com exceção da primeira diluição da vitamina B₉ que

foi efetuada utilizando-se hidróxido de sódio 0,1N. Todas as etapas foram protegidas da luz.

Tabela 14: Concentrações das vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ utilizadas nas curvas analíticas.

Vitaminas	Concentrações (mg/mL) (1)					
B ₁ (Tiamina)	0,00089	0,00178	0,00267	0,00446	0,00624	0,00891
B ₃ (Niacina)	0,02510	0,05010	0,07515	0,12525	0,17535	0,25050
B ₅ (Ác. Pantotênico)	0,00929	0,01858	0,02787	0,04644	0,06502	0,09289
B ₆ (Piridoxina)	0,00991	0,01983	0,02974	0,04957	0,06939	0,00991

(1) Gradiente 1.

Tabela 15: Concentrações das vitaminas B₆, B₉ e B₁₂ utilizadas nas curvas analíticas.

Vitaminas	Concentrações (mg/mL) (2)				
B ₆ (Piridoxina)	0,00414	0,00825	0,01235	0,04229	0,08457
B ₉ (Ácido Fólico)	0,00098	0,00492	0,00985	0,04905	0,09849
B ₁₂ (Cianocobalamina)	0,00005	0,00010	0,00050	0,00100	0,00250

(2) Gradiente 2.

Validação do Método

Para a validação da metodologia, foram considerados os parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação, repetibilidade e exatidão.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Segundo THOMPSON *et al.* (2002), a curva analítica deve conter no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero da curva, devido aos possíveis erros associados.

Os limites de detecção foram avaliados pela adição de quantidades conhecidas de padrão à amostra sem enriquecimento. Neste caso, seguiu-se o

procedimento utilizado para a extração das vitaminas nas amostras analisadas, utilizando-se também cerca de 1g de creme vegetal não enriquecido. Foi considerado o limite de detecção a menor quantidade detectável na matriz que produziu um sinal com uma amplitude três vezes maior do que a do ruído ($S/R \geq 3$) (RIBANI *et al.*, 2004; CAULCUTT & BODDY, 1983).

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com nível aceitável de exatidão e precisão (INMETRO, 2007), utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004). Os limites de quantificação adotados para as vitaminas foram de cinco vezes o limite de detecção.

A repetibilidade do método foi fornecida por análises (5 repetições) de duas amostras de creme vegetal, uma delas contendo as vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ (Gradiente 1) e outra contendo as vitaminas B₆ e B₉ (Gradiente 2), sendo avaliada segundo a equação a seguir (CAULCUTT & BODDY, 1983): $r = t \sqrt{2} s$, onde r = repetibilidade com significância de 95%, s = estimativa do desvio padrão e t = t de Student. Os coeficientes de variação foram determinados e comparados pela fórmula descrita por HORWITZ *et al.* (1980) ($CV\% = 2^{(1-0,5\log C)}$, onde CV é o coeficiente de variação e C é a concentração expressa como potência de 10).

Para a avaliação da exatidão do método, realizou-se teste de recuperação dos padrões adicionados ao produto não enriquecido, nas concentrações próximas aos valores encontrados nos produtos, com exceção da vitamina B₁₂ que foi adicionada numa concentração acima do previsto para o produto, devido ao limite de detecção desta vitamina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapas analíticas e validação da metodologia

A Figura 8 apresenta o cromatograma obtido para os padrões de todas as vitaminas envolvidas utilizando-se a programação de gradiente 1 e a Figura 9 apresenta os cromatogramas obtidos para a amostra contendo as vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ (programação de gradiente 1, volume de injeção 10 µL). A Figura 10 apresenta os cromatogramas obtidos para as amostras contendo as vitaminas B₆ e B₉ (programação de gradiente 2, volume de injeção 100 µL). A vitamina B₁₂ está presente em pequenas concentrações comparada com as outras vitaminas e por este motivo não foi possível a sua determinação nos cremes vegetais. As concentrações de vitamina B₁₂ presentes nestes produtos foram: 1,0 µg/10g para a amostra 2; 1,0 µg/10g para a amostra 3 e 0,5 µg/10g para a amostra 4. Na literatura, alguns trabalhos informam também a não determinação da vitamina B₁₂ devido à sua baixa concentração nos produtos avaliados (ZAFRA-GÓMEZ *et al.*, 2006; CHU & TIN, 1998), ou relatam a sua determinação após uma fortificação da amostra com esta vitamina (MORENO & SALVADÓ, 2000).

Os **Anexos 1 e 2** mostram os perfis dos espectros de absorção das vitaminas do complexo B determinadas neste trabalho, que foram utilizados como parâmetros de identificação destas vitaminas nas amostras, através do software Chemstation.

As curvas analíticas traçadas por padronização externa estão apresentadas nos **Anexos 3 e 4**, apresentando boa linearidade, cujos valores estão apresentados na Tabela 16.

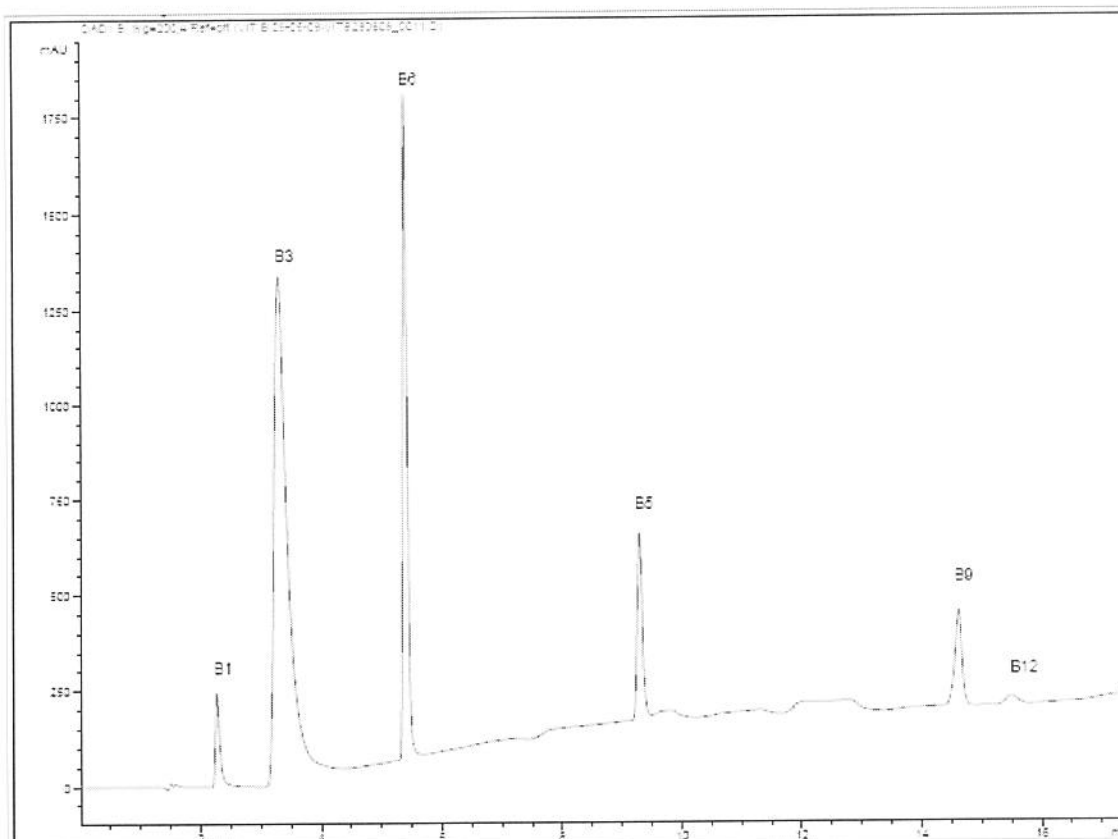


Figura 8: Perfil cromatográfico de solução padrão contendo as vitaminas B₁, B₃, B₅, B₆, B₉ e B₁₂ usando detector de arranjo de diodos (UV-VIS) a 200 nm. Coluna Agilent Zorbax SB-C18 SB (Stable Bound) 3,5µm 4,6 x 150 mm. Fase móvel: 99,7% de solução acidificada (KH₂PO₄ 0,05 M pH ajustado a 2,25 com H₃PO₄) e fase orgânica metanol (fase móvel B), (programação de gradiente 1): 0,3 min – 0,3% da fase móvel B; 5,0 min – 15,0% da fase móvel B; 10,0 min – 25,0 % da fase móvel B; 20,0 min – 40,0 % da fase móvel B. Volume de injeção : 10µL

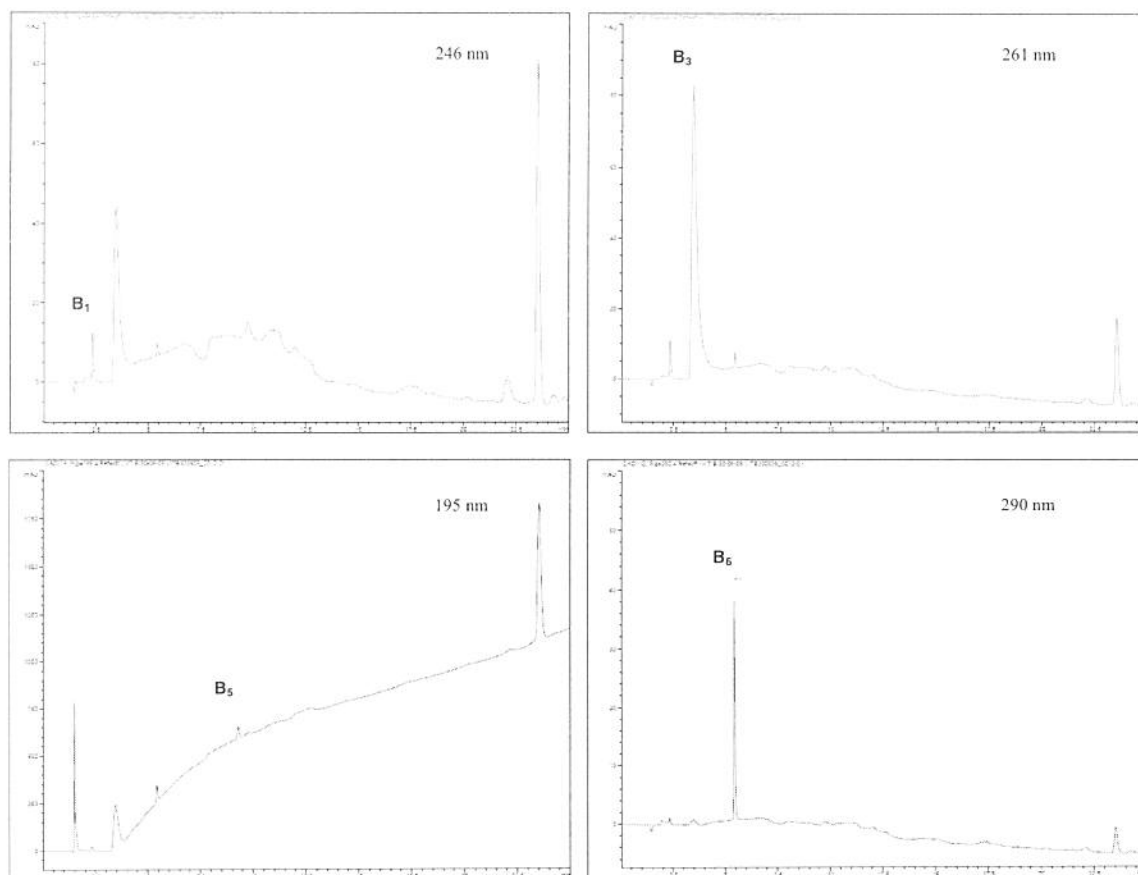


Figura 9: Perfil cromatográfico de uma amostra de creme vegetal enriquecido com as vitaminas B₁, B₃, B₅, e B₆ usando detector de arranjo de diodos (UV-VIS) a 246 nm para vitamina B₁, 261 nm para vitamina B₃, 195 nm para vitamina B₅ e 290 nm para vitamina B₆. Coluna Agilent Zorbax SB-C18 SB 3,5 μ m 4,6x150 mm. Fase móvel: 99,7% de solução acidificada (KH_2PO_4 0,05M pH ajustado a 2,25 com H_3PO_4) e fase orgânica metanol (fase móvel B), (programação de gradiente 1): 0,3 min – 0,3% da fase móvel B; 5,0 min – 15,0% da fase móvel B; 10,0 min – 25,0 % da fase móvel B; 20,0 min – 40,0 % da fase móvel B. Volume de injeção: 10 μ L

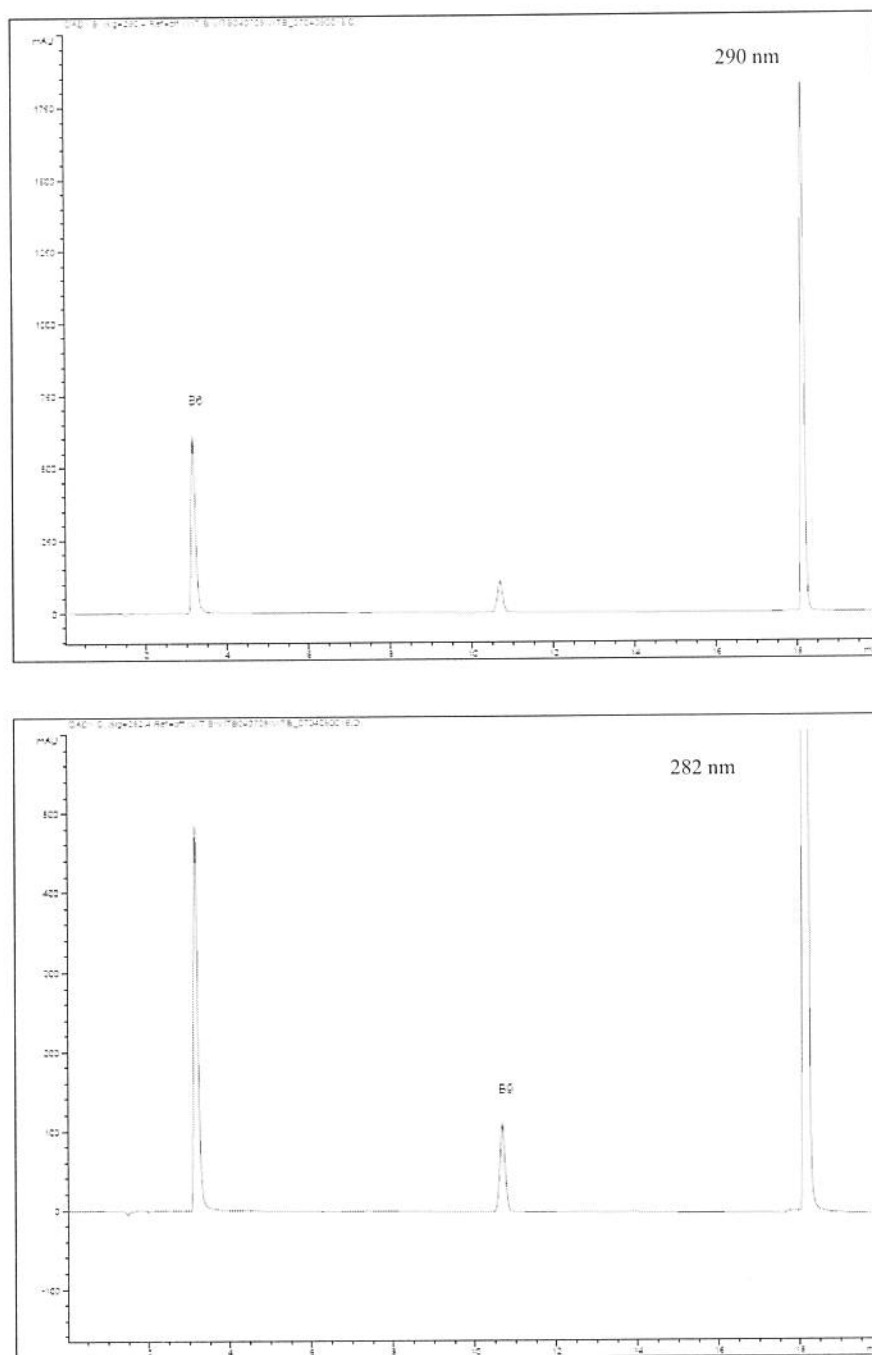


Figura 10: Perfil cromatográfico de uma amostra de creme vegetal enriquecido com as vitaminas B₆, B₉ e B₁₂ usando detector de arranjo de diodos (UV-VIS) a 290 nm para vitamina B₆, 282 nm para vitamina B₉ e 362 nm para vitamina B₁₂. A vitamina B₁₂ não foi detectada. Coluna Agilent Zorbax SB-C18 SB 3,5µm 4,6x150 mm. Fase móvel: 92,5% de solução acidificada (KH₂PO₄ 0,05M pH ajustado a 2,25 com H₃PO₄) e fase orgânica metanol (fase móvel B), (programação de gradiente 2): 0,6 min – 15,0% da fase móvel B; 15,0 min – 40,0% da fase móvel B; 15,1 min – 60,0 % da fase móvel B; 20,0 min – 60,0 % da fase móvel B. Volume de injeção: 100µL

Na Tabela 16, estão apresentados: tempos de retenção obtidos para as todas vitaminas envolvidas utilizando-se a programação de gradiente (1), tempos obtidos para as vitaminas B₆, B₉ e B₁₂ na programação de gradiente (2), respectivos comprimentos de onda utilizados para sua determinação e os valores de R² para avaliação da faixa de linearidade.

Tabela 16: Tempo de retenção, comprimento de onda utilizado e R² obtido nas curvas analíticas.

Vitaminas	Tempo de Retenção (min)		λ (nm)	Linearidade R ²
	Programação (1)	Programação (2)		
B ₁ (Tiamina)	2,3	-	246	0,9998 (1)
B ₃ (Niacina)	3,1	-	261	0,9999 (1)
B ₅ (Ác. Pantotênico)	9,3	-	195	0,9994 (1)
B ₆ (Piridoxina)	5,6	3,2	290	1 (1) 0,9990 (2)
B ₉ (Ácido Fólico)	14,6	10,8	282	1 (2)
B ₁₂	15,5	11,7	362	0,9997 (2)

(1) Gradiente 1 ; (2) Gradiente 2.

Limites de detecção

A Tabela 17 apresenta os limites de detecção obtidos neste trabalho. Para a programação de gradiente (1), os limites de detecção obtidos estão próximos aos dados obtidos em literatura para produtos enriquecidos utilizando este tipo de detector (CHEN & WOLF, 2006; ZAFRA-GOMÉZ *et al.*, 2006; ALBALÁ-HURTADO *et al.*, 1997; AGOSTINI, 1996), com exceção do ácido pantotênico, que apresentou limite de detecção maior. Em outro trabalho, limite de detecção próximo para o ácido pantotênico foi obtido para a mesma coluna SB-C18 utilizada (HUBE, 2003).

Já para a programação de gradiente (2), os limites de detecção obtidos para a piridoxina, ácido fólico e vitamina B₁₂ estão abaixo do que foi encontrado por Zafra-Goméz *et al.*, 2006. O limite de detecção obtido para o ácido fólico utilizando a programação de gradiente (2) está pouco abaixo ao encontrado por Catharino *et al.*, 2006 (0,005 µg/mL), porém pouco maior do que obtido por Lima, 2001 (0,0013 µg/mL). Na Tabela 18, estão indicados os limites de detecção encontrados em literatura.

Tabela 17: Limites de detecção obtidos neste trabalho

Vitaminas	Limite de detecção (µg/mL)	
	Programação (1) 10 µL	Programação (2) 100 µL
B ₁ (Tiamina)	0,045	-
B ₃ (Niacina)	0,05	-
B ₅ (Ác. Pantotênico)	2,3	-
B ₆ (Piridoxina)	0,04	0,0025
B ₉ (Ácido Fólico)	0,03	0,003
B ₁₂	0,1	0,005

Tabela 18: Limites de detecção (µg/mL) encontrados em literatura.

Vitaminas	CHEN & WOLF, 2006	AGOSTINI, 1996	CATHARINO <i>et al.</i> , 2006	ZAFRA- GOMÉZ <i>et al.</i> , 2006	LIMA, 2001	MORENO & SALVADÓ, 2000	ALBALÁ- HURTADO <i>et al.</i> , 1997
B ₁	0,1	0,04	-	0,02	-	3,18	0,1
B ₃	0,05	0,1	-	0,01	-	9,92	0,05
B ₅	-	-	-	0,02	-	-	-
B ₆	0,05	0,08	-	0,04	-	1,37	0,05
B ₉	0,05	-	0,005	0,02	0,0013	-	0,05
B ₁₂	0,3	-	-	0,02	-	0,04	0,3

Exatidão do método

A exatidão foi determinada pelas análises de amostras que foram fortificadas com padrões das vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ (programação de gradiente 1, volume de injeção 10 µL) e das vitaminas B₆, B₉ e B₁₂ (programação de gradiente 2, volume de injeção 100 µL). A Tabela 19 apresenta a porcentagem de recuperação obtida. Os resultados obtidos variaram de 98 a 110%. Este último valor com maior variação foi obtido para a tiamina, principalmente devido à baixa concentração prevista para esta vitamina neste produto.

Tabela 19: Porcentagem de recuperação obtida.

Vitaminas	Valor adicionado (mg/10g)			Recuperação (%) *								
	I	II	III	I	DP	CV%	II	DP	CV%	III	DP	CV%
B ₁ (1)	0,09	0,18	0,24	107	6,2	5,8	109	4,0	4,0	110	1,4	1,3
B ₃ (1)	2,65	6,17	8,10	101	0,3	0,3	98	1,0	1,0	102	0,8	0,8
B ₅ (1)	1,71	1,97	2,57	104	1,0	1,0	100	1,0	1,0	100	0,5	0,5
B ₆ (1)	0,22	0,44	0,64	103	0,8	0,7	101	1,1	1,1	102	1,1	1,0
B ₆ (2)	0,25	0,60	0,83	106	0,3	0,2	107	0,5	0,5	103	0,8	0,7
B ₉ (2)	0,05	0,11	0,14	99	1,2	1,3	102	1,6	1,6	100	2,9	2,8
B ₁₂ (2)	0,005	0,01	0,05	98	2,1	2,1	104	2,7	2,6	98	0,9	0,9

* Valores são médias de determinações em triplicata.

DP = estimativa do desvio padrão; CV = coeficiente de variação; (1) Gradiente 1 ; (2) Gradiente 2.

I, II, III = três níveis de fortificação das amostras.

Repetibilidade do método

A repetibilidade do método foi fornecida por análises (n = 5) de dois dos produtos analisados, amostra 1 e amostra 4 para as programações de gradiente (1) e (2) respectivamente, realizadas num intervalo de 2 a 3 dias. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 20 e 21. Para a amostra contendo as

vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ (Gradiente 1), o desvio padrão relativo foi de 0,0181; 0,1502; 0,1763 e 0,0169 para as respectivas vitaminas; os coeficientes de variação maiores foram obtidos para as vitaminas B₁ e B₅ (6,3 e 6,9 respectivamente) e menores para as vitaminas B₃ e B₆ (2,0 e 2,5). Para a amostra contendo as vitaminas B₆ e B₉ (Gradiente 2), o desvio padrão relativo foi de 0,0324 e 0,0037, e os coeficientes de variação foram 2,6 e 2,7% para as respectivas vitaminas. A repetibilidade do método pode ser considerada boa, pois as variações existentes entre as medições obtidas foram menores do que os valores de repetibilidade (Tabelas 20 e 21). Pela fórmula preconizada por HORWITZ (1980), os coeficientes de variação foram maiores do que os obtidos para as análises, demonstrando também que a variação é aceitável.

Tabela 20 – Valores dos teores de vitamina B₁, B₃, B₅ e B₆ obtidos para o teste de repetibilidade (Gradiente 1)

	Vitaminas (mg/10g)			
	B ₁ (Tiamina)	B ₃ (Niacina)	B ₅ (Ác. Pantotênico)	B ₆ (Piridoxina)
	0,2877	7,3748	2,4698	0,6896
	0,2702	7,4447	2,6095	0,6737
	0,2958	7,4683	2,5456	0,7065
	0,2721	7,1155	2,1871	0,6617
	0,3139	7,4714	2,5730	0,6830
Média	0,2879	7,3749	2,4770	0,6829
DP	0,0181	0,1502	0,1700	0,0169
CV %	6,3	2,0	6,9	2,5
r (CAULCUTT & BODDY, 1983)	0,0710	0,5904	0,6684	0,0663
CV% (HORWITZ, 1980)	9,65	5,92	6,98	8,47

Tabela 21 – Valores dos teores de vitamina B₆ e B₉ obtidos para o teste de repetibilidade (Gradiente 2)

	Vitaminas (mg/10g)	
	B ₆ (Piridoxina)	B ₉ (Ácido Fólico)
	1,2193	0,1374
	1,2857	0,1387
	1,2496	0,1415
	1,2007	0,1363
	1,2476	0,1456
Média	1,2406	0,1399
DP	0,0324	0,0037
CV %	2,6	2,7
r (CAULCUTT & BODDY, 1983)	0,1276	0,0146
CV% (HORWITZ, 1980)	7,74	10,76

Avaliação das amostras

As Tabelas 22, 23, 24 e 25 apresentam as concentrações e porcentagens de retenção obtidas para os lotes com diferentes datas de fabricação das amostras 1, 2, 3 e 4 respectivamente, e os gráficos 2, 3, 4 e 5 apresentam as retenções destas vitaminas em função do tempo decorrido de vida de prateleira para os lotes analisados.

Para a **amostra 1**, contendo as vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆, os maiores teores destas vitaminas encontrados nas amostras foram respectivamente de 0,284; 7,410; 0,271 e 0,578 mg/10 g, correspondendo a sobredosagem de cerca de 58; 40; 38 e 34 % em relação ao conteúdo declarado. O lote analisado com maior tempo de vida de prateleira apresentou as respectivas retenções de 119,6%; 130,5%; 95,9% e 101,4% para as vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆. Assim, considerando a retenção do lote analisado com menor tempo de vida de prateleira para o de maior tempo houve uma variação de retenção de 35 % para a vitamina B₁, 10% para a vitamina B₃, 42 % para a vitamina B₅ e 33% para a vitamina B₆.

Tabela 22: Resultados das vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ obtidos para os diferentes lotes da Amostra 1

Data Fab. (*)	Data Análise	Tempo (meses)	Concentração (mg/10g)				
			M ± DP		CV (%)		
			B ₁ (Tiamina)	B ₃ (Niacina)	B ₅ (Ácido Pantotênico)	B ₆ (Piridoxina)	
27/05/09	26/07/09	2,0	0,279 ± 0,012	7,410 ± 0,049	2,270 ± 0,003	0,578 ± 0,014	3
23/03/09	30/05/09	2,3	0,284 ± 0,012	7,212 ± 0,018	2,225 ± 0,100	0,549 ± 0,009	2
26/04/09	27/07/09	3,0	0,271 ± 0,013	7,216 ± 0,036	2,239 ± 0,006	0,564 ± 0,002	0
23/02/09	30/05/09	3,2	0,267 ± 0,012	7,266 ± 0,074	2,247 ± 0,125	0,563 ± 0,006	1
29/11/08	30/05/09	6,0	0,215 ± 0,015	6,889 ± 0,056	1,582 ± 0,125	0,436 ± 0,005	1
Valor declarado			0,18	5,28	1,65	0,43	

% Retenção (**)							
27/05/09	26/07/09	2,0	154,9	140,3	137,6	134,3	
23/03/09	30/05/09	2,3	157,7	136,6	134,8	127,7	
26/04/09	27/07/09	3,0	150,3	136,7	135,7	131,2	
23/02/09	30/05/09	3,2	148,4	137,6	136,2	130,8	
29/11/08	30/05/09	6,0	119,6	130,5	95,9	101,4	

(*) potes de 250 g; (**) % retenção obtida a partir do valor declarado no rótulo do produto.

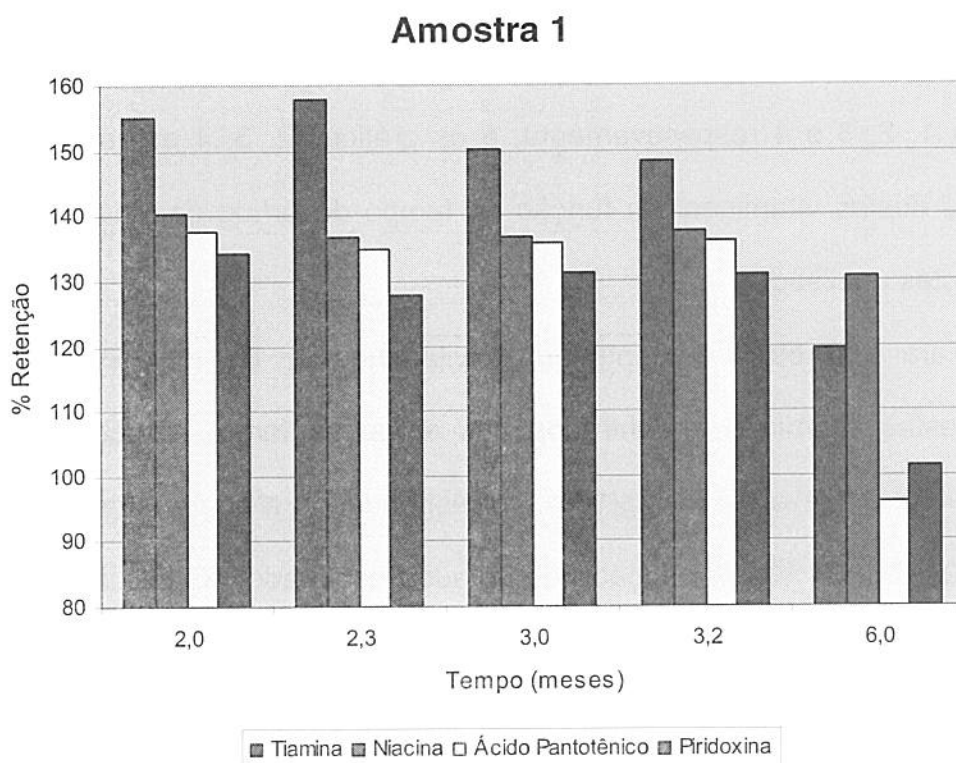


Gráfico 2: Valores da porcentagem de retenção das vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ x tempo de vida de prateleira dos lotes analisados da amostra 1.

Tabela 23: Resultados das vitaminas B₆ e B₉, obtidos para os diferentes lotes da Amostra 2.

Data Fabricação	Data Análise	Tempo (meses)	Concentração (mg/10g)				% Retenção (**)	
			M ± DP		CV (%)		B ₆	B ₉
			B ₆ (Piridoxina)		B ₉ (Ácido Fólico)			
02/06/09(*)	18/05/09	0,9	1,220±0,055	4,5	0,279±0,007	2,6	122,0	139,3
16/04/09	04/07/09	1,1	1,337±0,023	1,7	0,265±0,001	0,4	133,7	132,7
20/02/09	01/06/09	3,4	1,214±0,062	5,1	0,270±0,020	2,2	121,4	135,2
29/12/08	01/06/09	5,1	1,257±0,033	2,6	0,238±0,004	2,4	125,7	118,9
06/01/09(*)	04/07/09	5,9	1,139±0,025	2,2	0,208±0,000	0,2	113,9	104,0
Valor declarado			1		0,2			

(*) potes de 250 g.; os demais potes são de 500g.

(**) % retenção obtida a partir do valor declarado no rótulo do produto.

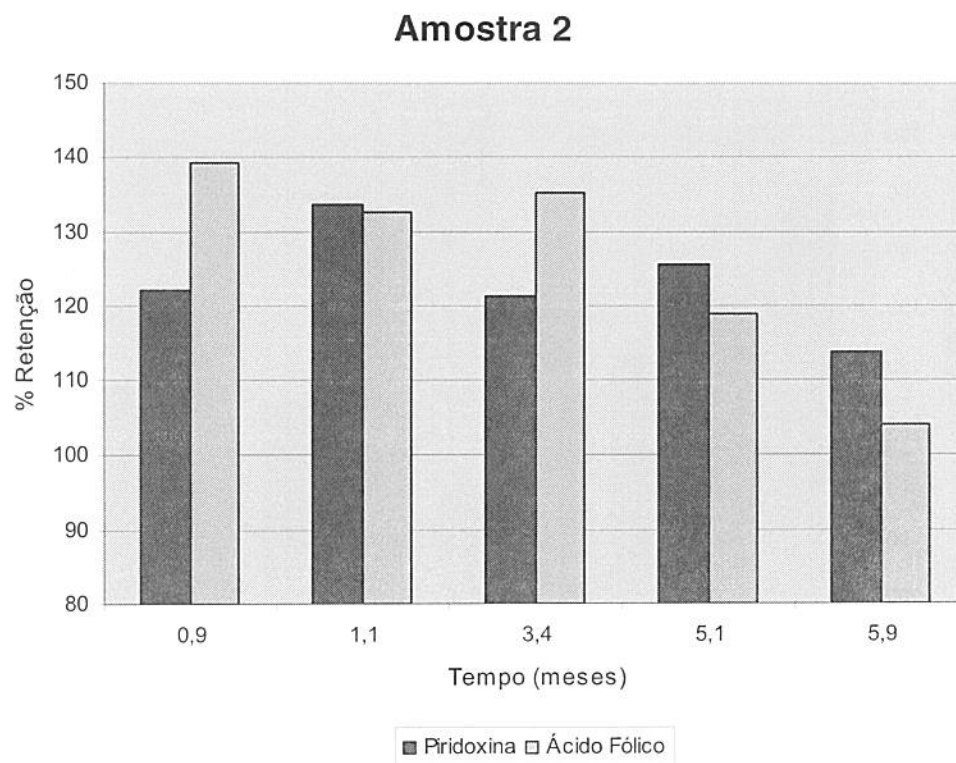


Gráfico 3: Valores da porcentagem de retenção das vitaminas B₆ e B₉ x tempo de vida de prateleira das amostras analisadas para a Amostra 2.

Tabela 24: Resultados das vitaminas B₆ e B₉ obtidos para os diferentes lotes da Amostra 3.

Data Fabricação	Data Análise	Tempo (meses)	Concentração (mg/10g)		M ± DP	CV (%)	% Retenção (**)	
			B ₆ (Piridoxina)	B ₉ (Ácido Fólico)			B ₆	B ₉
11/07/09	11/08/09	1	1,516±0,022	1,4	0,207±0,002	0,8	151,6	168,7
28/03/09	10/08/09	4,4	1,219±0,047	3,8	0,138±0,001	0,6	121,9	115,0
11/03/09	11/08/09	5,0	0,982±0,004	0,4	0,113±0,004	3,3	98,21	94,0
30/01/09(*)	10/08/09	6,3	1,146±0,004	0,4	0,117±0,002	1,3	114,5	97,4
14/01/09(*)	10/08/09	6,9	1,173±0,065	5,5	0,124±0,008	6,1	117,3	103,0
Valor declarado			1		0,12			

(*) potes de 250 g.; os demais potes são de 500g.

(**) % retenção obtida a partir do valor declarado no rótulo do produto.

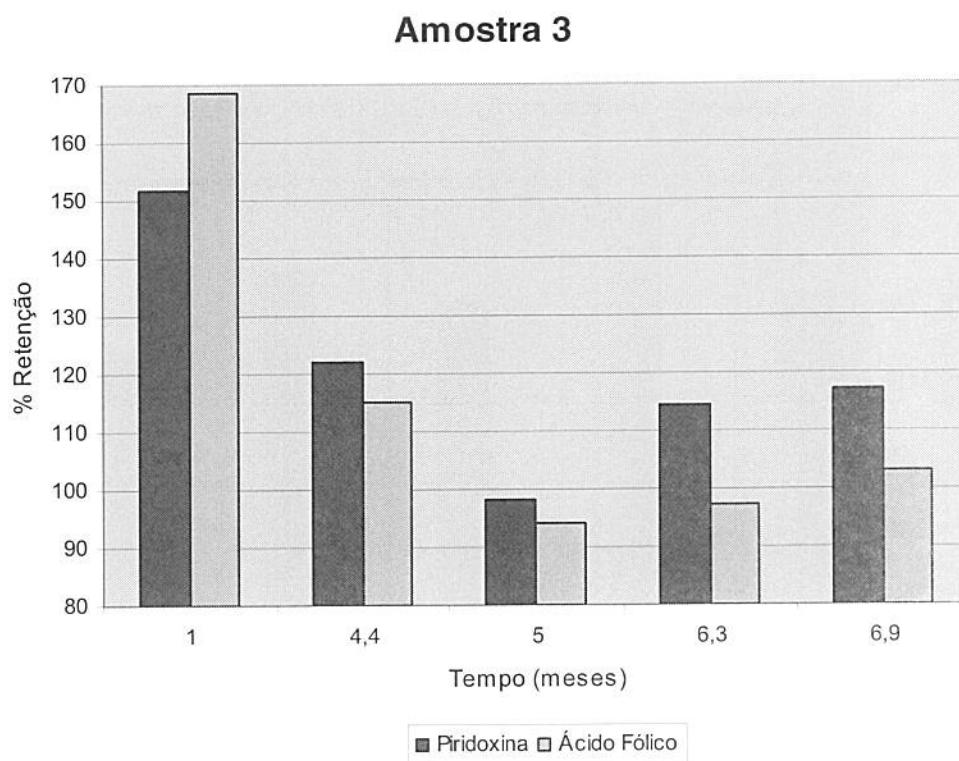


Gráfico 4: Valores da porcentagem de retenção das vitaminas B₆ e B₉ x tempo de vida de prateleira dos lotes analisados para a Amostra 3.

Tabela 25: Resultados das vitaminas B₆ e B₉, obtidos para os diferentes lotes da Amostra 4.

Data Fabricação (*)	Data Análise	Tempo (meses)	Concentração (mg/10g)				% Retenção (**)	
			M ± DP		CV (%)		B ₆	B ₉
			B ₆ (Piridoxina)		B ₉ (Ácido Fólico)			
07/05/09	05/07/09	1,9	0,675±0,021	3,0	0,141±0,006	4,3	135,0	141,0
06/04/09	30/06/09	2,8	0,625±0,006	0,9	0,116±0,003	2,9	125,0	116,2
14/03/09	05/07/09	3,7	0,594±0,009	1,5	0,109±0,002	1,6	118,8	109,3
13/01/09	05/07/09	5,7	0,558±0,005	0,5	0,097±0,000	0,1	111,5	97,1
Valor declarado			0,5		0,1			

(*) potes de 250 g; (**) % retenção obtida a partir do valor declarado no rótulo do produto.

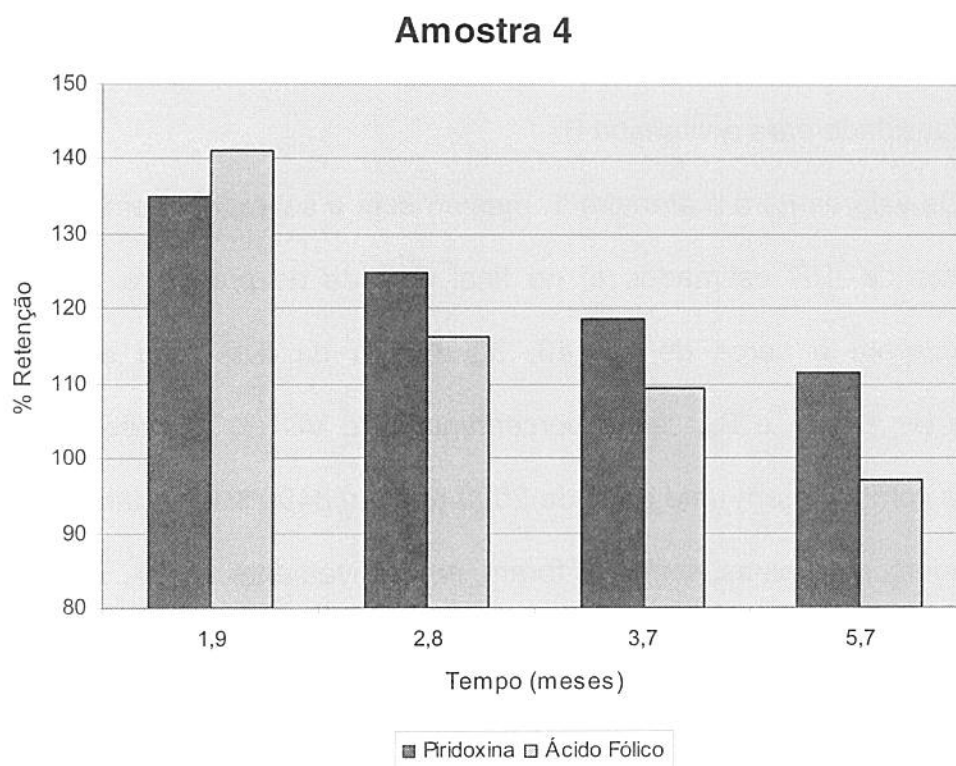


Gráfico 5: Valores da porcentagem de retenção das vitaminas B₆ e B₉ x tempo de vida de prateleira dos lotes analisados para a Amostra 4.

Considerando os resultados obtidos para a amostra 1, houve maior evidência de estabilidade para a vitamina B₃, seguida da vitamina B₆ e vitamina B₁, e por último pela vitamina B₅.

No Gráfico 2, apresentando os resultados da porcentagem de retenção para as vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆ versus tempo da vida de prateleira dos lotes analisados para a amostra 1, percebe-se pouca variação dos resultados de retenção destas vitaminas para os 4 primeiros lotes analisados, o que demonstra certa coerência entre as amostras, já que o tempo de vida útil entre estes lotes variaram apenas 1,2 meses. Já o último lote analisado com 6,0 meses apresentou sensível redução da vitamina B₅, moderada redução para as vitaminas B₁ e B₆ e maior estabilidade para a vitamina B₃.

Os valores para a amostra 1, mesmo com a sobredosagem, foram abaixo dos valores de IDR estimados e, no final da vida de prateleira, estes valores corresponderam a cerca de 18, 43, 32 e 34% da IDR para as respectivas vitaminas B₁, B₃, B₅ e B₆. Já as porcentagens de VD (% de valores diários de referência com base em uma dieta de 2000 Kcal ou 8400 KJ) declaradas no rótulo deste produto, para estas vitaminas foram, respectivamente 15, 33, 33 e 33%.

Para a **amostra 2**, contendo as vitaminas B₆ e B₉, os maiores teores destas vitaminas encontrados nas amostras foram respectivamente de 1,337 e 0,279 mg/10 g, correspondendo a sobredosagem de cerca de 34 e 39 % em relação ao conteúdo declarado. Considerando a diferença entre o maior valor de retenção para o menor valor obtido, as variações foram de 20% para a vitamina B₆ e de 36% para a vitamina B₉. O Gráfico 3, quanto ao ácido fólico, apresenta

pouca variação nos 3 primeiros lotes analisados, já no quarto e quinto lotes avaliados, percebe-se uma redução gradual desta vitamina; quanto à vitamina B₆, apresenta variação pouco maior para os primeiros 4 lotes analisados, já o quinto lote também mostrou o menor resultado desta vitamina.

Para a **amostra 3**, contendo as vitaminas B₆ e B₉, os maiores teores destas vitaminas encontrados nas amostras foram respectivamente de 1,516 e 0,207 mg/10 g, correspondendo a sobredosagem de cerca de 52 e 69 % em relação ao conteúdo declarado; valores maiores de sobredosagem foram observados para esta amostra em relação às amostras 2 e 3. A variação obtida na retenção entre o lote de menor tempo de vida de prateleira para o de maior tempo, para a amostra 3, foi de 34% para a vitamina B₆ e de 66% para a vitamina B₉, evidenciando assim maior redução para o ácido fólico. O Gráfico 4 demonstra a maior variação obtida para estas vitaminas entre os lotes avaliados, ainda assim, maior evidência de estabilidade foi observada para a vitamina B₆ em comparação à vitamina B₉.

Para a **amostra 4**, também contendo as vitaminas B₆ e B₉, os maiores teores destas vitaminas encontrados nas amostras foram respectivamente de 0,675 e 0,141 mg/10 g, correspondendo a sobredosagem de cerca de 35 e 41 % em relação ao conteúdo declarado. Considerando a diferença entre o maior valor de retenção para o menor valor obtido, as variações foram de 23% para a vitamina B₆ e de 44% para a vitamina B₉. Houve, portanto, novamente evidência de menor estabilidade para a vitamina B₉. O Gráfico 5 apresenta gradual redução destas vitaminas entre os lotes analisados com diferentes tempos de vida de prateleira, evidenciando maior estabilidade para a vitamina B₆.

Considerando-se a variação na retenção obtida para a vitamina B₆ nas amostras 2, 3 e 4 (20, 34 e 23%) e a variação na retenção obtida para a vitamina B₉ nas amostras 2, 3 e 4 (36, 66 e 44%), confirmou-se a menor estabilidade para o ácido fólico para as 3 amostras avaliadas, comparada à piridoxina.

No trabalho de Lima, 2001 avaliando-se ácido fólico em margarina, foi evidenciada uma retenção de ácido fólico após 3 meses de 46%, ou seja, uma variação de 54%, valor este que está entre os valores obtidos para a amostra 3 e amostra 4.

Os valores de % de VD (valores diários de referência com base numa dieta de 2000 Kcal ou 8400 KJ) declarados no rótulo dos produtos, para as vitaminas B₆ e B₉ foram respectivamente: 76 e 83% para a amostra 2, 77 e 50% para a amostra 3 e, 38 e 42% para a amostra 4. E os obtidos neste trabalho, para as vitaminas B₆ e B₉, respectivamente no lote com maior tempo de vida de prateleira foram respectivamente: 88 e 87% para a amostra 2, 90 e 52% para a amostra 3 e, 43 e 40 % para a amostra 4. Ou seja, a maior variação neste caso foi obtida para vitamina B₆ na amostra 3, porém foi menor do que 20%.

As amostras 2, 3 e 4 apresentaram teores abaixo dos valores de IDR (Ingestão Diária Recomendada) com exceção de alguns lotes das amostras 2 e 3 que, com a sobredosagem, apresentaram o conteúdo dessas vitaminas pouco acima das IDRs. Dessa forma, a amostra 2 apresentou um lote com conteúdo da vitamina B₆ 2,8% acima da IDR e três lotes com conteúdo de ácido fólico 16%, 10% e 12% acima da IDR. A amostra 3 apresentou apenas um lote com conteúdo da vitamina B₆ 17% acima da IDR. Estes valores estão bem abaixo da UL (limite

máximo recomendável) para estas vitaminas (100 mg para a vitamina B₆, e 1 mg para a vitamina B₉).

As diferentes retenções obtidas para as diferentes amostras analisadas neste caso talvez possam ser explicadas em função das diferentes formulações, as respectivas estabilidades destas vitaminas nestes produtos, condições de acondicionamento, variação de processo e ingredientes. No lotes analisados com maior tempo de vida de prateleira, as retenções menores obtidas foram de 95,9% e 94% (ácido pantotênico – amostra 1 e ácido fólico – amostra 3) e a maior retenção obtida foi de 117,3 (piridoxina – amostra 3), atendendo assim às quantidades declaradas no rótulo dos produtos analisados.

A Legislação Brasileira admite uma tolerância de 20% com relação aos valores de nutrientes declarados no rótulo. Para produtos que contenham micronutrientes em quantidade superior à tolerância estabelecida, a empresa responsável deve manter a disposição estudos que justifiquem tal variação (BRASIL, 2003). Além disto, na Portaria nº 32, consta que “para garantir a dosagem especificada na rotulagem, é permitida a sobredosagem de vitaminas e ou minerais, desde que justificada tecnologicamente” (BRASIL, 1998). A instabilidade das vitaminas mostra a necessidade de sobredosá-las para assegurar os níveis requeridos pela legislação e declarados na embalagem ao final da vida de prateleira dos produtos (GARCIA & PENTEADO, 2005).

Quanto à informação nutricional realizada pelas empresas com relação ao conteúdo de vitaminas, a legislação brasileira, Portaria nº 27, (BRASIL, 1998) prevê que para vitaminas e minerais, no caso de alimentos sólidos, o termo fonte pode ser utilizado quando o conteúdo for no mínimo de 15% da IDR de referência

por 100 g, e o termo alto teor ou rico pode ser utilizado quando o conteúdo for no mínimo 30% da IDR por 100 g.

CONCLUSÕES

A simplicidade e rapidez do método por CLAE, desde a preparação da amostra e os dados obtidos em sua validação indicam sua eficiência na determinação simultânea das vitaminas B₁, B₃, B₅, B₆ e B₉, em cremes vegetais enriquecidos.

As maiores vantagens do método proposto foram a determinação simultânea de cinco vitaminas de uso comum em alimentos enriquecidos e uma redução do tempo requerido para a extração. Além disto, este método economiza uma quantidade substancial de reagentes quando comparado a métodos oficiais, e mínima manipulação da amostra é alcançada devido aos poucos passos requeridos.

Pelos resultados encontrados para a **amostra 1**, houve maior evidência de estabilidade para a vitamina B₃, seguida das vitaminas B₆ e B₁ e por último a vitamina B₅. Com base nos valores obtidos, este produto pode ser considerado **fonte** da vitamina B₁ e **alto teor** das vitaminas B₃, B₅ e B₆.

Para as **amostras 2, 3 e 4**, apresentando as vitaminas B₆, B₉ e B₁₂, as condições analíticas empregadas aliadas principalmente à baixa concentração da vitamina B₁₂ impossibilitaram a determinação desta vitamina nestes produtos. Considerando os resultados obtidos nestas 3 amostras avaliadas, houve maior evidência da estabilidade da vitamina B₆ em relação à vitamina B₉. Os resultados obtidos também demonstram que esses produtos continham **alto teor** das vitaminas B₆ e B₉.

Nos lotes analisados com maior tempo de vida de prateleira, os teores das vitaminas do complexo B obtidos neste trabalho se aproximaram dos valores declarados nos rótulos, indicando que as sobredosagens foram necessárias para garantir o declarado nos rótulos dos produtos ao final do tempo de prateleira e, que o produto creme vegetal é um veículo adequado ao enriquecimento destas vitaminas, desde que controle adequado da adição e sobredosagem das vitaminas sejam realizados durante a fabricação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACNIELSEN. **Tendências e Análises. Relatórios e estudos. Estudos globais:** os produtos mais quentes do mundo - alimentos e bebidas. 2008. Disponível em: <<http://br.nielsen.com/reports/reportesejecutivosglobales.shtml>>. Acesso em: 30 jul. 2009.

AGOSTINI, T. S. **Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea por CLAE, das vitaminas B1, B2, B6, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos.** 1966. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1996.

AGOSTINI, T.S.; GODOY, H. T. Simultaneous determination of nicotinamide, nicotinic acid, riboflavin, thiamin, and pyridoxine in enriched Brazilian foods by HPLC, **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 20, n. 4, p. 245-248, 1997.

AGOSTINI-COSTA, T.S.; SCHERER, R.; KOWALSKI, C.H.; PRADO, M.A.; GODOY, H.T. Simultaneous determination of B-group vitamins in enriched cookies. **Quimica Nova**. v. 31, n. 3, p. 546-550, 2008.

ALBALÁ-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUÉS, T. IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, 778, p. 247-53, 1997.

ALMAGRO, I.; SAN ANDRÉS, M.P.; VERA, S. Determination of water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a mobile phase containing sodium dodecylsulphate and n-propanol. **Chromatographia**. 55, p. 185-188, 2002.

ALMEIDA-MURADIAN, I.B. Ácido pantotênico. In: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**, Barueri-SP: Manole, 2003, cap. 12, p. 463-483.

AMERICAM HEART ASSOCIATION – **Know your fats** – Tips for consumers - Disponível em: <<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=532>>. Acesso em: 23 jul. 2009.

ARELLA, F.; LAHÉLY, S.; BOURGUIGNON, J.B. & HASSELMANN, C. Liquid chromatography determination of vitamins B₁ and B₂ in foods. A collaborative study. **Food Chemistry**. v. 56, n. 1, p. 81-86, 1996.

ARGOUEDELIS, C.J. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of all seven vitamin B₆ – related compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 790, p. 83-91, 1997.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 18th ed., AOAC International, Gaithersburg, Maryland, Ed. William Horwitz, 2005.

BALL, G.F.M. **Water-soluble vitamin assays in human nutrition**. London: Chapman & Hall, 1994, 416p.

BALL, G.F.M. **Vitamins in food: analysis, bioavailability and stability**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group, 2006, 785 p.

BANNWART, A. Artigos. **Margarinas na Panificação**. Disponível em: <http://www.padariamoderna.com.br/lermais_materiais.php?cd_materias=164>. Acesso em: 06 ago. 2009.

BARTHA, A.; STAHLBERGH, J. Electrostatic retention model of reversed-phase ion-pair chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.668, n.2, p.255-284, 1994.

BENDER, D. A. **Nutricional biochemistry of the vitamins**. 2nd Ed., London: Cambridge University Press, 2003. 488 p.

BERGAENTZLÉ, M.; ARELLA, F.; BOURGUIGNON, J.B.; HASSELMANN, C. Determination of vitamin B₆ in foods by HPLC – a collaborative study. **Food Chemistry**. v. 52 n. 1, 81 - 86, 1995.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina B₁. In: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**, Barueri-SP: Manole, 2003, cap. 7, p. 227-276.

BIANCHINI, R.; PENTEADO, M.D.V.C. Teores de tiamina, riboflavina e piridoxina em leites bovinos comercializados na cidade de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n.3, p. 291-299, 2000.

BIDLINGMEYER, B.A. Separation of ionic compounds by reversed-phase liquid chromatography: an update of ion-pairing techniques, **Journal of Chromatography Science**, 18, p. 525, 1980.

BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3 ed. rev. e atual. São Paulo: Varela, 2003. 238p.

BOGNÁR, A. & OLLILAINEN, V. Influence of extraction on the determination of vitamin B₆ in food by HPLC, **Zeitschrift fur Lebensmittel - Untersuchung und-Forschung; A**, 204, 327, 1997.

BOTTO, L.D.; MOORE, C.A.; KHOURY, M.J.; ERICKSON, J.D. Neural-tube defects. **New England Journal of Medicine**. 341, 1509-1519, 1999.

BRASIL. **Portaria nº 372 de 04 de setembro de 1997**. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Margarina. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov/sda/dipoa/regmargarina.htm>>. Acesso em: 05 jun. 2009.

BRASIL. **Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/27_98.htm>. Acesso em: 26 jun. 2009.

BRASIL. **Portaria nº 31 de 13 de janeiro de 1998**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/31_98.htm>. Acesso em: 26 jun. 2009.

BRASIL. **Portaria nº 32 de 13 de janeiro de 1998**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/32_98.htm>. Acesso em: 27 jan. 2010.

BRASIL. **Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1679>>. Acesso em: 01 ago. 2009.

BRASIL. **Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 05 jun. 2009.

BRASIL. **Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária de Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=1882>. Acesso em: 05 ago. 2009.

BRASIL. **Resolução RDC nº 270 de 22 de setembro de 2005**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18829&word=#>>. Acesso em 05 jun. 2009.

BRATTSTROM, L.; WILCKEN, D.E. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? **American Journal Clinical Nutrition**. 72, p. 315-323, 2000.

BRITISH NUTRITION FOUNDATION. Healthy Eating. Food Science /Labels. Fortification. Disponível em: <<http://www.nutrition.org.uk/printArticle.asp?dataId.=1176>>. Acesso em: 25 jun. 2009.

BURLINGAME, B. Food processing and the fate of food components. **Journal of Food Composition and Analysis**. 19 (4), 251, 2006.

CANCER RESEARCH UK. **Diet after stomach surgery**. 2008. Disponível em: <<http://www.cancerhelp.org.uk/type/stomach-cancer/living/diet-after-stomach-surgery>>. Acesso em: 14 jan. 2010.

CARVALHO, P.R.N. Estudos de vida-de-prateleira de alimentos enriquecidos. In: SEGUNDO SEMINÁRIO BRASILEIRO DE ALIMENTOS ENRIQUECIDOS, **Trabalhos apresentados...** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996, p. 5-8.

CASTRO, F. J.; SCHERER, R. ; GODOY, H. T. Avaliação do teor e da estabilidade de vitaminas do complexo B e vitamina C em bebidas isotônicas e energéticas – **Química Nova**, v.. 29, n. 4, p. 719-723, 2006.

CATHARINO, R. R; LIMA-PALLONE, J.A.; GODOY, H.T. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Química Nova**. v. 29, n. 5, p. 972-976, 2006.

CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistic for analytical chemists**. 1st ed.; London: Chapman and Hall, 1983, 253p.

CHEN, P.; WOLF, W.R. LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 387, p. 2441-2448, 2006.

CHU, K.O. TIN, K. C. Analysis of comercial multi-vitamin preparation by HPLC with diode array detector. **Analytical Letters**, v. 31, n. 5, p. 2707-2715, 1998.

CLARKE, R.; SMITH, A.D.; JOBST, K.A.; REFSUM, H.; SUTTON, L.; UELAND, P.M. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. **Archives of Neurology**. 55, p. 1449 -1455, 1998.

COLLINS, A. **Health dangers of gastric bypass surgery**. 2007. Disponível em: <<http://www.annecollins.com/health-dangers-of-bariatric-surgery.htm>>. Acesso em: 14 jan. 2010.

COLLINS, C.H.; BRAGRA, G.; BONATO, P.S.; **Fundamentos de cromatografia**. Campinas -SP: Editora da UNICAMP, 2006, 453 p.

COMBS JR., G.F. **The vitamins – Fundamental aspects in nutrition and health**. 2 ed. New York: academic Press, 1998. 618p.

DALY, L.E.; KIRKE, P.N.; MOLLOY, A.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention. **JAMA, Journal of the American Medical Association**, 274, p. 1698-1702, 1995.

DANTAS, V. Aumenta disputa no segmento de margarinas. **O Estado de São Paulo**. Publicado em 19 jun. 2000. Disponível em: <<http://www.estado.estadao.com.br/editorias/2000/06/19/eco343.html>>. Acesso em: 05 maio 2003.

DAWSON, K.R.; UNKLESBAY, N.F.; HEDRICK, H.B. HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate heat-processing methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v.36, p.1176-1179, 1988.

de BREE, A.; VERSCHUREN, W.M.; BLOM, H.J.; NADEAU, M.; TRIFBELS, F.J.; KROMHOUT, D. Coronary heart disease mortality, plasma homocysteine, and B-vitamins: a prospective study. **Atherosclerosis**. 166(2), p. 369-377, 2003.

DEFIBAUGH, P.W. Evaluation of selected enzymes for thiamine determination. **Journal - Association of Official. Analytical Chemists**. 70(3), p. 514-517, May-Jun 1987.

DRISKELL, J. A. Vitamin B₆ requeriments of humans. **Nutrition Research**. New York, v. 14, n.2, p. 293-294, 1994.

DRISKELL, J.A.; GIRAUD, D.W.; SUN, J.; JOO, S.; HAMOUZ, F.L.; DAVIS, S.L. Retention of the vitamin B₆, thiamin, vitamin E and selenium in grilled boneless pork chops prepared at five grill temperatures. **Journal of Food Quality**. v. 21, n. 3, p. 2101-2110, 1998.

DROGUETTI, C.D.; PENTEADO, M.V.C. Ácido Fólico. In: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**, Barueri-SP: Manole, cap. 12, 2003, p. 484-524.

EARL – Electronic Analytical Reference Library, **HPLC**. Disponível em: <<http://www.earl2learn.com/>>. Acesso em: 07 ago. 2009.

EKINCI, R. The effect of fermentation and drying on the water-soluble vitamin content of tarhana, a traditional Turkish cereal food. **Food Chemistry**, n. 90, p.127-132, 2005.

ENES, C. C.; SILVA, M. V. Disponibilidade de energia e nutrientes nos domicílios brasileiros no início do século XXI. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 31, n.1, p. 17-32, 2006.

ESTEVE, M.J.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A.; GARCIA-CANTABELLA, J.M. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in mushrooms by liquid

chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1450-1454, 2001.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals**. February, 2006. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/ScientificDocument/upperlevelopinionsfull-part33,0.pdf?ssbinary=true>> Acesso em: 20 ago. 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. FAO Corporate Document Repository. **Food Fortification Technology**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/w2840E/w2840e03.htm>>. Acesso em: 14 mar. 2010.

FINGLAS, P.M. & MORGAN, M.R.A. Application of biospecific methods to the determination of B-group vitamins in food – a review. **Food Chemistry**. v. 49, n. 2, p. 191-201, 1994.

FOOD STANDARDS AGENCY . **McCance and Widdowson's The Composition of Foods integrated dataset (CoF IDS), 2002 version**. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/science/dietarysurveys/dietsurveys/>>. Acesso em: 13 jun. 2009.

FRANCO, G. **Tabela de composição química de alimentos**. 8. ed., Rio de Janeiro – São Paulo: Livraria Atheneu Ed., 1992, 230 p.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H. T. Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. **Food Chemistry**. v. 106, p. 816-819, 2008.

FURLANI, R.P.Z. **Valor nutricional de cogumelos cultivados no Brasil**. 2004. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Teor de folatos em cogumelos comestíveis comercializados na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n. 2, p. 278-280, 2007.

GARCIA, T.; PENTEADO, M.V.C. Qualidade de balas de gelatina fortificadas com vitaminas A, C e E. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 25 (4), p. 743-749, 2005.

GENTILI, A.; CARETTI, F.; D'ASCENZO, G.; MARCHESE, S.; PERRET, D.; Di CORCIA, D.; ROCCA, L.M. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**. v. 22, n. 13, p. 2029-2043, 2008.

GIOIELLI, L.A. **Misturas binárias e ternárias de gorduras hidrogenadas na formulação de margarinas**. 1996. 253 f. Tese (Livre-Docência), Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1996.

GIOIELLI, L.A. Lipídios estruturados. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J., **Entendendo a gordura: Os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002, p. 457-465.

GIOVANNUCCI, E. STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; HUNTER, D.J.; FUCHS, C.; ROSNER, B.A.; SPEIZER, F.E.; WILLET, W.C. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. **Annals of Internal Medicine**. 129, p. 517-524, 1998.

GODFREY, P.S., TOONE, B. K.; CARNEY, M. W.; FLYNN, T.G.; BOTTIGLIERI, M.; LAUNDY, M.; CHANARIN, I.; REYNOLDS, E. H. Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. **Lancet**. 336, p. 392-395, 1990.

GONTHIER, A.; FAYOL, V.; VIOLLET, J. HARTMANN, D. J. Determination of pantothenic acid in foods: influence of the extraction method. **Food Chemistry**, v. 63, n.2, p.287-294, 1998.

GREGORY, J.F. Vitamins In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. Third Edition, New York: Marcel Dekker, Inc., 1996, p. 531-616.

GREGORY, J. F. III: Case study: folate bioavailability, **Journal of Nutrition**. 131, 4, 1376S -1382S, 2001.

GUILLAND, J.C.; LEQUEU, B. **As vitaminas: do nutriente ao medicamento**. 1.ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1995, 357p.

GUBLER, C.J. Thiamin. In: MACHLIN, L.J. ed. **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 233-281.

HALSTED, C. H. Water-soluble vitamins, In: GARROWS J.S.; JAMES, W.P.T. (eds). **Human nutrition and dietetics**. 9. ed. Singapore: Longman, 1993, p. 239-263.

HARRIS, R.S. General discussion on the stability of nutrients, In: KARMAS, E.; HARRIS, R. S. **Nutritional evaluation of food processing**. Third edition. New York: Van Nostrand Reinhold Company. New York. 1988. 765 p.

HARVARD School of Public Health. The Nutrition Source. **Three of the Bs: Folate, B6 and B12**. Disponível em: <<http://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/what-should-you-eat/vitamin-b/index.html>>. Acesso em: 23 jul. 2009.

HEUDI, O.; KILINÇ, T.; FONTANANNAZ, P. Separation of water-soluble vitamins by reverse phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: application to polyvitaminated premixes. **Journal of Chromatography A**. 1070, p. 49-56; 2005.

HEUDI, O.; KILINÇ, T.; FONTANNAZ, P.; MARLEY, E. Determination of Vitamin B₁₂ in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction. **Journal of Chromatography A**. 1101, p. 63-68, 2006.

HOBBS, C.A.; SHERMAN, S.L.; YI, P.; HOPKINS, S.E.; TORFS, C.P.; HINE, R.J.; POGRIK, M.; ROZEN, R.; JAMES, S.J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. **American Journal of Human Genetics**. 67, p. 623-630, 2000.

HORWITZ, W.; KAMPS, L.R.; BOYER, K.W. Quality assurance in analysis of foods for trace constituents. **Journal of the AOAC**, v. 63, n.6, p. 1344-1354, 1980.

HUBE, U. **Analysis of Water-Soluble Vitamins by HPLC**. Agilent Publication Number 5968-2971E, 1/22/2003. Disponível em: <http://www.chem.agilent.com/en-US/Search/Library/_layouts/Agilent/PublicationSummary.aspx?whid=15386&liid=87>. Acesso em: 25 maio 2009.

HUI, Y.H. **Bailey's industrial oil and fat products**. 5. ed., v.3. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996a, p. 65-114.

HUI, Y.H. **Bailey's industrial oil and fat products**. 5. ed., v. 4. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996b, 679 p.

IMACE – International Margarine Association of the Countries of Europe – **Margarines and spreads – Statistical Information**. Disponível em: <<http://www.imace.org/margarine/stat.htm>>. Acesso em: 09 ago. 2009.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial Programa de Análises de Produtos. **Manteiga e margarina – Teor de Gordura e Colesterol em Alimentos - 7º Parte**. Disponível em: < [http : // www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/teorGordura7.asp](http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/teorGordura7.asp)>. Acesso em: 05 jun. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de orçamentos familiares 2002/2003: primeiros resultados. Brasil e grandes regiões**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004.

INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board. **Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline**, Washington, D.C, National Academic Press, 1998.

IVANOVIC, D.; POPOVIC, A.; RADULOVIC, D.; MEDENICA, M. Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 18, p. 999-1004, 1999.

JACOB, R. A.; SWENDSEID, M.E. Niacin. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD; INSTITUTO INTERNACIONAL DE CIENCIAS DE LA VIDA. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 6.ed. Washington: OPS, 1991, p. 186-193.

KODAMA, S.; YAMAMOTO, A.; MATSUNAGA, A. Direct chiral resolution of pantothenic acid using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in capillary eletrophoresis. **Journal of Chromatography A**. v. 811, p. 269-273, 1998.

KONINGS, E.J.M. Water-Soluble Vitamins. **General Referee Reports: Journal of AOAC International**. v. 88, n. 1, p. 329-330, 2005.

KONINGS, E.J.M.; ROOMANS, H.H.S.; DORANT, E.; GOLDBOHN, R.A.; SARIS, W.H.M.; van den BRANDT, P.A.; Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. **American Journal Clinical Nutrition** v. 73, p. 765-776, 2001.

KRISHNAN, P.G.; MAHMUD, L.; MATTHEES, D.P., Postcolumn fluorimetric HPLC procedure for determination of niacin content of cereals, **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 512-518, 1999.

LEBIEDZINSKA, A.; MARSZALL, M.L.; KUTA, J.; SZEFER, P. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B-1 (thiamine), B-6 (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B-12 in animal and plant foods. **Journal of Chromatography A**. v. 1173; n. 1-2; p. 71-80, 2007.

LEHNINGER, A.L.; **Princípios de Bioquímica**. Tradução Wilson Roberto Navega Lodi, Arnaldo Antonio Simões, São Paulo: Sarvier, 1984, 725p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 2nd. Ed, New York : Worth publishers, 1993, 1013p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. & COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed., coordenação de tradução Arnaldo Antonio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi, São Paulo: Sarvier, 2006, 1201p.

LEITE, C. F. Enriquecimento de Alimentos com Vitaminas. In: IV SEMINÁRIO BRASILEIRO DE ALIMENTOS ENRIQUECIDOS. Campinas, 2006. **Trabalhos apresentados...** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2006, p. 6 -12.

LEKLEM, J.E. Vitamin B₆ In: MACHLIN, L.J., 2.ed. **Handbook of vitamins**. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 341-392.

LEPORATI, A.; CATELLANI, D.; SUMAN, M.; ANDREOLI, R.; MANINI, P.; NIESSEN, W.M.A. Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to the analysis of water-soluble vitamins in Italian pasta. **Analytica Chimica Acta**. 531, 87-95, 2005.

LESKOVA, E.; KUBÍKOVA, J.; KOVÁČIKOVÁ, E.; KOSICKÁ, M.; PORUBSKÁ, J.; HOLCÍKOVÁ, K. Vitamins losses: retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 4, 252-276, 2006.

LI, H.B.; CHEN, F. Determination of vitamin B₁₂ in pharmaceutical preparations by a highly sensitive fluorimetric method. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**. v. 368, n. 8, p. 836-838, 2000.

LICHTENSTEIN, A.H.; ERKKILA, A.T.; LAMARCHE, B.; SCHWAB, U.S.; JALBERT, S.M.; AUSMAN, L.M. Influence of hydrogenated fat and butter on CVD risk factors: remnant-like particles, glucose and insulin, blood pressure and C-reactive protein. **Atherosclerosis**, Clare, v.171, n.1, p.97-107, 2003.

LIMA, J.A. **Contribuição ao estudo do ácido fólico em alimentos enriquecidos**. 2001. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001.

LIMA-PALLONE, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 530-535, 2008.

LUO, X.; CHEN, B.; DING, L.; TANG, F.; YAO, S. HPLC-ESI-MS analysis of vitamin B₁₂ in food products and in multivitamins-multimineral tablets. **Analytica Chimica Acta**. 562; p. 185-189, 2006.

MAHAN, L.K. & ESCOTT-STUMP, S. **Krause – alimentos, nutrição & dietoterapia**. 11ª Edição. São Paulo: Editora Rocca Ltda., 2005, 1242 p.

MANGELS, R. **Vitamin B12 in the vegan diet** – The vegetarian resource group. 2006. Disponível em: <<http://www.vegetarian-nutrition.info/positions/english/b12-vegetarian.php>>. Acesso em: 14 jan. 2010.

MANN, D. L.; WARE, G.M.; BONNIN, E.; EITENMILLER, R.R. Liquid chromatographic analysis of vitamin B₆ in reconstituted infant formula: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v. 88, n. 1, 30-36, 2005.

MARGARINE. **The manufacture of margarine and spreads**. Disponível em: <http://www.margarine.org.uk/pg_field5.htm>. Acesso em: 17 nov. 2006.

MARGARINE. **Butter & spreads – The facts**. Disponível em: <<http://www.margarine.org.uk/whatisspread-making.html>>. Acesso em: 09 ago. 2009.

MARTINDALE, W. H. The extra pharmacopoeia. London. Royal pharmaceutical Society. Ed. James, E. F. Reynolds, 31ed., 1996.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 3.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 386p.

MAYES, P. A. Estrutura e função das vitaminas hidrossolúveis. In: MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: bioquímica**. Cordenação e tradução Tomoko Higuchi; tradução Ezequiel Weisbich, Jamie F. Leyton, Vilma Leyton. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 1994.

McCORMICK, D.B. Niacin, riboflavin and thiamin. In: STIPANUK, M.H. ed. **Biological and physiological aspects of human nutrition**. New York: copyright, 2000, p. 458-596.

MEJIA, L.A. **Fortification of foods**: Historical development and current practices. Disponível em: <<http://www.unu.edu/unupress/food/8f1154e03.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2009.

MITTERMAYR, R.; KALMAN, A. TRISCONI, M.J.; HEUDI, O. Determination of vitamin B₅ in a range of fortified food products by reverse-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**. v.10032, p.1-6, 2004.

MORENO, P.; SALVADÓ, V. Determination of eight water – end fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 870, p. 207-215, 2000.

MORESCHI, E.C.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Comparação de métodos de análise para o ácido pantotênico em alimentos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 247-252, 2007.

NAKAZATU, M. **Como cozinhar fazendo escolhas saudáveis**. Disponível em: <<http://www.emforma.com.br/coluna/nutricao/>>. Acesso em: 07 ago. 2009.

NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. NHLBI. **High blood cholesterol: What you need to know – Lowering cholesterol with therapeutic lifestyle changes**. Disponível em: <<http://www.nhlbi.nih.gov/health/public/heart/chol/wyntk.htm>>. Acesso em: 23 jul. 2009.

NDAW, S.; BERGAENTZLÉ, M.; AOUDÉ-WERNER, D.; HALSSELMAN, C. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. **Food Chemistry**. v.71, p. 129-138, 2000.

NDAW, S.; BERGAENTZLÉ, M.; AOUDÉ-WERNER, D.; HALSSELMAN, C. Enzymatic extraction procedure for the liquid chromatographic determination of niacin in foodstuffs. **Food Chemistry**. v.78, p. 129, 2002.

NICOLAS, E.C.; PFENDDER, K.A. Fast and simple liquid chromatographic determination of nonphosphorylated thiamine in infant formula, milk, and other foods. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**. 73 (5), 792 – 798, 1990.

NOVELLI, G.D.; KAPLAN, N.O.; LIPMANN, F. The liberation of pantothenic acid from coenzyme A. **Journal of Biological Chemistry**., v. 177, p. 97-107, 1949.

OLLILAINEN, V.; FINGLAS, P.M. ; VAN DEN BERG, H.; FROIDMONT-GORTZ, I. Certification of B-group vitamins (B₁, B₂, B₅ and B₁₂) in four food reference materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 40, p. 315-321, 2001.

OLLILAINEN, V.; VAHTERISTO, L.; UUSI-RAUVA, A.; VARO, P.; KOIVISTOINEN, P.; HUITTUNEN, J. The HPLC determination of total thiamin (vitamin B₁) in foods. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 6, p. 152-165, 1993.

OTTAWAY, P.B. **The technology of vitamins in food**. London; New York: Backie Academic & Professional, 1993, 265p.

OTTAWAY, P.B. The stability of vitamins during food processing, In: HENRY, C.J.K.; CHAPMAN, C. (Eds.), **The nutrition handbook for food processors**. Boca Raton: CRC Press, 2002, p.247-264.

PAKIN, C.; BERGAENTZLÉ, M.; HUBSCHER, V.; AOUDÉ-WERNER, D.; HALSSELMAN, C. Fluorometric determination of pantothenic acid in foods by liquid chromatography with post-column derivatization, **Journal of Chromatography A**., 1035, 87, 2004.

PENTEADO, M. V. C. – **Vitaminas – Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos** – Barueri, SP: Manole, 2003, 612p.

PENTIEVA, K.; MCKILLOP, D.; DUFFY, N.; de DECKERE E.; JACOBS, R.G.J.M.; van der PUT, N.M.J.; MCNULTY, H. Acute absorption of folic acid from a fortified low-fat spread. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 57; n. 10; p. 1235-1241; 2003.

PHILIPPI, S.T. **Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional**. Brasília, ANVISA, FINATEC/NUT-UnB. 2001, 133p.

PROCON SP - Fundação PROCON SP. Categoria - **Cesta Básica**, Disponível em: <<http://www.procon.sp.gov.br/categoria.asp?id=111>>. Acesso em: 06 ago. 2009.

RIBANI, R.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIMM, E.B.; WILLET, W.C.; HU, F.B.; SAMPSON, L.; COLDITZ, G.A.; MANSON, J.E.; HENNEKENS, C.; STAMPFER, M.J. Folate and Vitamin B₆ From Diet and Supplements in Relation to Risk of Coronary Heart Disease Among Women. **JAMA, Journal of the American Medical Association**. 279, p. 359-364, 1998.

RODRIGUES, J. N.; MANCINI FILHO, J.; TORRES, R. P.; GIOIELLI, L. A. Caracterização físico-química de creme vegetal enriquecido com ésteres de fitosteróis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 4, p. 505-520, 2004.

ROMERA, J.M.; RAMIREZ, M; GIL, A. determination of pantothenic acid in infant milk formulas, **Journal of Dairy Science**. 79, p. 523-526, 1995.

ROUSSEAU, D. Fat crystals and emulsion stability – a review. **Food Research International**, v.33, n.1, p.3-14, 2000.

ROWE, J.P.; OGDEN, L. V.; PIKE, O.A.; STEELE, F. M.; DUNN, M.I. Effect of end-user preparation methods on vitamin content of fortified humanitarian food-aid commodities. **Journal of Food Composition and Analysis**. 22, 33-37, 2009.

SÁDECKÁ, J.; KARASOVÁ, G.; POLONSKÝ, J. Determination of pantothenic acid in food by capillary isotachopheresis. **European Food Research and Technology**. v. 216, p. 440-444, 2003.

SANT'ANA, H.M.P. **Análise de vitaminas do complexo B em carnes preparadas em serviço de alimentação**. 1998. 181 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 1998.

SANT'ANA, H.M.P. Vitamina B₁₂. In: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**, Barueri-SP: Manole, cap. 14, 2003, p. 525-550.

SAPOSNIK, G.S.; RAY, J.G.; SHERIDAN, P.; McQUEEN, M.; LONN, E. Homocysteine-lowering therapy and stroke risk, severity, and disability. **Stroke**, 40, p. 1365-1372, 2009.

SCHREINER, M., RAZZAZI, E., LUF, W. Determination of water-soluble vitamins in soft drinks and vitamin supplements using capillary electrophoresis. **Nahrung/Food**. v. 47, n. 4, p. 243-247, 2003.

SCHOONHOVEN, J.; SCHRIJVER, J.; BERG, J.; HAENEN, G.R.M.M. Reliable and sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorimetric detection for the analysis of vitamin B₆ in foods and feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1475-1480, 1994.

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**. v. 80, p. 795-824, 2000.

SEBASTIAN, M.S. & JATIVA, R. Berberi in a well-nourished Amazonian population. **Acta Tropica**, v.70, p.193-196, 1998.

SEGURA, J. A.; HERRERA, M.L.; ANON, M.C. Margarines: a rheological study. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.72, n.3, p.375-378, 1995.

SHARP, L.; LITTLE, J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A HuGE review. **American Journal of Epidemiology**. 159, p. 423-443, 2004.

SLATERRY, M. L.; POTTER, J.D.; SAMOWITZ, W.; SCHAFFER, D.; LEPPERT, M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. 8, p. 513-518, 1999.

SMITH, C. M.; SONG, W. O. Comparative nutrition of pantothenic acid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 312-321, 1996.

SPITZER, V. **Vitamins Basics**. DSM Nutritional Products. 3th ed., Burger Druck, 2007, 97 p.

TAMURA, T.; MESSING, B. Bioavailability of acid folic in fortified food. **American Journal of Clinical Nutrition**, 66(6), p. 1299 -1300, 1997.

TAVANI, A.; PELUCCHI, C.; PARPINEL, M.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. Folate and vitamin B(6) intake and risk of acute myocardial infarction in Italy. **European Journal of Clinical Nutrition**. 58, p. 1266 -1272, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**. v. 74, n. 5, p. 835 – 855, 2002.

TIMMONS, J. MEYER, J.C.; STEIBLE, D.J.; ASSENZA, S.P. Reverse phase liquid chromatographic assay for calcium pantothenate in multivitamin preparations and raw materials. **Journal - Association of Official. Analytical Chemists**, 70, p. 510-513, 1987.

TOLONEN, M. **Vitaminas y minerales en la salud y le nutricion**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995. 278p.

TUCKER, K. L.; QIAO, N.; SCOTT, T.; ROSENBERG, I.; SPIRO III, A. High homocysteine and low B vitamins predict cognitive decline in aging men: the Veterans Affairs Normative aging Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 627-635, 2005.

USDA. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>. Acesso em: 12 jun 2009.

VALLS, F.; CHECA, M.A.; FERNÁNDEZ-MUIÑO; SANCHO, M.T. Determination of thiamin in cooked sausages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 170, 1999.

VALLS, F.; SANCHO, M.T.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.A.; CHECA, M.A. Determination of vitamin B₆ in cooked sausages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 38-41, 2001.

van den BERGH, H.; VAN SCHAİK, F.; FINGLAS, P.M.; FROIDMONT-GÖRTZ, I. Third EU MAT Intercomparison on methods for the determinations of vitamins B₁, B₂ and B₆ in food. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 101-108, 1996.

van VLIET, T.; JACOBS, R.G.J.M.; de DECKERE E.; van den BERGH, H.; de BREE, A.; van der PUT, N.M.J. Effects of fortified spread on homocysteine concentration in apparently volunteers. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 61, n. 6; p. 769 -778, 2007.

VEGETARIAN SOCIETY. **Information Sheet – Vitamin B₁₂**. 2006. Disponível em: <<http://www.vegsoc.org/info/b12html>>. Acesso em: 14 jan. 2010.

VIDAL-VALVERDE, C; DIAZ-POLLÁN, C. Optimization analysis by capillary electrophoresis of thiamine in meat: comparison with high performance liquid chromatography, **European Food Research Technology**, 209, 355-359, 1999.

VIDAL-VALVERDE, C; DIAZ-POLLÁN, C. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography thiamin determination in milk, **Milchwissenschaft – Milk Science International**, v. 55, n. 3, 307-309, 2000.

VIÑAS, P.; LÓPES-ERROZ, C.; BALSALOBRE, N.; HERNADÉZ-CÓRDOBA, M. Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods; **Journal of Chromatography A**. 1007; p. 77-84; 2003.

WARD, C. M.; TRENERRY, C.V. The determination of niacin in cereals, meat and selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**. v. 60, 4, 667-674, 1997.

WALSH, J.H.; WYSE, B.W.; HANSEN, R.G.; A comparison of microbiological and radioimmunoassay methods for the determination of pantothenic acid in foods. **Journal of Food Biochemistry**. v. 3, n. 4, 175-189; 1979.

WATSON, J.J. Development of food fortification. **Cereal Foods World**. 26 (12), p. 662-665, 1981.

WHO. **Programmes and projects. Nutrition. Nutrition health topics**. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/topics/5_population_nutrient/en/index12.html>. Acesso em: 09 ago. 2009.

WIKIPEDIA - Enciclopédia Livre. **Ácido pantotênico**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_pantot%C3%AAnico>. Acesso em: 10 ago. 2009.

WINDAHL, K.L.; TRENERRY, V.C.; WARD, C. M. The determination of niacin in selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography: acid extraction. **Food Chemistry**. v. 65, (2), 263-270, 1999.

WOOLARD, D.C.; INDYK, H.E.; CRISTIANSEN, S.K. The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC. **Food Chemistry**. v. 69, p. 201-208, 2000.

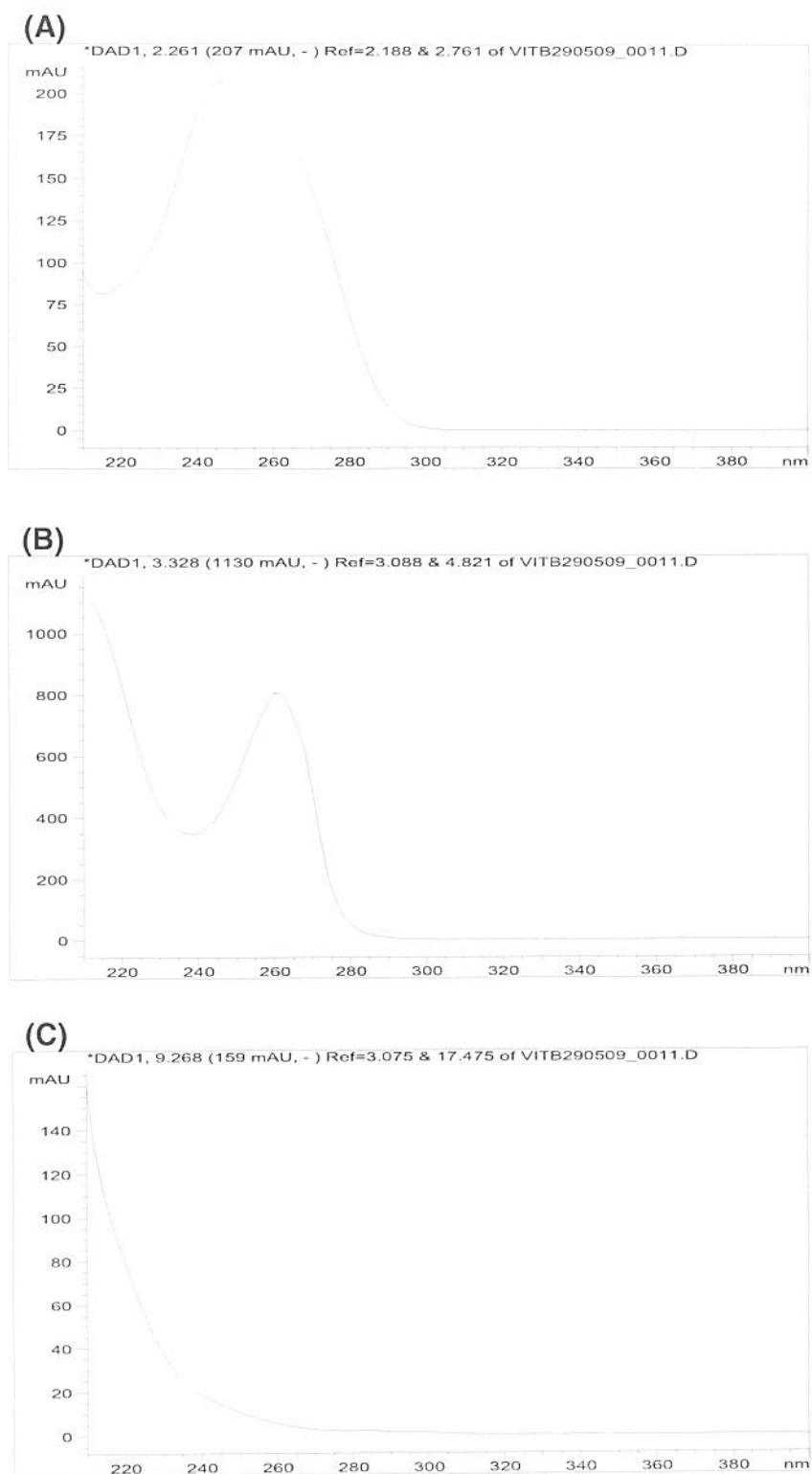
WOOLARD, D.C.; INDYK, H.E. Rapid determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine and niacinamide in infant formulas by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**. 85, n. 4, p. 945-951, 2002.

WYSE, B.W.; SONG, W.O.; WALSH, J.H.; HANSEN, R.G. Pantothenic acid. In: **Methods of Vitamin Assay**, AUGUSTIN, J.; KLEIN, B.P.; BECKER, D., VENUGOPAL, P.B., Eds., 4th ed., New York: John Wiley & Sons, 1985, p. 399.
ZAFRA-GOMÉZ, A.; CARBALLO, A.; MORALES, J.C.; GARCIA-AYUSO, L.E. Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, n. 13, p. 4531-4536, 2006.

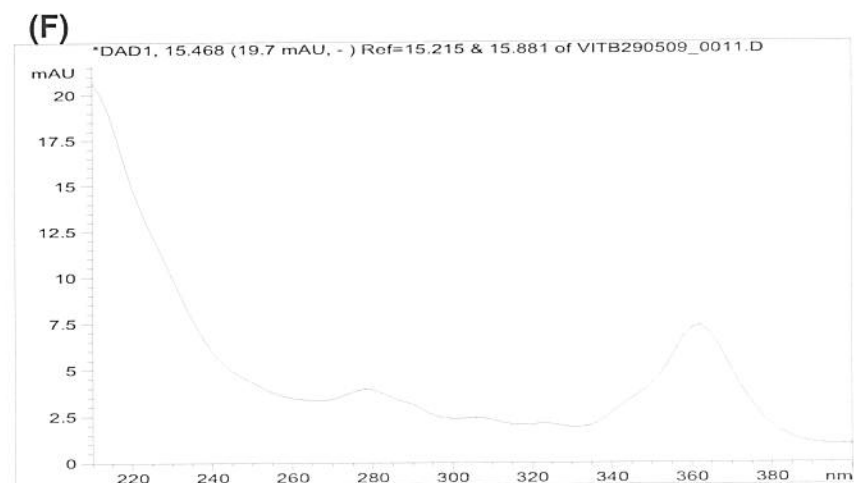
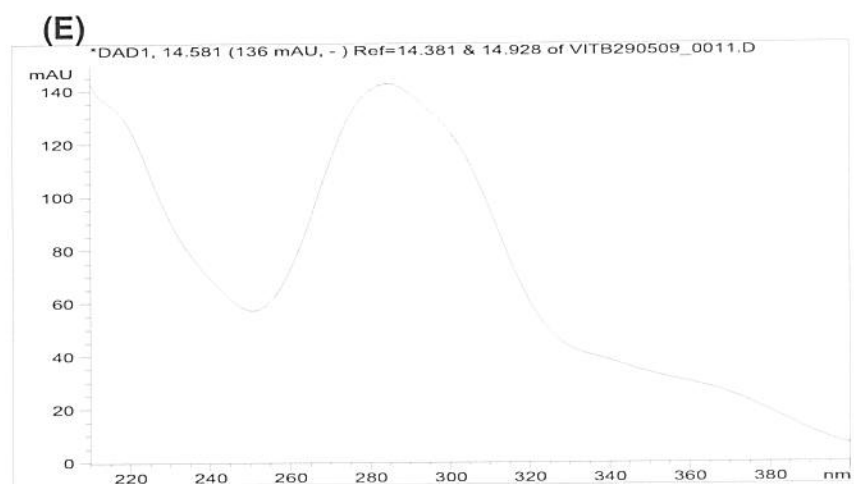
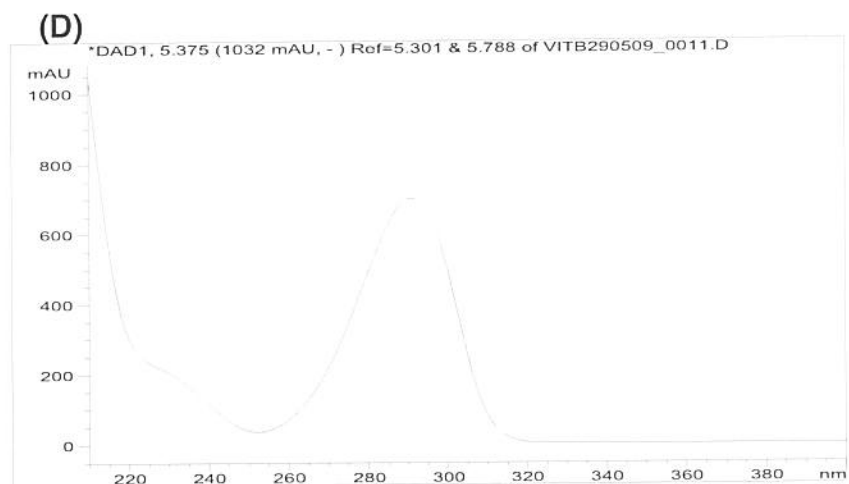
ZANCUL, M.S. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. **Medicina, Ribeirão Preto**, 37, p. 45-50, 2004.

ZHANG, S.M.; WILLET, W.C.; SELHUB, J.; HUNTER, D.J.; GIOVANNUCCI, E. L.; HOLMES, M.D.; COLDITZ, G.A.; HANKINSON, S.E. Plasma folate, vitamin B₆, vitamin B₁₂, homocysteine, and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 95, p. 373-380, 2003.

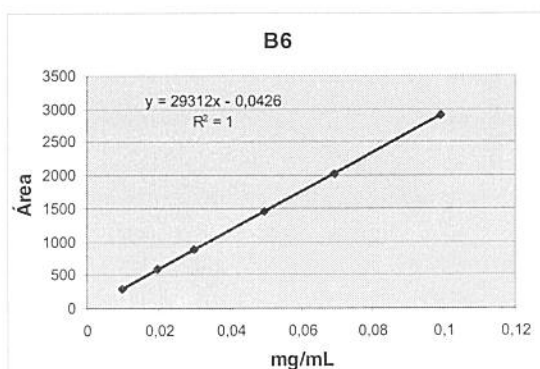
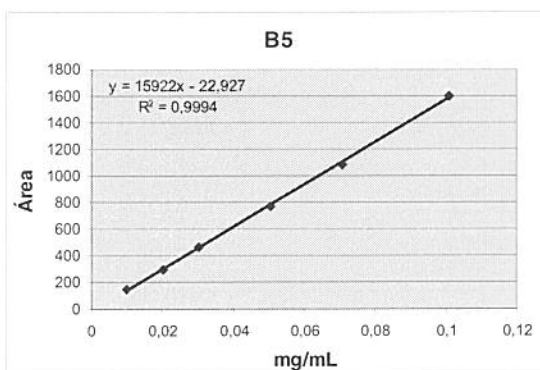
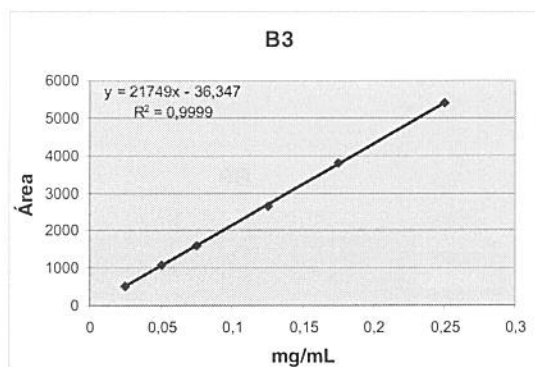
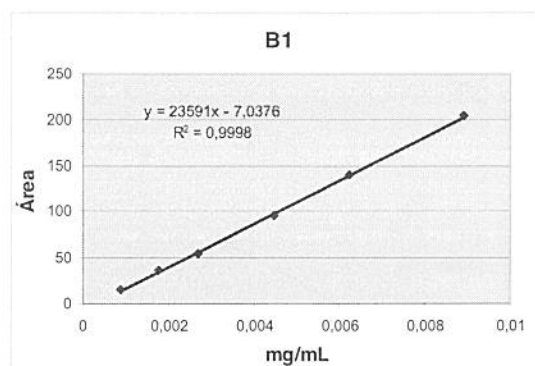
ANEXOS



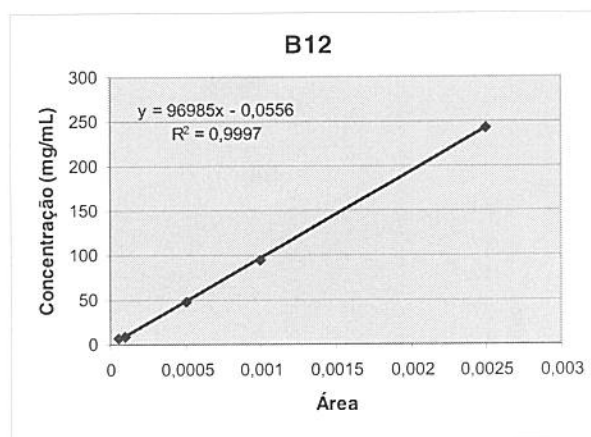
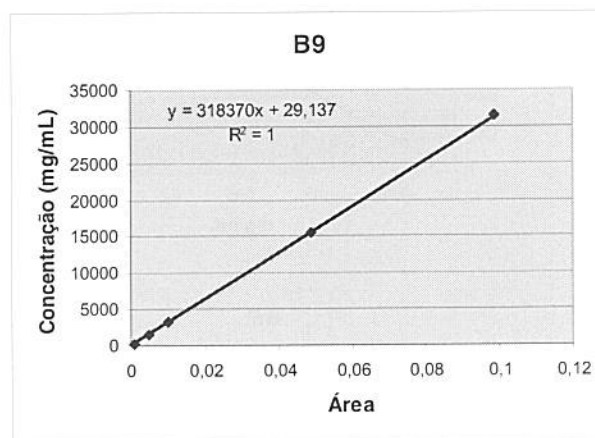
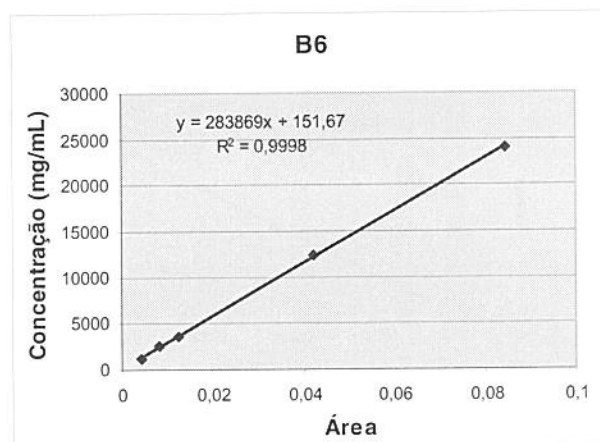
ANEXO 1: Espectro de Absorção das vitaminas B₁ (A); vitamina B₃ (B) e vitamina B₅ (C), utilizando Gradiente 1.



ANEXO 2: Espectro de Absorção das vitaminas B_6 (D); vitamina B_9 (E) e vitamina B_{12} (F), utilizando Gradiente 2.



ANEXO 3: *Curvas analíticas das vitaminas B₁; vitamina B₃, vitamina B₅ e vitamina B₆ utilizando Gradiente 1.*



ANEXO 4: *Curvas analíticas das vitaminas B₆; vitamina B₉ e vitamina B₁₂, utilizando Gradiente 2.*