

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS
VITAMINAS TIAMINA (B₁) E RIBOFLAVINA (B₂) EM VEGETAIS FOLHOSOS NÃO
CONVENCIONAIS, POR CLAE.

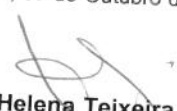
KARLA LISBOA RAMOS
NUTRICIONISTA

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Karla Lisboa Ramos**, aprovada pela Comissão Julgadora em 07 de Outubro de 2002.

Campinas, 07 de Outubro de 2002

PROFA. DRA. HELENA TEIXEIRA GODOY
ORIENTADORA


Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Presidente da Banca

PROFA. DRA ELIZABETH MARIA TALÁ DE SOUZA
CO-ORIENTADORA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

CAMPINAS-SP, 2002.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
R147d
V EX
TOMBO BCI 51535
PROC 16-837102
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 14/11/02
Nº CPD

CM00176480-0

BIB ID 266991

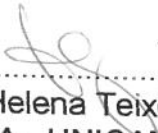
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

R147d Ramos, Karla Lisboa
Desenvolvimento, validação e determinação simultânea das
vitaminas tiamina (B₁) e riboflavina (B₂) em vegetais folhosos
não convencionais por CLAE / Karla Lisboa Ramos. –
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

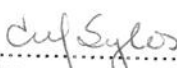
Orientador: Helena Teixeira Godoy
Co-orientador: Elizabeth Maria Talá de Souza
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Cromatografia liquida de alta eficiência. 2.Tiamina.
3.Riboflavina. I.Godoy, Helena Teixeira. II.Souza, Elizabeth
Maria Talá de. III.Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.Título.

Banca Examinadora


.....
Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy
FEA - UNICAMP
Presidente


.....
Prof. Dra. Heloisa M. Cecchi
FEA - UNICAMP
Membro


.....
Prof. Dra. Célia Maria de Sylos
FCF - UNESP
Membro

.....
Prof. Dra. Neura Bragagnolo
FEA - UNICAMP
Suplente

Campinas, 2002

AGRADECIMENTOS

Gostaria de externar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que contribuíram para realização deste trabalho.

A minha orientadora, Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy, meus sinceros agradecimentos, não apenas pela orientação, mas também por sua paciência, incentivo e apoio.

A co-orientadora Profa. Dra. Elizabeth Maria Talá de Souza, pelas discussões e sugestões dadas ao trabalho e a Profa. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira pelo incentivo e disponibilidade do laboratório de biofísica (UnB) para execução desta tese.

Ao Prof. Dr. Fernando Fortes (UnB), pelas longas e divertidas conversas, pela companhia nos lanchinhos e no laboratório nos fins de semana.

Ao querido Prof. Luiz Antônio Borgo (UnB), por acreditar e confiar no meu trabalho e me incentivar na carreira acadêmica, disponibilizando toda sua valorosa bibliografia. Agradeço, principalmente, pelas preciosas opiniões e observações dadas durante a correção desta tese.

Ao Prof. Dr. Carlos Gonçalves (UnB) pela atenção em tratar os dados estatísticos.

Aos amigos do laboratório de biofísica (UnB): Sandra, Lucilene, Érika, Rozeni, Gabriela, Luciano, Marquinhos, Pedro e tantos outros que por lá passaram. Ao funcionário e amigo Chiquinho, que sempre alegre me ajudava com satisfação.

Aos colegas do curso de pós-graduação e do laboratório de análise de alimentos da Unicamp: Marcelo, Marcus, Antônio, Rodrigo, Regina Furlani, Neiva, Jesuí, Juliana, Cristina, Marcelo, pela constante disposição a ajudar e pelas sugestões ao trabalho.

As amigas Luciana e Lucilene, por apoiar, sofrer, incentivar e, principalmente, acolher em sua casa, a amiga que estava sempre fazendo visita.

As amigas Vera e Sônia, pelas tardes divertidas de estudos e trabalhos na salinha da Nutrição.

A amiga Raquel, por apoiar, incentivar e me socorrer nas traduções dos resumos da tese.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e a FAPESP, pela concessão do auxílio a pesquisa para realização desse trabalho.

Aos meus queridos pais, Wilson e Magaly, os quais tenho imenso amor e admiração, pelo apoio e estímulo aos estudos durante toda a minha vida e principalmente durante o mestrado, quando fomos privados de estarmos juntos por exatamente 1 ano.

Ao meu namorado Rodrigo, pelo amor, carinho, atenção, incentivo e por me encorajar todas as vezes que era preciso superar um novo obstáculo. Ao Sr João Carlos e Sra Wilma, pelo carinho e atenção recebidos até hoje.

Aos meus queridos irmãos, William e Wilson, a minha cunhada Cláudia, pelos momentos de descontração e brincadeiras, pela paciência e palavras de incentivo. Agradeço a minha afilhada (Paulinha), por cada sorriso radiante e inocente que expressava ao me ver chegar em casa.

As minhas avós, pela constante preocupação com minha saúde e segurança. Ao meu avô paterno, saudades!

Agradeço á Deus, por me proporcionar momentos únicos com cada uma destas pessoas que, mesmo por pouco tempo, participaram desta minha estória.

RESUMO

No Brasil, programas de alimentação alternativa estimulam o consumo de novas fontes alimentares. Instituições não governamentais adotaram o uso de não convencionais, ou alimentos alternativos, com a finalidade de prevenir e recuperar crianças desnutridas com idade pré-escolar. Entretanto, a falta de metodologias analíticas apropriadas dificulta o conhecimento dos teores de micronutrientes, em especial as vitaminas, em alimentos não convencionais. Com a finalidade de suprir essa carência, este trabalho desenvolveu e validou uma metodologia para determinação simultânea das vitaminas B₁ e B₂ por CLAE. O método desenvolvido foi aplicado a folhosos verde-escuros não convencionais, como beldroega (*Portulacca oleracea* L.), caruru (*Amaranthus* sp), serralha (*Sonchus oleraceus* L.), tanchagem (*Plantago tomentosa* Lom.) e pó da folha de mandioca (*Manihot esculenta*). A extração das vitaminas B₁ e B₂ foi realizada com HCl 0,1N, seguida de hidrólise enzimática. Para a limpeza da amostra utilizou-se apenas a centrifugação. A separação cromatográfica ocorreu por eluição isocrática, com fase móvel composta por 22% metanol, 2,5% acetonitrila e 75,5% de fase aquosa (5mM ácido hexanossulfônico e 0,15% trietilamina; pH 2,8). Para detecção utilizou-se detector de fluorescência e a quantificação foi realizada por padronização externa. Os limites de detecção obtidos foram 0,01µg/mL para B₁ e 0,005µg/mL para B₂. As taxas de recuperação foram superiores a 74%. Nos testes de repetibilidade, os coeficientes de variação foram de 12,8% e 5,7% para B₁ e B₂, respectivamente. Dentre os folhosos analisados foi possível avaliar a equivalência nos teores das vitaminas entre as amostras e a couve manteiga (*Brassica oleracea*). Serralha, caruru e tanchagem apresentaram teores de B₁ próximos aos da couve manteiga. O mesmo não ocorreu com a beldroega, que apresentou teores muito elevados. Em relação aos teores de B₂, somente a serralha teve valores próximos à couve manteiga. O caruru foi o que apresentou os maiores valores, enquanto a beldroega e a tanchagem valores inferiores aos da couve. No pó da folha de mandioca os teores de vitaminas encontram-se elevados, cerca de 7,5 vezes mais conteúdo de B₁ e 5,0 vezes mais conteúdo de B₂, quando

comparada com a couve manteiga. Os resultados deste trabalho confirmam a aplicabilidade do método desenvolvido e validado na determinação de vitaminas em folhosos *in natura* porém, sugere que seja realizado estudo minucioso, por análise de superfície de resposta, para verificar o ponto ótimo de extração destes analitos, para cada folha, e observar se a variação encontrada nos coeficientes é inerente à metodologia ou à diversidade da matriz alimentícia.

ABSTRACT

In Brazil, programs of alternative feeding stimulate the consumption of new food sources. Non governmental institutions adopted the use of unconventional foods or alternative foods with the purpose of preventing and recovering malnourished children in preschool age. However, the lack of appropriate analytical methodologies turns difficult the assessment of micronutrients levels, specially vitamins, in unconventional foods. In order to fill this deficiency, this work developed and validated a methodology for simultaneous determination of vitamins B₁ and B₂, by HPLC. The developed method was applied to unconventional dark green leaf vegetables, as beldroega (*Oleracea Portulacca L.*), caruru (*Amaranthus sp.*), serralha (*Sonchus oleraceus L.*), tanchagem (*Tomentosa Plantago Lom.*) and cassava leaf powder (*Manihot esculenta*). Vitamins B₁ and B₂ were extracted with HCl 0.1N followed by enzymatic hydrolysis. In order to have a clean sample, it was only used the centrifugation process. The chromatographic separation was achieved through isocratic elution with a mobile phase of 22% methanol, 2.5% acetonitrile and 75.5% of aqueous phase (5mM hexanosulfonic acid and 0.15% triethylamine, pH 2.8). For detection, a fluorescence detector was used and the quantification was carried out by external standardization. The detection limits obtained were 0.01mg/mL for B₁ and 0.005mg/mL for B₂ and the recovery levels higher than 74%. The repeatability tests of the sample showed a variation coefficient of 12,8% and 12,6% (levels I and II) for B₁ and 5,7% and 6,2% (levels I and II) for B₂. Among the analyzed leaves, it was possible to evaluate the equivalence of the vitamins levels between the samples and the kale (*Brassica oleracea*). Serralha, caruru and tanchagem showed B₁ levels closer to the ones of kale. The same didn't occur with beldroega, it showed higher levels. In relation to B₂, only serralha had values closer to kale. Caruru presented the highest values, while beldroega and tanchagem showed lower values than kale. In cassava leaf powder the vitamins levels are about 7.5 times higher for B₁ and 5.0 times for B₂ when compared to kale. The results of this work confirm the applicability of the

developed and validated method in vitamin determination in fresh leaves; however, it suggests that a thorough study should be carried out through analysis of replicate surface. This analysis was used to verify the optimum point of extraction of these analytes, for each leaf, and to observe if the variation found in the coefficients is inherent to the methodology or the diversity of the food matrix.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
 CAPITULO 1- TIAMINA E RIBOFLAVINA, IMPORTANTES VITAMINAS DO COMPLEXO B.	 5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO.....	7
1.1 TIAMINA.....	7
1.1.1 FUNÇÕES BIOQUÍMICAS.....	9
1.1.2 NECESSIDADES NUTRICIONAIS.....	11
1.1.3 FONTES.....	12
1.1.4 TOXICIDADE.....	13
1.2 RIBOFLAVINA.....	14
1.2.1 FUNÇÕES BIOQUÍMICAS.....	16
1.2.2 NECESSIDADES NUTRICIONAIS.....	17
1.2.3 FONTES.....	18
1.2.4 TOXICIDADE.....	18
1.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS B ₁ E B ₂	18
1.3.1 MÉTODOS CLÁSSICOS.....	18
1.3.2 MÉTODOS OFICIAIS.....	20
1.3.3 MÉTODOS POR CLAE.....	21
1.3.3.1 EXTRAÇÃO.....	22
1.3.3.2 CLARIFICAÇÃO DO EXTRATO.....	23
1.3.3.3 ETAPA CROMATOGRÁFICA.....	24
A) FASE ESTACIONÁRIA.....	24
B) FASE MÓVEL.....	25
1.3.3.4 SISTEMAS DE DETECÇÃO.....	26
1.3.3.5 IDENTIFICAÇÃO.....	27
1.3.3.6 QUANTIFICAÇÃO.....	28
1.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	28
A) EXATIDÃO.....	29
B) PRECISÃO.....	30
C) SENSIBILIDADE.....	30
D) RUSTICIDADE.....	31
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
 CAPITULO 2- AVALIAÇÃO DAS ETAPAS ANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS VITAMINAS B₁ E B₂ EM VEGETAL FOLHOSO NÃO CONVENCIONAL.	 43
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
2.1 INTRODUÇÃO.....	45

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
2.2.1 MATERIAIS.....	47
2.2.2. EQUIPAMENTO.....	48
2.2.3 MÉTODOS.....	49
2.2.3.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	49
A) COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL E SISTEMA DE ELUIÇÃO.....	49
B) AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E CLARIFICAÇÃO.....	51
2.2.3.2 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO.....	51
2.2.3.3 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE QUANTIFICAÇÃO.....	53
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
2.3.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	53
A) SISTEMA DE ELUIÇÃO.....	53
B) COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	54
2.3.2 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE CLARIFICAÇÃO DO EXTRATO.....	56
2.3.3 AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	56
2.4 CONCLUSÃO.....	58
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

CAPÍTULO 3- OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE, DAS VITAMINAS B₁ E B₂ EM VEGETAL FOLHOSO NÃO CONVENCIONAL.

RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
3.1 INTRODUÇÃO.....	67
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
3.2.1 MATERIAIS.....	69
3.2.2 REAGENTES.....	70
3.2.3 EQUIPAMENTO.....	70
3.2.4 MÉTODOS.....	71
3.2.4.1 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	71
3.2.4.2 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA.....	72
A) LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	72
B) RECUPERAÇÃO DE PADRÕES.....	72
C) REPETIBILIDADE.....	72
D) ESTABILIDADE DOS PADRÕES E DA AMOSTRA.....	73
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
3.3.1 ETAPAS ANALÍTICAS.....	73
3.3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	74
3.4 CONCLUSÃO.....	80
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

CAPÍTULO 4- OTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS B₁ E B₂ EM FOLHOSOS NÃO CONVENCIONAIS POR MEIO DE ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.

RESUMO.....	83
ABSTRACT.....	84
4.1 INTRODUÇÃO.....	85
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	87

4.2.1 MATERIAIS.....	87
4.2.2 REAGENTES.....	87
4.2.3 EQUIPAMENTO.....	87
4.2.4 MÉTODOS.....	88
4.2.4.1 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	88
4.2.5 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO.....	89
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
4.4 CONCLUSÃO.....	95
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
 CAPÍTULO 5- DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS B₁ E B₂ EM FOLHOSOS NÃO CONVENCIONAIS POR CLAE.	
RESUMO.....	99
ABSTRACT.....	100
5.1 INTRODUÇÃO.....	101
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	101
5.2.1 MATERIAIS.....	103
5.2.2 REAGENTES.....	103
5.2.3 EQUIPAMENTO.....	103
5.2.4 MÉTODOS.....	104
5.2.4.1 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	104
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
5.4 CONCLUSÃO.....	109
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXOS.....	115

INTRODUÇÃO

A falta de perspectiva de melhoria da qualidade de vida e os altos índices de desnutrição infantil incentivaram a adoção de programas de intervenção alimentar, ou nutricional, direcionados à população de baixa renda, visando recuperar crianças desnutridas por meio da introdução de alimentos alternativos.

A utilização de alimentos alternativos, como suplemento alimentar em programas de combate à fome e à desnutrição, difundiu-se nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Estas regiões possuem altos índices de desnutrição e mortalidade infantil, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade (MADRUGA e CAMARA, 2000). O maior percentual de desnutrição infantil ocorre na faixa etária de 1 a 2 anos com 15,1%, a partir dessa faixa a prevalência tende a diminuir (PNDS, 1997).

A alimentação alternativa no Brasil, desde 1986, é bastante utilizada por instituições governamentais e não governamentais, como a Fundação Nacional da Saúde e a Pastoral da Criança (MADRUGA e CAMARA, 2000). A proposta de consumir alimentos não convencionais incentiva a diversificação da dieta, resgata hábitos alimentares tradicionais e introduz novas fontes de nutrientes com o aproveitamento de todas as partes comestíveis da planta, enriquecendo-a com fibras, vitaminas e minerais. É de baixo custo de produção e acessível à população (NUÑEZ, 1996).

Os programas de alimentação alternativa utilizam subprodutos e produtos não convencionais, como farelos de cereais (arroz e trigo), pó da folha de mandioca (*Manihot esculenta*), sementes de girassol e abóbora, folhosos verde-escuros como a beldroega (*Portulacca oleracea* L.), caruru (*Amaranthus* sp), serralha (*Sonchus oleraceus* L.), tanchagem (*Plantago tomentosa* Lom.) (LORENZI, 2000) e folhas de beterraba, rabanete e chuchu (BEAUSSET, 1992). Normalmente, estes alimentos são utilizados como suplemento alimentar na forma de pó ou multimistura, acompanhando pratos regionais, ou adicionados na preparação do arroz, feijão, sopas e sucos.

Apesar da presença de antinutrientes nas folhas alternativas, como glicosídeos cianogênicos, fitatos, nitratos e taninos, acredita-se que existam quantidades apreciáveis de nutrientes essenciais nestes alimentos. A utilização de processos tecnológicos apropriados reduziu ou eliminou as limitações causadas pelos antinutrientes.

Por apresentar quantidades apreciáveis de proteína, vitaminas e minerais, principalmente cálcio, ferro, vitamina A, riboflavina, tiamina, niacina e vitamina C, a folha de mandioca é o principal componente na dieta de algumas regiões da África, utilizada principalmente em épocas de escassez de alimentos (LANCASTER e BROOKS, 1983; BOKANGA, 1994). A folha fresca contém altas concentrações de glicosídeos cianogênicos, na proporção de 5 a 20 vezes mais que sua raiz (BOKANGA, 1994). A exposição a altas concentrações deste antinutriente pode causar intoxicação por ácido cianídrico (HCN), quando em níveis de 50 mg ou mais, o que pode ser letal para um indivíduo de 70kg. Doses não letais podem causar neuropatia (AWOYINKA *et al*, 1995).

A rápida remoção dos glicosídeos cianogênicos, pode ocorrer pela ação da linamarase, quando as folhas são trituradas, ou por ação do calor. Os dois métodos permitem a eliminação do ácido cianídrico, tanto por hidrólise enzimática ou por evaporação, respectivamente (BOKANGA, 1994).

As fibras dietéticas presentes nestes alimentos não convencionais possuem papel fundamental na dieta humana. São consideradas alimentos funcionais por conterem componentes (celulose, hemicelulose, lignina, pectina, gomas e mucilagens) que promovem a saúde e previnem doenças. Atuam na prevenção da constipação, diminuem o risco de câncer de colo intestinal, os níveis de colesterol e a glicose sanguínea (BERNER e O'DONNELL, 1998; PROSKY, 1999) e previnem o cálculo biliar (ROBINSON, 1991).

A utilização de alimentos não convencionais, portanto, tem por objetivo contribuir para a diversificação da dieta brasileira. Informar aos profissionais da área a real contribuição destes alimentos à alimentação humana, considerando as recomendações da Ingestão Alimentar de Referência (DRI), é de extrema importância. Para isso, é necessário determinar os teores de nutrientes

essenciais, como vitaminas B₁ e B₂, para desenvolvimento de metodologias e de análises confiáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWOYINKA, A. F.; ABEGUNDE, V.O.; ADEWUSI, S. R. A., Nutrient content of young leaves and assessment of their acceptance as a green vegetable in Nigeria. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 47: 21-28, 1995.

BEAUSSET, I.; B.S.; M.P.H., Estudio de las bases científicas para el uso de alimentos alternativos en la nutrición humana; **INAN/UNICEF**, 1992

BERNER, L. A. e O'DONNELL, J. A. Function foods and health claims legislation: applications to dairy foods. **International Dairy Journal**, v. 8: 355-362, 1998.

BOKANGA, M. Processing of cassava leaves for human consumption. **Acta Horticulturae**, v. 375: 203-207, 1994.

LANCASTER, P.A. e BROOKS, J.E. Cassava leaves as human food. **Economic Botany**, v. 37(3): 331-348, 1983.

LORENZI, H. **Manual de identificação e de controle de plantas daninhas**, 5ª edição, 2000.

MADRUGA, M. S. e CAMARA, F. S. The chemical composition of "Multimistura" as a food supplement. **Food Chemistry**, v. 68: 41-44, 2000.

NUÑEZ, I. M. Prevención y lucha contra la anemia carencial mediante una alimentación alternativa. Trabajo de investigación. **Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**. Universidad Nacional de Assuncion, 56p, 1996.

Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde (PNDS) 1996. Relatório preliminar. Rio de Janeiro. **BEMFAM**, 182p., 1997.

PROSKY, L. What is fibre? Current controversies. **Trends in Food Science & Technology**, v. **10**: 271-275, 1999.

ROBINSON, D. S., **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Ed. Acribia., Zaragoza (España), 1991.

CAPÍTULO 1

Tiamina e Riboflavina, importantes vitaminas do complexo B

Ramos, K. L.²; Souza, E. M.T¹; Godoy, H. T.²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Celular

² Universidade Estadual de Campinas, Depto. Ciência de Alimentos

CAPÍTULO 1

Tiamina e Riboflavina, importantes vitaminas do complexo B

Ramos, K. L.²; Souza, E. M. T.¹; Godoy, H. T.²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Celular

² Universidade Estadual de Campinas, Depto. Ciência de Alimentos

RESUMO

O conteúdo de vitaminas de um alimento constitui um fator importante na determinação de sua qualidade nutricional. Atualmente, em virtude da tecnologia de preservação e estocagem de alimentos, é possível obter-se dietas com quantidades apreciáveis de micronutrientes em qualquer época do ano. Entretanto, devido às reações físico-químicas e enzimáticas, poderão ocorrer perdas de nutrientes, como ocorre nas reações de escurecimento enzimático e não enzimático. Para a determinação de quantidades vitamínicas em um alimento é necessário conhecer sua matriz, a composição química predominante da vitamina e definir a metodologia aplicada, posto que as vitaminas possuem características físico-químicas diferentes. As vitaminas hidrossolúveis possuem estruturas químicas diversificadas. Este grupo compreende a vitamina C e as vitaminas do complexo B. Dentre essas últimas, destacam-se a tiamina e a riboflavina pelas importantes funções no organismo humano e por serem as vitaminas do complexo B mais estudadas

ABSTRACT

The vitamin content in food is an important factor for the determination of its nutritional quality. Recently, because of technologies on preservation and food storage, it is possible to obtain diets with appreciative micronutrient amounts at any time of the year. However, due to physical-chemical and enzymatic reactions, nutrients loss may occur as in enzymatic and nonenzymatic browning reactions. To determine vitamin quantities in foods, it is necessary to know its matrices, the major chemical composition of the vitamin and the definition of methodology applied. The vitamins have different physical-chemical characteristics. The water-soluble vitamins have diverse chemical structures. This group consist of vitamin C and complex B vitamins. Amongst these last ones, thiamin and riboflavin are distinguished for their important functions in the human organism and for being the most studied B vitamin.

1. INTRODUÇÃO

1.1- TIAMINA

A tiamina, uma vitamina antineurítica, foi identificada por Eijkman em 1896, quando descreveu experimentalmente a polinevrite induzida em galinhas (beribéri das aves), utilizando alimentação à base de arroz polido. Em 1931, Jansen e Donath isolaram a vitamina antiberibéri na forma cristalina a partir da casca do arroz e, em 1936, Williams descobre a estrutura química e realiza sua síntese (FERREIRA, 1983; MAHAN e ARLIN, 1995).

A vitamina B₁, ou tiamina, é formada por dois núcleos, um pirimidínico e outro tiazólico, unidos por um grupo metileno (**Figura 1**). Devido à presença de um nitrogênio quaternário em sua molécula, esta se comporta como base forte e encontra-se completamente ionizada nos intervalos de pH habitualmente encontrados nos alimentos (FENNEMA, 1993). Quimicamente, a estrutura é

denominada de 3-(4-amino-2-metilpirimidina-5-metil)-5-(2-hidroxi-etil)-4-metiltiazol (TANPHAICHITR, 1999) e apresenta um peso molecular de 265,36 g/mol.

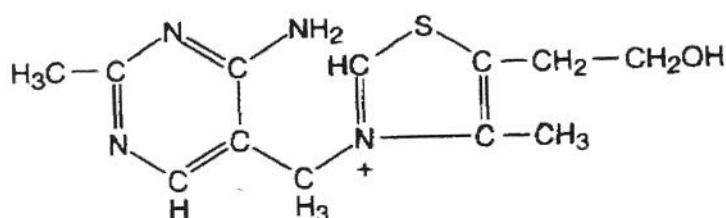


Figura1: Fórmula estrutural da tiamina

Trata-se de uma vitamina termolábil que se degrada facilmente em meio alcalino. Entretanto, sua estabilidade aumenta com a diminuição do pH. A degradação pelo calor depende da quantidade de oxigênio, pH, tempo de atuação e natureza dos eletrólitos da solução (FERREIRA, 1983).

A degradação da tiamina pela ação do pH e da temperatura foi observada por DWIVEDI e ARNOLD (1972) e por MULLEY *et al* (1975). Os autores submeteram a solução da vitamina, sob tampão fosfato, à autoclave com pHs de 3,5; 5,0 e 6,0. A menor perda foi observada sob condições de pH 3,5, devido à estabilidade da vitamina quando na forma protonada. De acordo com TANPHAICHITR (1999), o congelamento não afeta o conteúdo de tiamina nos alimentos.

O espectro de absorção da tiamina na região do ultravioleta apresenta duas bandas, com máximos em 235nm e 267nm, em soluções com pH 7 ou superior, e apenas uma banda a 254nm, em soluções com pH inferior a 5,5 (DAWSON *et al*, 1969; FERREIRA, 1983).

A tiamina é convertida a tiocromo pela reação de oxidação. Os oxidantes mais utilizados são o ferricianeto de potássio a 1% [$K_3Fe(CN)_6$] ou brometo de cianogênio (CNBr), em meio alcalino. O produto desta reação possui intensa fluorescência no λ_{EX} 370nm e λ_{EM} 435nm (**Figura 2**) (SIMS & SHOEMAKER, 1993).

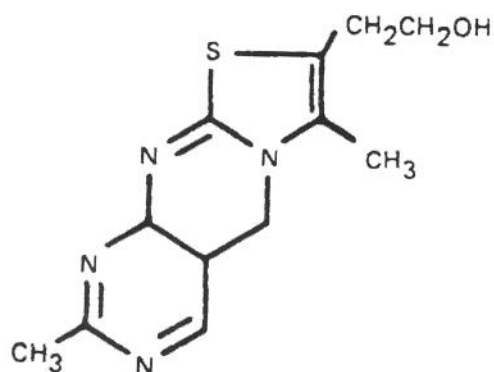


Figura 2: Fórmula estrutural do tiocromo

A reação de degradação da tiamina pelo sulfito (HSO_3^-) implica no ataque nucleofílico ao carbono do grupo metileno que une os anéis. Portanto, nucleófilos fortes, como o sulfito, destroem com facilidade esta vitamina. O sulfito é muito utilizado na indústria de alimentos para prevenir o escurecimento enzimático (FENNEMA, 1993).

1.1.1- FUNÇÕES BIOQUÍMICAS

Na natureza, a tiamina pode ser encontrada na forma livre ou na forma de sais, como o complexo tiamina-proteína, pirofosfato de tiamina (TPF) e complexo tiamina fosfoproteína (CHAVES, 1978). No organismo, sua forma ativa é a coenzima pirofosfato de tiamina, encontrada nas células como monofosfato ou pirofosfato e distribuída a todos os tecidos. Cerca de 80% da tiamina total é encontrada nos eritrócitos na forma de tiamina pirofosfato e em pequenas quantidades como tiamina monofosfato e tiamina livre (FINGLAS, 1993).

A tiamina é convertida a TPF, catalisada pela enzima tiamina quinase a partir de tiamina e ATP. A TPF participa nas reações catalisadas pelo α -cetoglutarato desidrogenase e complexo piruvato desidrogenase; este desencadeia a descarboxilação oxidativa do piruvato para formar o acetato e,

conseqüentemente, o acetil-CoA, principal componente do ciclo do ácido cítrico. A TPF também atua na descarboxilação de outros α -cetoácidos, α -cetogluturato e cetocarboxilatos derivados dos aminoácidos metionina, leucina, isoleucina e valina. Nas reações das transcetolases na via das pentoses-fosfato a TPF se faz presente. Apesar destas reações não contribuírem quantitativamente para geração de energia, são as únicas fontes de ribose para a síntese de precursores de ácidos nucleicos e a maior fonte de NADPH, potencial redutor para biossíntese de ácidos graxos e outras vias biossintéticas. Assim, a deficiência da tiamina compromete severamente a produção de energia celular (INCAP e ALAN, 1978; FERREIRA, 1983; DEVLIN, 1997; LYNCH e YOUNG, 2000).

A transcetolase da célula vermelha do sangue é a enzima mais utilizada na determinação dos níveis séricos de tiamina, a qual também pode ser dosada pela excreção urinária (FINGLAS, 1993; LYNCH e YOUNG, 2000). As reações da piruvato desidrogenase e da transcetolase são sensíveis aos níveis de tiamina. A deficiência de B₁ inibe o metabolismo dos carboidratos. As células podem ser diretamente afetadas pela carência de energia disponível e NADPH, ou intoxicadas pelo acúmulo de piruvato (DEVLIN, 1997).

A absorção da tiamina ocorre no intestino delgado por meio de dois mecanismos: difusão passiva (2 μ mol/L - altas concentrações), ou processo ativo (< 2 μ mol/L - baixas concentrações). A tiamina é fosforilada a seu éster antes de ser absorvida pela célula intestinal. Porém, a absorção será bloqueada caso haja deficiência de sódio ou inibição da ATPase. Isto sugere que a entrada da tiamina nas células da mucosa intestinal é mediada por um carreador que é dependente tanto do par tiamina fosforilada-desfosforilada quanto de alguns mecanismos energéticos metabólicos, possivelmente ativados pelos íons sódio (INCAP e ALAN, 1978; NUTRITION REVIEWS, 1984; TANPHAICHITR, 1999).

1.1.2- NECESSIDADES NUTRICIONAIS

O homem necessita ingerir, diariamente, quantidades de tiamina que reponham a fração gasta pelo processo metabólico, mantendo, assim, as concentrações sangüínea, dos órgãos e a excretada na urina. Por ser essencial no metabolismo dos carboidratos e aminoácidos de cadeia ramificada, a tiamina é expressa em miligramas por dia.

Segundo a DRI (Ingestão Alimentar de Referência - Food and Nutrition Board, Institute of Medicine National Academy of Sciences), crianças de 1 a 3 anos de idade devem ingerir 0,5mg/dia, homens de 14 a 70 anos ou mais, 1,2mg/dia, e mulheres da mesma faixa etária, 1,1mg/dia. Mulheres em período de gestação e lactação devem ingerir 0,3mg/dia a mais (AMAYA-FARFAN *et al*, 2001).

A deficiência de tiamina está relacionada a dietas à base de arroz e trigo polido (inadequação alimentar), ao consumo crônico de peixe cru (tiaminase - atividade antivitaminica) e a casos de doenças do aparelho digestivo, alcoolismo crônico, diabetes, hipertiroidismo e gestação. Os sinais clínicos da deficiência envolvem os sistemas nervoso, cardiovascular, muscular e gastrointestinal.

A sua deficiência causa a doença conhecida como beribéri. O beribéri infantil, comum nos 2 a 3 meses de idade, caracteriza-se pela anorexia, edema, taquicardia, insuficiência cardíaca e sinais de meningite (TANPHAICHITR, 1999). O beribéri adulto é descrito em duas formas: úmido e seco. O úmido caracteriza-se por anormalidades no sistema cardiovascular, incluindo insuficiência cardíaca, batimentos irregulares do coração, edema e hipertensão arterial. O que agrava o estado clínico é a vasodilatação periférica e a insuficiência cardíaca. O seco caracteriza-se por manifestações nervosas. Os sinais clínicos são irritabilidade, fadiga, depressão e perda da concentração. Esta neuropatia causa a paralisia dos membros inferiores e pode estar associada à deficiência de folato, ácido nicotínico, piridoxina e ácido pantotênico. Em alguns países, estas duas formas da doença estão associadas ao alcoolismo (KANAREK, 1991).

Outra doença causada pela deficiência de tiamina é a síndrome de Wernicke's-Korsakoff. Problemas neurológicos e deficiências psicológicas (amnésia e confusão mental) caracterizam esta doença, que ocorre em alcoólatras crônicos com quadro clínico de desnutrição. No entanto, também ocorre em indivíduos com deficiências nutricionais ou estresse metabólico, afetando o metabolismo da tiamina, como em alguns casos de câncer de estômago, gastrite crônica e anorexia nervosa (KANAREK, 1991).

1.1.3- FONTES

Alimentos de origem vegetal e animal são importantes fontes de tiamina, embora apenas os vegetais façam a síntese completa. Levedura de cerveja, cereais e seus farelos, leguminosas e carne de porco são as principais fontes. Vegetais verde-escuros, raízes e tubérculos têm média ou pequenas quantidades e em peixes, frutas e leite ocorre em menores quantidades (**Tabela 1**).

Nos animais, a tiamina apresenta distribuição desigual nos órgãos e tecidos, e sua maior parte combina-se com o ácido fosfórico ou com ácido fosfórico e proteína. Nas plantas ocorre na forma livre. Como suplemento, esta vitamina está disponível sob a forma de hidrocloreto de tiamina e mononitrato de tiamina, isolada ou associada a outras vitaminas e minerais.

Em virtude, principalmente, das diferentes técnicas analíticas empregadas na determinação e quantificação da tiamina, seu conteúdo em tabelas de composição de alimentos e em trabalhos científicos apresenta diferenças significativas para o mesmo alimento. Para exemplificar tal fato, foram colocados em destaque alguns exemplos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Teores de tiamina em alimentos.

Alimentos	Tiamina (mg/100g)	
	FRANCO (1995)	FAVIER (1999)
Fermento, levedura de cerveja	14,5	-
Sementes de girassol	2,0	1,90
Carne de porco crua	1,45	0,800
Arroz, residuo de polimento	1,4	-
Amendoim, cru c/ casca	0,910	0,800
Caju, castanha crua	0,850	0,430
Gérmen de trigo	0,810	-
Trigo, farinha integral	0,660	0,400
Feijão	0,540	0,160
Aveia, flocos crus	0,530	-
Avelã	0,460	0,500
Ovo, gema	0,209	0,220
Brócolis, flores cozidas	0,120	0,100
Couve	0,096	0,140
Salmão	0,060	0,210
Laranja	0,040	0,090
Leite	0,013	0,050

1.1.4- TOXICIDADE

O excesso de vitamina B₁ é rapidamente excretado pelos rins. Não existe evidência de toxicidade por administração oral (RDA, 1989; TANPHAICHITR, 1999). Doses orais de 500mg/dia durante um mês são consideradas atóxicas (HAWK, *et al*, 1954).

1.2- RIBOFLAVINA

A riboflavina, ou vitamina B₂, foi descoberta como um pigmento fluorescente amarelo-esverdeado isolado do soro do leite, em 1879, por Blyth. Em 1920, EMMETT admite a existência, no complexo B, de um fator responsável pelo crescimento de ratos. ELLINGER *et al*, em 1933 (FERREIRA, 1983), isolaram a lactoflavina, no estado puro, e a identificaram como vitamina B₂.

Sua estrutura química é formada pela condensação de um ciclo isoaloxazina e de um açúcar, a ribose (C₁₇H₂₀N₄O₆), cujo peso molecular é de 376,4 g/mol (1 mg ∴ 2,66 µmol) O nome químico da riboflavina é 7,8 dimetil-10-(D- 1"-ribitol)-isoaloxazina (**Figura 3**).

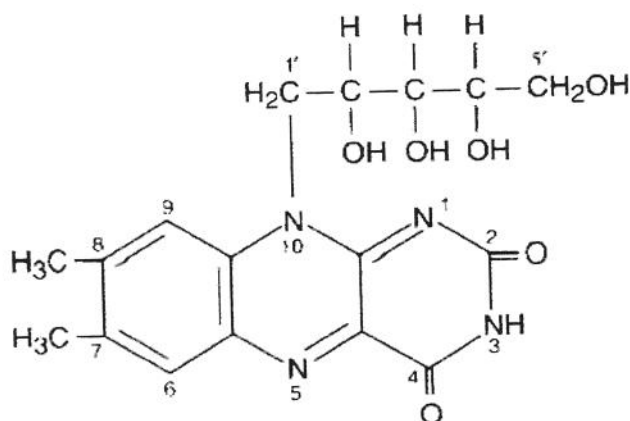
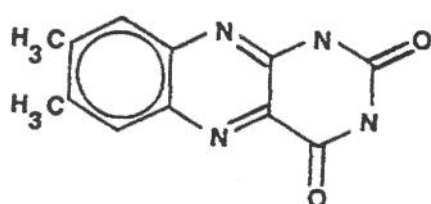


Figura 3: Estrutura química da riboflavina.

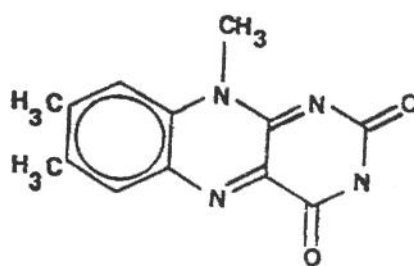
A vitamina B₂ é termoestável e insensível ao oxigênio atmosférico. É estável em soluções fortemente ácidas, tornando-se mais resistente ao calor e à oxidação; porém, é instável na presença de álcali, ocorrendo a separação fotoquímica do ribitol (luz ultravioleta) e formando a lumiflavina (7,8-dimetil-10-metil-isoaloxazina). A lumiflavina possui um poder oxidante maior do que a riboflavina e pode oxidar outras vitaminas, em especial o ácido ascórbico. Em soluções ácidas ou neutras, a irradiação conduz à formação do lumicromo (7,8-dimetil-aloxazina), uma substância de fluorescência azul (FENNEMA, 1983; FOX e

THAYER, 1998). As bandas de absorção máxima da riboflavina no ultravioleta são 266nm, 373nm e 445nm em solução tampão fosfato com pH 7,0 (DAWSON *et al*, 1969).

A riboflavina e a lumiflavina possuem fluorescência amarelo-esverdeada com λ_{Em} próximo de 520nm, típico da estrutura da isoaloxazina, enquanto o lumicromo, de fluorescência azul, possui λ_{Em} máximo em 450nm, típico do anel de aloxazina (**Figura 4**) (FOX & THAYER, 1998). A riboflavina, oxidada pela solução a 1% de ferricianeto de potássio em meio alcalino, sofre decomposição formando lumiflavina (**Figura 4**). Esta é determinada por fluorescência no λ_{Ex} 370nm e λ_{Em} 522nm (SIMS e SHOEMAKER, 1993).



Lumicromo



Lumiflavina

Figura 4: Estrutura química do Lumicromo e da Lumiflavina

A degradação das flavinas por luz ultravioleta e visível envolve a fotorredução no anel isoaloxazina com a doação de um elétron da cadeia lateral ribitol. Em soluções ácidas ou neutras, a riboflavina livre perde a cadeia de ribitol e é convertida a lumicromo. A fotodegradação em solução alcalina envolve a clivagem hidrolítica formando lumiflavina (RUSSELL e VANDERSLICE, 1990).

1.2.1- FUNÇÕES BIOQUÍMICAS

Na natureza, a vitamina B₂ pode ser encontrada na forma livre (riboflavina) ou fosforilada, como coenzima, nas formas de flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). A conversão da riboflavina em coenzima ocorre no citoplasma celular da maioria dos tecidos, mas, particularmente, no intestino delgado, fígado, coração e rins. A reação de fosforilação é catalisada pela flavoquinase. Esta converte a riboflavina livre em FMN e é dependente do ATP. Esta reação pode ocorrer durante a absorção através da mucosa intestinal. A conversão da FMN em FAD é realizada pela FAD-sintase. Diversas fosfatases podem catalisar a forma FAD em FMN e FMN em riboflavina livre (BRODY, 1993; McCORMICK, 1999).

A riboflavina, na forma de coenzima, participa de uma série de reações de oxirredução, essenciais para a produção de energia e a respiração celular (DEVLIN, 1997). As flavoproteínas, enzimas associadas à riboflavina, possuem função de agentes catalisadores das reações de oxirredução nas células e são aceptores e transportadores de elétrons (VALLS *et al*, 1999). Podem doar elétrons para substratos ou para outros cofatores, isto é, NADH⁺, H⁺. São também coenzimas de desidrogenases que catalisam o primeiro passo na oxidação de vários intermediários do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos (BRODY, 1993; LYNCH e YOUNG, 2000). A FMN é necessária para a conversão da piridoxina em piridoxal fosfato. A FAD é necessária para a conversão de triptofano em niacina (MAHAN e ARLIN, 1995). Estes cofatores participam no transporte de elétrons no sistema mitocondrial.

A riboflavina é absorvida na parte proximal do intestino delgado por um transporte especializado de saturação que tem um sítio de ação específico na mucosa intestinal. Para baixos níveis de ingestão, a absorção também é eficiente e ocorre pelo transporte ativo dependente do íon Na⁺ (RYU *et al*, 1968; FERREIRA, 1983; BATES, 1993).

1.2.2- NECESSIDADES NUTRICIONAIS

Com base na excreção urinária, as recomendações de riboflavina baseiam-se nas quantidades calculadas para manutenção tecidual, na concentração de riboflavina no eritrócito e na determinação do coeficiente de atividade da glutathione redutase nos eritrócitos, sendo esta a técnica mais utilizada na quantificação da concentração de riboflavina nas células vermelhas.

Segundo a DRI, a recomendação para crianças de 1 a 3 anos é de 0,5mg/dia; homens, com idade de 14 a mais de 70 anos, de 1,3mg/dia; mulheres, com 19 a mais de 70 anos, de 1,1mg/dia. Deve-se adicionar 0,3mg/dia e 0,5mg/dia para mulheres em período de gestação e lactação, respectivamente (AMAYA-FARFAN *et al*, 2001).

A deficiência de riboflavina pode ser resultante de inadequação alimentar, anormalidades digestivas, mau absorção resultante da doença celíaca, espru-tropical e obstrução biliar (McCORMICK, 1999). Geralmente, a hipovitaminose está associada à deficiência de outras vitaminas hidrossolúveis, como a vitamina B₆. Estudos da deficiência de riboflavina e piridoxina com humanos e ratos, mostraram uma diminuição na síntese de piridoxal fosfato no sangue e no fígado. Outros estudos observaram redução no conteúdo e maturidade no colágeno na pele dos ratos (LAKSHMI, 1998).

Em algumas partes da Índia, a riboflavina é um nutriente limitante, particularmente em populações com dieta à base de arroz. Este grão, consumido na forma polida, acarreta perda de 50% de riboflavina disponível, se comparado ao grão integral, que possui valor nutritivo superior ao polido, devido ao aumento dos teores das vitaminas do complexo B (NÓBREGA, 1998).

As manifestações clínicas precoces de deficiência desta vitamina incluem: fotofobia, queimação e coceira nos olhos, inflamação e rachadura dos lábios, boca e língua. Em estágios mais graves da doença ocorrem a queilose, estomatite angular, erupção gordurosa na pele nasolabial, mudanças na pele escrotal e vulval, anemia normocítica e língua edematosa (LAKSHMI, 1998).

1.2.3- FONTES

A riboflavina se encontra largamente distribuída na natureza, tanto nos animais como nas plantas, mas somente os microrganismos e os vegetais podem sintetizá-la. As principais fontes, para o homem, são o levedo de cerveja, fígado e queijo. Carnes, aves e peixes, assim como folhas verde-escuras vêm a seguir, em ordem de riqueza.

No farelo de arroz, a riboflavina ocorre em uma composição centesimal de 0,25mg constituindo-se, portanto, em uma fonte rica desta vitamina (MUNÕZ, 1986). A **Tabela 2** apresenta exemplos destas fontes. Observa-se que os teores de B₂ encontrados nas tabelas de alimentos também apresentam variações significativas, o que confirma a necessidade da reavaliação dessas tabelas.

1.2.4- TOXICIDADE

A hipervitaminose de vitamina B₂ não é conhecida. O trato gastrointestinal do humano possui capacidade de absorção de 30mg de riboflavina administrada oralmente, em única dose (McCORMICK, 1999). Mesmo se administrada em altas doses diárias, a riboflavina não provoca qualquer perturbação subjetiva ou sintomatologia aparente. A maior parte é eliminada pela urina nas primeiras 6 horas (RYU *et al*, 1968; FERREIRA, 1983).

1.3- MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS B₁ E B₂

1.3.1 MÉTODOS CLÁSSICOS

Os métodos tradicionais para determinação de vitaminas são os biológicos, microbiológicos e físico-químicos. Nos métodos biológicos, que utilizam os processos fisiológicos de crescimento e reprodução de animais de laboratórios,

avalia-se o efeito que a dieta suplementada poderá ocasionar. Esse método permite isolar e identificar diferentes vitaminas a partir de fontes naturais, porém são demorados, pouco precisos, necessitam de grande número de amostras e são dispendiosos (RUSSELL e VANDERSLICE, 1990).

Tabela 2: Teores de riboflavina em alimentos.

Alimentos	Riboflavina (mg/100g)	
	FRANCO (1995)	FAVIER (1999)
Levedura de cerveja, em pó	4,612	-
Fígado de boi, cru	2,04	2,9
Amendoim vermelho, a película	1,57	0,13
Queijo de minas, fresco	1,424	-
Arroz, resíduo de polimento	1,10	-
Açafrão em pó	1,03	-
Came de boi, charque	0,950	0,200
Leite cru	0,653	0,170
Farinha de peixe	0,620	-
Ovo de galinha, cru	0,300	0,460
Brócolis, folhas cruas	0,200	0,130
Farinha de trigo integral	0,150	0,130
logurte	0,150	0,180
Banana prata	0,103	-
Abacate comum	0,1	-
Espinafre cru	0,1	0,04
Laranja, suco	0,05	0,04

Os métodos microbiológicos baseiam-se em requerimentos nutricionais e na capacidade de reprodução do microrganismo na presença de uma determinada vitamina. O crescimento do microrganismo pode ser proporcional à quantidade de vitamina contida no meio; isto ocorre com o *Lactobacillus casei*, que se

desenvolve na presença de riboflavina. Estes métodos apresentam baixa reprodutibilidade e precisão, além de utilizar linhagens específicas de microrganismos (RUSSELL e VANDERSLICE, 1990). Tanto os métodos microbiológicos quanto os biológicos não permitem a determinação simultânea das vitaminas.

Os métodos físico-químicos, geralmente, são mais precisos, rápidos e econômicos, sendo, portanto, mais aplicáveis às determinações de rotina. As determinações espectrofotométricas são freqüentemente utilizadas em análises de preparações farmacêuticas. Entretanto, em função da sua baixa sensibilidade e da presença de substâncias interferentes, não são satisfatoriamente utilizadas em análise de alimentos. Os métodos fluorimétricos, em decorrência da alta sensibilidade, são os mais comumente usados para determinação de tiamina e riboflavina em alimentos.

1.3.2 MÉTODOS OFICIAIS

A principal vantagem dos métodos oficiais da AOAC é a simplicidade dos equipamentos; porém são demorados, minuciosos (HIRAYAMA e MARUYAMA, 1991; FINGLAS e FAULKS, 1984) e utilizam reagentes altamente nocivos, como brometo de cianogênio, e específicos, como resinas iônicas (Mac BRIDE e WYATT, 1983; RUSSEL e VANDERSLICE, 1992). Os princípios, para determinação das vitaminas B₁ e B₂, conforme os métodos da AOAC (CUNNIFF, 1995), estão descritos a seguir:

↳ **Vitamina B₁:** A amostra, previamente digerida com HCl 0,1N e fosfatase, é purificada em coluna catiônica. A tiamina é oxidada, na presença de ferricianeto de potássio [K₃ Fe(CN)₆] e NaOH, formando o tiocromo, composto fluorescente com λ_{Ex} 365 nm e λ_{Em} 435 nm (método 957.17) (DEUTSCH, 1998).

↳ **Vitamina B₂**: A amostra, previamente digerida com HCl 0,1N e fosfatase, é purificada por precipitação no ponto isoelétrico. A riboflavina é oxidada, na presença de KMnO₄ e H₂O₂, formando a lumiflavina, composto fluorescente com λ_{Ex} 440nm e λ_{Em} 565nm (método 970.65.) (DEUTSCH, 1998). Entretanto, este método não é indicado para alimentos que possuam enzimas com capacidade de degradar a vitamina B₂, como o fígado, ou que apresentem altas concentrações de gordura, pois esta promove a oclusão física da vitamina (RUSSEL e VANDERSLICE, 1992).

1.3.3 MÉTODOS POR CLAE

As técnicas cromatográficas de separação e determinação das vitaminas do complexo B apresentam-se cada vez mais interessantes. Levin e Wei, em 1966, quantificaram tiamina e seus ésteres fosfatados por cromatografia em papel. A cromatografia em camada delgada foi utilizada para determinação quantitativa da vitamina B₁ em preparações farmacêuticas (LYNCH e YOUNG, 2000). A tiamina é termolábil e não volátil, portanto não pode ser determinada diretamente por cromatografia gasosa. Métodos indiretos utilizam o sulfito para a clivagem da tiamina, formando um derivado que será determinado pelo detector fotométrico (RIZZOLO e POLESELLO, 1992).

As flavinas podem ser separadas por cromatografia de camada delgada ou em papel. Devido à fluorescência natural são visualizadas sob luz ultravioleta. A cromatografia de camada delgada analítica é usada na análise qualitativa, enquanto a preparativa isola e purifica as flavinas (GLISZCZYNSKA-SWIGLO e KOZIOLOWA, 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica moderna, de alta especificidade, sensibilidade e reduzido tempo de análise, sendo possível a determinação de apenas um composto ou análise simultânea de vitaminas hidrossolúveis em vegetais frescos (FINGLAS e FAULKS, 1987). Para as vitaminas, essa técnica possui vantagens como análise direta sem derivação,

determinação e resolução de isômeros e excelente precisão, quando comparado a espectrofotometria. Faz-se uso de colunas de troca iônica ou de fase reversa, com detetores ultravioleta ou fluorimétricos (POLESELLO e RIZZOLO, 1986; SOLEDAD *et al*, 1997).

1.3.3.1 EXTRAÇÃO

Para separar e determinar vitaminas por CLAE, a matriz alimentícia constituída por compostos lábeis e em concentrações da ordem de microgramas ou miligramas, será submetida à etapa de extração.

O procedimento de extração para vitaminas B₁ e B₂ envolve a desnaturação das proteínas por hidrólise ácida ou por hidrólise das formas fosfatadas das vitaminas, com a utilização de misturas enzimáticas (diastase e fosfatase) (NDAW *et al*, 2000).

A extração convencional das vitaminas hidrossolúveis baseia-se na hidrólise ácida com HCl ou H₂SO₄ 0,1N e autoclavagem por 15-30 min/121°C. Este procedimento desnatura proteínas, libera vitaminas associadas a complexos protéicos e converte açúcares complexos em simples (SIMS e SHOEMAKER, 1993; GEHRING *et al*, 1995; NDAW *et al*, 2000). Entretanto, a extensa hidrólise ácida a elevadas temperaturas produz extratos com quantidades apreciáveis de compostos interferentes, derivados da matriz alimentícia (FINGLAS e FAULKS, 1987). AGOSTINI e GODOY (1997) utilizaram a vibração ultra-sônica por 60 min para liberação das vitaminas B₁, B₂ e B₆ em alimentos enriquecidos.

O tratamento com fosfatases, amilases, sulfatases, invertase e peptidase tem como finalidade liberar as vitaminas dos complexos protéicos, das fibras celulares, do amido e de outros constituintes do alimento. A atuação da enzima dependerá da matriz estudada. A conversão das vitaminas fosforiladas em sua forma livre totaliza o conteúdo vitamínico do alimento. A omissão da etapa de desfosforilação resultará em baixos teores destas vitaminas em diversos alimentos (HOLLMAN *et al*, 1993b).

As diversas preparações enzimáticas comercializadas possuem diferentes composições e eficiência variável; isto resulta na determinação errônea dos teores de vitaminas. HÄGG (1994) avaliou a eficiência das enzimas takadiastase (Fluka e Serva), claradiastase (Fluka), papaína (Fluka) e α -amilase (Sigma) na extração das vitaminas B₁ e B₂ no material de referência. Na determinação das duas vitaminas, os melhores resultados foram obtidos com a claradiastase (Fluka).

1.3.3.2 CLARIFICAÇÃO DO EXTRATO

O extrato obtido a partir dos tratamentos mencionados é submetido às etapas de limpeza e clarificação, para eliminação dos interferentes. Esta etapa auxilia na quantificação precisa dos teores vitamínicos, por CLAE.

FERNANDO e MURPHY (1990) observaram que, em produtos da soja, o conteúdo vitamínico obtido por CLAE, utilizando o detector de fluorescência, foi inferior ao valor encontrado por métodos fluorimétricos da AOAC de 1984. Concluíram que a presença de outros compostos fluorescentes interferiram no método oficial, superestimando o valor encontrado por CLAE. Isto demonstra que a técnica cromatográfica possui maior seletividade e especificidade.

Após a extração com hidrólise ácida e enzimática é imprescindível a utilização de agentes desproteinizantes para a limpeza do extrato. Normalmente, utiliza-se tratamento com ácido tricloroacético a 50%, por 5min/60°C ou 10min/100°C (FELLMAN *et al*, 1982; WATADA e TRAN, 1985), ácido perclórico ou sulfossalicílico 5% a 10% (FINGLAS e FAULKS, 1987). A eliminação de compostos fluorescentes em vegetais pode ser efetuada com a precipitação em pH 6,0 a 6,5, ou a oxidação por permanganato de potássio (GARCIA *et al*, 1993) ou bissulfito de sódio (FINGLAS e FAULKS, 1987).

O extrato pode ser purificado utilizando colunas de troca iônica. RIZZOLO *et al*, extraíram seis vitaminas hidrossolúveis de amêndoas cruas usando extração por sonicação e temperatura, removendo interferentes com coluna catiônica (RIZZOLO e POLESELLO, 1992). Pode-se, também, utilizar a extração em fase

sólida ou cartuchos Sep-Pak, que têm a finalidade de isolar e concentrar o analito de interesse da matriz complexa por adsorção ao adsorvente da coluna. Os cartuchos são condicionados com soluções tampão e solventes orgânicos na proporção adequada para eluição do analito (MORENO, 2000).

A tiamina não possui um cromóforo de forte absorção na região do UV, desse modo, o método de limpeza por coluna de troca iônica ou cartuchos Sep-Pak, utilizados na CLAE, prepara a amostra para análise deixando-a livre de interferentes (MACRAE, 1990).

O uso de cartuchos Sep-Pak é apresentado como alternativa simples e rápida na limpeza e no preparo da amostra. Sua vantagem é a prevenção oxidativa de algumas vitaminas (POLESELLO e RIZZOLO, 1986). Laboratórios de rotina de controle de qualidade adotaram esta técnica, devido à simplicidade no preparo da amostra, rapidez na análise e confiabilidade de resultados por determinações cromatográficas (RIZZOLO e POLESELLO, 1992).

Centrifugação e filtração são utilizadas para remoção de interferentes e preparação do extrato para análise por CLAE (KAMMAN, 1980; RUSSELL e VANDERSLICE, 1992).

1.3.3.3 ETAPA CROMATOGRÁFICA

A) FASE ESTACIONÁRIA

A separação e resolução dos picos cromatográficos das vitaminas hidrossolúveis são obtidos com a utilização de diferentes fases estacionárias. Colunas com grupamentos NH_2 ou colunas de troca iônica são usadas para determinar niacina e seus derivados. Entretanto, a coluna de fase reversa (C_{18}) é a mais utilizada na CLAE para determinação das vitaminas hidrossolúveis (BLANCO *et al*, 1994).

Compostos fluorescentes dependentes de derivação pré ou pós-coluna são separados em colunas C₁₈. No entanto, BÖTTICHER e BÖTTICHER (1986) utilizou colunas NH₂ eluindo com tampão fosfato e acetonitrila, enquanto WATADA e TRAN (1987) separaram tiocromo utilizando a sílica como fase estacionária e eluindo o analito com solventes orgânicos (POLESELLO e RIZZOLO, 1990). Segundo DONG *et al* (1988), as colunas C₁₈ possuem alta seletividade, porém as colunas C₈ fornecem a mesma resolução com menor tempo de determinação.

B) FASE MÓVEL

As vitaminas hidrossolúveis são eluídas de modo isocrático, embora alguns pesquisadores referenciem o uso de gradiente (CHUANG *et al*, 1994; AGOSTINI e GODOY, 1997; CHU e TIN, 1998; MORENO e SALVADÓ, 2000).

As fases móveis são constituídas por tampões fosfato, carbonato de amônio, acetato de amônio em pH 5,0-7,0 (FINGLAS e FAULKS, 1984; BLANCO *et al*, 1994; Van Den BERG *et al*, 1996), modificadores orgânicos de polaridade, como metanol entre 15% e 50% (LAM *et al*, 1984; WIMALASIRI e WILLS, 1985; SIMS e SHOEMAKER, 1993; HOLLMAN *et al*, 1993a) e acetonitrila 9,5% a 20% (KAMMAN *et al*, 1980; STANCHER e ZONTA, 1986; RIBAROVA *et al*, 1987; CHASE *et al*, 1992).

Para determinação de vitaminas do complexo B, frequentemente, utiliza-se pares iônicos. Estes são íons orgânicos que, na presença da fase móvel, afetam a resolução de compostos devido à formação de um complexo equilíbrio com amostras polares e a fase reversa apolar, proporcionando uma melhora na resolução dos picos cromatográficos (WILLS *et al*, 1977). Na de fase reversa, a cromatografia de par iônico depende do pH da fase móvel. As variações de pH podem afetar a retenção do analito, a reação de equilíbrio entre o analito e os componentes do reagente par iônico e as interações com a fase estacionária (GENNARO *et al*, 1994).

DONG *et al*, 1988, estudaram os fatores que afetavam a cromatografia de par iônico na análise de padrões de vitaminas hidrossolúveis e verificaram que,

para a tiamina, o ácido hexanossulfônico a retém melhor que o ácido pentanossulfônico. Observaram, ainda, que o aumento do pH da fase móvel reduziu o tempo de retenção da tiamina e que a adição de trietilamina não melhorou a resolução do pico desta vitamina.

BARNA e DWORSCHÁK (1994) analisaram amostras de carne e fígado utilizando par iônico hexanossulfônico, heptanossulfônico e octanossulfônico. O tempo de retenção da tiamina foi menor com o hexanossulfônico, comparado com heptanossulfônico; porém, houve a co-eluição com interferentes. O heptanossulfônico obteve a melhor separação dos compostos interferentes e o octanossulfônico aumentou o tempo de retenção da vitamina, formando picos pequenos e largos.

1.3.3.4 SISTEMAS DE DETECÇÃO

O detector ultravioleta (UV) é o mais utilizado em laboratórios de análise de alimentos. Porém, possui baixa sensibilidade comparada com o detector de fluorescência. A preparação de amostras para UV é bem mais simples, pois as vitaminas não precisam de derivação como na fluorescência, exceto a riboflavina e a piridoxina que respondem com sua fluorescência natural (ALBALÁ-HURTADO *et al*, 1997).

Algumas metodologias foram desenvolvidas para determinação direta da tiamina por UV, mas o baixo conteúdo da vitamina e a grande quantidade de interferentes limitaram seu uso. O tiocromo, forma derivada da tiamina, é determinado por fluorescência, método que possui alta reprodutibilidade, sensibilidade e reduz a detecção de interferentes (MAURO e WETZEL, 1984; WIMALASIRI e WILLS, 1985; VALLS *et al*, 1999).

A técnica de detecção desenvolvida por KAMMAN *et al* (1980) usou o detector de UV na determinação simultânea de tiamina e riboflavina, porém a baixa sensibilidade restringiu seu uso em alimentos com baixos teores destas vitaminas. O método descrito por ANG e MOSELEY (1980) utilizou o detector de

fluorescência e determinou pequenas quantidades das duas vitaminas. A alta especificidade limita a detecção de interferentes (FELLMAN *et al*, 1982).

Os métodos espectrofluorimétricos são baseados na oxidação da tiamina e da riboflavina, que formam tiocromo e lumiflavina, respectivamente. Estes produtos são compostos fluorescentes. Na reação de oxidação, pré ou pós-coluna, utiliza-se o ferricianeto de potássio, brometo cianogênio, óxido de mercúrio ou N-bromossuccinamida, como agentes oxidantes. A maioria dos métodos sofre com a alta instabilidade do tiocromo na presença de excesso de reagente oxidante (MOHAMED, 1988). O tiocromo é submetido à etapa de extração por isobutanol, pois o solvente orgânico separa o tiocromo de outros compostos fluorescentes (GARCÍA *et al*, 1993).

SIMS e SHOEMAKER (1993) utilizaram a fluorescência para determinação simultânea de B₁ e B₂ em brócolis. Para detecção utilizaram λ_{Ex} 370nm e λ_{Em} 435nm para tiamina, na forma de tiocromo, e λ_{Ex} 370nm e λ_{Em} 520nm, para riboflavina, na forma de lumiflavina. A derivação por reação de oxidação foi realizada pré-coluna com ferricianeto de potássio a 1%. Dados de recuperação mostram que a riboflavina é estável ao processo oxidativo na derivação pré-coluna; portanto, é determinada simultaneamente nas análises de B₁ e B₂ (FINGLAS e FAULKS, 1984).

1.3.3.5 IDENTIFICAÇÃO

A identificação das vitaminas hidrossolúveis por CLAE é realizada por co-cromatografia e pela comparação dos tempos de retenção dos picos fornecidos pela amostra e padrões (FERMANDO e MURPHY, 1990). Dependendo da matriz, o tempo de retenção da vitamina varia devido à complexidade e à presença de interferentes, o que dificulta a identificação (FINGLAS e FAULKS, 1987). Mudanças no tempo de retenção foram observadas nas análises de tiamina e riboflavina em batatas, causadas por interferentes da matriz (FINGLAS e FAULKS, 1984).

A espectrofotometria de massa e a espectroscopia no infravermelho são técnicas de identificação vantajosas, principalmente para desenvolver métodos de referência para validar determinações vitamínicas por CLAE (POLESELLO e RIZZOLO, 1990; RIZZOLO e POLESELLO, 1992).

1.3.3.6 QUANTIFICAÇÃO

A quantificação das vitaminas hidrossolúveis, normalmente, é realizada com a construção de curvas de padronização externa, utilizando a área ou altura dos picos. Entretanto, ácido hidroxibenzoico, cloroetiltiamina e acetilaneurina, são utilizados como padrões internos na determinação simultânea de vitaminas, por possuírem propriedades físico-químicas similares a tiamina (LYNCH e YOUNG, 2000).

1.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

A validação tem por objetivo assegurar que o método utilizado seja adequado ao que se propõe identificar ou quantificar, ou seja, permita produzir resultados que se enquadrem às necessidades do problema em questão. Validação de um método analítico pode ser realizado de diversas maneiras e depende do objetivo da análise (CHASIN *et al*, 1998; BRUCE *et al*, 1998).

Vários procedimentos estatísticos são utilizados com a finalidade de desenvolver, avaliar e validar um método analítico (WERNIMONT, 1985; YODEN, 1982; STEINER, 1982), entre os quais destacamos:

A) EXATIDÃO

A exatidão é a diferença entre o valor real presente na amostra e o valor obtido na análise. É avaliada pelo afastamento entre os valores esperado e obtido. O valor real é determinado por análises de material de referência ou por amostras com adição de padrões (CHASIN *et al*, 1998; BARROS NETO *et al*, 1995; WILRICH, 1993a).

A recuperação utiliza a adição de padrões para avaliar a eficiência das etapas de derivação e limpeza do extrato. Este procedimento verifica perdas de vitaminas e a eficácia da extração. Quando temos baixos valores de recuperação, há indício de perdas do analito durante os procedimentos analíticos. Valores de recuperação muito acima de 100% indicam ineficácia da etapa de limpeza. As faixas de recuperação para as vitaminas B₁ e B₂ determinadas em alimentos por CLAE, utilizando procedimentos de limpeza variados, estão dispostas na **Tabela 3**.

Tabela 3: Faixas de recuperação das vitaminas B₁ e B₂ determinadas por CLAE, utilizando procedimentos variados de limpeza.

Matriz	Recuperação	Limpeza	Referências
Alimentos variados	B ₁ 85-100%	ácido tricloroacético	HAGG (1994)
	B ₂ 80-100%		
Carnes	B ₁ 83-85%	Sep-Pak C ₁₈	BARNA e DWORCHÁK (1994)
	B ₂ 71-89%		
Soja e tofu	B ₁ 42-106%	precipitação no ponto isoelétrico	FERNANDO e MURPHY (1990)
	B ₂ 47-102%		
Alimentos medicinais	B ₁ 103-119%	precipitação com perclorato e refrigeração	CHASE <i>et al</i> , (1993a)
	B ₂ 89- 104%		

B) PRECISÃO

Ao desenvolver um método analítico, o valor encontrado do analito será dependente de erros indeterminados, aleatórios e impossíveis de serem eliminados. Esta variabilidade pode ser avaliada pela repetibilidade e reprodutibilidade do método (CHASIN *et al*, 1998; CAULCUT e BODDY, 1983).

A repetibilidade utiliza um único método, com o mesmo material, sob as mesmas condições analíticas, mesmo laboratório e equipamento em curtos intervalos de tempo. Desta forma, é esperada a concordância entre resultados sucessivos. A reprodutibilidade só se diferencia da repetibilidade por utilizar diferentes operadores, laboratórios, equipamentos e/ou intervalos de tempo (CHASIN *et al*, 1998). Ao avaliar a reprodutibilidade em 18 laboratórios europeus, HOLLMAN *et al* (1993b) observaram a faixa de desvio padrão de 11% a 18% para vitamina B₁ e 28% a 74% para B₂. Estas vitaminas foram determinadas por CLAE, métodos fluorimétricos e microbiológicos.

Para avaliar a precisão nas determinações vitamínicas, os valores de CV em alimentos, por CLAE, apresentam-se abaixo de 13% (FERNANDO e MURPHY, 1990; BARNA e DWORCHÁK, 1994; CHASE *et al*, 1993b).

C) SENSIBILIDADE

A sensibilidade é definida como a capacidade de um método distinguir, com nível de confiança, duas concentrações próximas. Parâmetros, como a capacidade do instrumento em distinguir o sinal e o ruído (relação S/R), as propriedades físico-químicas do analito e a composição da matriz, afetam a sensibilidade de um método analítico. A sensibilidade pode ser expressa como a inclinação da regressão linear da curva de calibração. Quanto maior o coeficiente angular, maior será a sensibilidade do método (CHASIN, *et al*, 1998).

Os limites de detecção e de quantificação também são indicativos da sensibilidade. Na **Tabela 4** temos variações entre os limites de detecção das vitaminas B₁ e B₂ analisadas por CLAE, usando detector UV e fluorescência.

Tabela 4: Limites de detecção das vitaminas Tiamina (B₁) e Riboflavina (B₂) analisadas por CLAE, em alimentos variados.

Matriz	Limite de detecção	Vol. injeção	Detector	Referência
Fórmula infantil (leite e soja)	B ₁ -0,15µg/ml B ₂ -0,09µg/ml	—	UV	CHASE <i>et al</i> (1992)
Alimentos medicinais	B ₁ -0,05µg/ml B ₂ -0,01µg/ml	—	fluorescência	CHASE <i>et al</i> (1993a)
Queijo	B ₂ -2,5ng	25µl	UV	STANCHER e ZONTA (1986)
Alimentos variados	B ₁ e B ₂ 0,005µg	50-100µl	UV	WIMALASIRI e WILLS (1985)
	B ₁ - 0,002µg B ₂ - 0,003µg	50-100µl	fluorescência	WIMALASIRI e WILLS (1985)

D) RUSTICIDADE

No teste de rusticidade, os valores obtidos na metodologia possuem habilidade de permanecer inalterados por pequenas mudanças de parâmetros operacionais. As pequenas alterações, como de pH e concentração da fase móvel, teste enzimático, peso da amostra, qualidade e idade de reagentes, equipamentos, podem influenciar no resultado final, porém dentro de uma faixa aceitável de variação (CHASIN *et al*, 1998). A literatura disponível, até o momento, não fornece informações sobre os estudos de rusticidade nos métodos desenvolvidos para vitaminas tiamina e riboflavina, em vegetais folhosos.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, T. S. e GODOY, H. T. Simultaneous Determination of Nicotinamide, Nicotinic Acid, Riboflavin, Thiamin, and Pyridoxine in Enriched Brazilian Foods by HPLC; **Journal High Resolution Chromatography**, v. 20: 245-248, 1997.

ALBALÁ-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 778: 247-253, 1997.

AMAYA-FARFAN, J., DOMENE, S. M. A., PADOVANI, R.M. DRI: Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Revista Nutrição da Pucamp**, v.14(1): 71-78. 2001.

ANG, C. Y. W. e MOSELEY, F.A. Determination of thiamin and riboflavin in meat and meat products by HPLC. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 28(3): 486-489, 1980.

BARNA, E. e DWORSCHÁK, E. Determination of thiamine (vitamin B₁) and riboflavin (vitamin B₂) in meat and liver by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 668: 359-363, 1994.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Editora da Unicamp, Campinas, 299p, 1995.

BATES, C. Riboflavin. **International Journal Vitamin Nutrition Research**, v.63(4): 275-277, 1993.

- BLANCO, D.; SÁNCHEZ, L. A.; GUTIÉRREZ, M. D. Determination of water soluble vitamins by liquid chromatography with ordinary and narrow-bore columns. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 17 (7): 1525-1539, 1994.
- BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. Ed. Academic Press. pp: 437-447, 1993.
- BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimical Acta**, v.128: 93-106, 1998.
- CAULCUTT, R. & BODDY, R. **Statistics for analytical chemists**. 1th ed., Chapman and Hall, Londres, 253p, 1983.
- CHASE, Jr. G. W.; LANDEN, Jr. W. O.; EITENMILLER, R. R.; SOLIMAN, A. G. Liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in infant formula. **Journal of AOAC International**, v. 75 (3): 561-565, 1992.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O. & SOLIMAN, A. G. Method modification for liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and pyridoxine in medical foods. **Journal of AOAC International**, v. 75 (3), 561-565, 1993a.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O.; SOLIMAN, A. G. e EITENMILLER, R. R. Liquid chromatography analysis of niacin in fortified food products. **Journal of AOAC International**, v. 76 (2), 390-393, 1993b.
- CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S., Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11(1): 1-6, 1998.
- CHAVES, N. **Nutrição Básica e Aplicada**. Ed. Guanabara Koogan, pp: 108-110, 1978.

CHU, K. e TIM, K. Analysis of commercial multi-vitamin preparation by HPLC with diode-array detector. **Analytical Letters**, v. **31**(15): 2707-2715, 1998.

CHUANG, C.; AVERY RAGAN, Jr. F.; PRASAD, C. Use of triethylamine as an ion-pairing reagent. **Journal of Liquid Chromatography**, v. **17** (11): 2383-2394, 1994.

CUNNIFF, P. (ed). Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed. **AOAC International**, Gaithersburg, Maryland, 1995.

DAWSON, R. M. P.; ELLIOTT, D. C.; ELLIOTT, W. H.; JONES, K. M. **Data of Biochemistry Research**. Ed. Oxford University Press NY and Oxford. 2º ed. pp: 209-210, 1969.

DEVLIN, T. M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. 4ª ed., Editora Wiley- Liss, pp: 1119-1135, 1997.

DEUTSCH, M. J. Vitamins and others nutrients in: Thiamine (Vitamin B₁ in bread- Method 957.17). Riboflavine (vitamin B₂ in food and vitamin preparation - Method 970-65) In CUNNIFF, P. (Ed.) **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16ª ed Volume II, Capítulo 45, pp: 8-9, 1998.

DONG, M. W.; LEPORE, J.; TAURUMOTO, T. Factors affecting the ion-pair chromatography of water soluble vitamins. **Journal Chromatography**, v. **442**: 81-95, 1988.

DWIVEDI, B. K. e ARNOLD, R. G. Chemistry of thiamine degradation: Mechanism of thiamine degradation in a model system. **Journal of Food Science**, v. **37**: 886-888, 1972.

FAVIER, C.J., **Repertório Geral dos Alimentos**. Editora Roca. 1999.

- FELLMAN, J. K.; ARTZ, W. E.; TASSINARI, P. D.; COLE, C. L.; AUGUSTIN, J. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in select foods by high-performance liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v. 47: 2048-2050, 1982.
- FENNEMA, O R. **Química de los alimentos**. Editora Acribia. pp: 557-565, 1993.
- FERMANDO, S. M. e MURPHY, P. A. HPLC determination of thiamin and riboflavin in soybeans and tofu. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 38: 163-167, 1990.
- FERREIRA, F.A .G. **Nutrição Humana**. 2º edição. pp: 377-419, 1983.
- FINGLAS, P. M. e FAULKS, R. M. The HPLC analysis of thiamin and riboflavin in potatoes. **Food Chemistry**, v. 15: 37-44, 1984.
- FINGLAS, P. M. e FAULKS, R. M., Critical review of HPLC methods for determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 3: 251-283, 1987.
- FINGLAS, P. M., Thiamin. **International Journal Vitamin Nutrition Research**, v.63 (4): 270-274, 1993.
- FOX, J. B., THAYER, D. W. Radical oxidation of riboflavin. **International Journal Vitamin Nutrition Research**, v. 68: 174-180, 1998.
- FRANCO, G., **Tabela de Composição Química de Alimentos**. 9ª ed., Editora Atheneu, 1995.

GARCIA, F. P.; DÍAZ, C.; HARDISSON, A., Spectrofluorometric determination of thiamin and riboflavin in vegetable foods. **Analytical Letters**, v. **26** (9): 1977-1996, 1993.

GEHRING, T. A.; COOPER, W. M.; HOLDER, C. L. THOMPSON, JR. H. C.; Liquid chromatography determination of thiamine in rodent feed by postcolumn derivatization and fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. **78** (2): 307-309, 1995.

GENNARO, M. C.; GIACOSA, D.; ABRIGO, C. The role of the mobile-phase in ion-interaction RP-HPLC. **Journal of Liquid Chromatography**, v. **17**(20): 4365-4380, 1994.

GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A. e KOZIOŁOWA, A. Chromatographic determination of riboflavin and its derivatives in food. **Journal of Chromatography A**, v. **881**: 285-297, 2000.

HÄGG, M., Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamine and riboflavin in foods. **Journal of AOAC International**, v. **77**(3): 681-686, 1994.

HAWK, P. D., OSER, B. L.; SUMMERSON, W. H. **Vitamins and deficiency diseases in practical physiological chemistry**. 13^o ed. pp: 1104-1296, 1954.

HIRAYAMA, S. e MARAYAMA, M. Determination of a small amount of niacin in foodstuffs by HPLC. **Journal Chromatography**, v. **588**: 171-175, 1991.

HOLLMAN, P. C.; BOENKE, A.; WAGSTAFFE, J. P. The certification of major components and major elements in five food reference materials. **Frenesius Journal Analytical Chemistry**, v. **345**: 174-179, 1993a.

- HOLLMAN, P. C.; SLANGEN, J. H.; WAGSTAFFE, J.P.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D. A. T.; FINGLAS, P. M. Intercomparison of methods for the determination of vitamins in food. **Analyst**, v. 118: 481-488, 1993b.
- Instituto de Nutricion de Centro America y Panama (INCAP) Y Archivos Latinoamericanos de Nutricion (ALAN). **Conocimientos Actuales en Nutricion**. 4ª ed., 1978.
- KAMMAN, J. F.; LABUZA, T. P.; WARTHESEN, J. J. Thiamin and riboflavin analysis by high performance liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v.45: 1497-1504, 1980.
- KANAREK, R. B. **Nutrition and behavior: new perspective**. 1991.
- LAM, F.; HOLCOMB, I. J.; FUSARI, S. A. Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, niacinamide, pyridoxine, thiamine and riboflavin in multivitamin-mineral preparations. **Journal Association Off Analytical Chemistry**, v.67(5):1007-1011, 1984.
- LAKSHMI, A. V., Riboflavin metabolism- Relevance to human nutrition. **Indian Journal Medicine Research**, v. 108:182-190, 1998.
- LYNCH, P. L. M. e YOUNG, I. S., Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881: 267-284, 2000.
- MacBRIDE, D. E. e WYATT, C. J. Evaluation of a modified AOAC determination for thiamin and riboflavin in foods. **Journal of Food Science**, v. 48: 748-750, 1983.
- MACRAE, R. HPLC determination of vitamins. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 7: 247-260, 1990.

MAURO, D. J. e WETZEL, D. L. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in enriched cereal based products by HPLC using selective detection. **Journal Chromatography**, v. **299**: 281-287, 1984.

MAHAN, L. K. & ARLIN M. T. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 8ª ed. Editora Roca, São Paulo, pp: 86-90, 1995.

McCORMICK, D. B. Riboflavin. In SHILLS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. (Ed). **Modern Nutrition in Health and Disease**. USA: Lippincott Williams & Wilkins, pp: 391-399, 1999.

MOHAMED, A. I.; HUSSEIN, S. A.; EL-SHABOURI, S. R. Spectrofluorometric Assay of thiamine hydrochloride in injections and multivitamin preparations. **Journal Association of Analytical Chemistry**, v. **71** (6):1131-1133, 1988.

MORENO, P. e SALVADÓ, V. Determination of eight water and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. **870**: 207-215, 2000.

MULLEY, E. A., STUMBO, C. R., HUNTING, W. M. Kinetics of thiamine degradation by heat: Effect of pH and form of the vitamin on its rate of destruction. **Journal of Food Science**, v. **40**: 989-992, 1975.

MUÑOZ, S. M. L. Farelo de arroz: sua utilização em mistura alimentícia processada por extrusão. **Escola Superior de Agricultura de Lavras**. pp:3-33, 1986.

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

- NÓBREGA, F.J. **Distúrbios da Nutrição**. Ed. Revinter, 1998.
- NUTRITION REVIEWS'. **Present Knowledge in Nutrition**. 5^a ed, The nutrition Foundation, Inc. Washington, D.C., pp: 273, 1984.
- POLESELLO, A. e RIZZOLO, A. Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods: 2 (a review 1985-1989). **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 8: 105-158, 1990.
- POLESELLO, A. e RIZZOLO, A. Applications of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods (a review 1981-1985). **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 2: 153-187, 1986.
- Recommended Dietary Allowances (RDA)**. 10^o ed. pp: 125 – 136, 1989.
- RIBAROVA, F.; SHISHKOV, N.; OBRETEANOVA, N.; METCHKUEVA, L. Comparative determination of riboflavin in milk by HPLC and lumiflavin methods. **Die Nahrung**, v. 31 (1): 77-79, 1987.
- RIZZOLO, A. e POLESELLO, S. Chromatographic determination of vitamins in foods. **Journal of Chromatography**, v. 624: 103-152, 1992.
- RUSSELL, L. F. e VANDERSLICE, J. T. Comments on the standard fluorometric determination of riboflavin in foods and biological tissues. **Food Chemistry**, v. 43: 79-82, 1992.
- RUSSELL, L. F. e VANDERSLICE, J. T. A comprehensive review of vitamins B₂ analytical methodology. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 8: 257-310, 1990.
- RYU, Y. W.; KIM, E. S.; SONG, C. S. Riboflavin and thiamine absorption. **Yonsei Medical Journal**, v. 9 (1): 11-13. 1968

SIMS, A. e SHOEMAKER, D. Simultaneous liquid chromatographic determination of thiamine and riboflavin in selected foods. **Journal of AOAC International**, v. 76 (5): 1156-1160, 1993.

SOLEDAD, A. H.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography; **Journal of Chromatography A**, v. 778: 247-253, 1997.

STANCHER, B. e ZONTA, F. High performance liquid chromatography analysis of riboflavin (vitamin B₂) with visible absorbance detection in Italian cheeses. **Journal Food Science**, v. 51 (3), 857-858, 1986.

STEINER, E. H. Planning and analysis of results of collaborative tests. In: Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists. 3th ed. **Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, 88p, 1982.

TANPHAICHITR, V. Thiamin. In SHILLS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. (Ed). **Modern Nutrition in Health and Disease**. USA: Lippincott Williams & Wilkins, pp: 381-389. 1999

VALLS, F.; SANCHO, M. T.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; CHECA, M. A. Determination of total riboflavin in cooked sausages. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 47: 1067-1070, 1999.

Van Den BERG, 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 (1): 101-108, 1996.

- WATADA, A. E. e TRAN, T. T. A sensitive high-performance liquid chromatography method for analysing riboflavin in fresh fruits and vegetables. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 8 (9): 1651-1662, 1985.
- WERNIMONT, G. T. Use of statistics to develop and evaluate analytical methods. **Association of Official Analytical Chemists**, Virginia, 183p, 1985.
- WILLS, R. B. H.; SHAW, C. G.; DAY, W. R. Analysis of water soluble vitamins by high pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography Science**, v.15: 262-266, 1977.
- WILRICH, P. Role of statistics in analytical quality assurance. In: Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. International Seminar of AOAC. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, 1992. **International Dairy Federation, Belgica**, 9302: 61-79, 1993a.
- WIMALASIRI, P. e WILLS, R. B. H. Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 318: 412-416, 1985.
- YODEN, W. J. Statistical techniques for collaborative tests. In: **Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists**. 3th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 88p, 1982.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DAS ETAPAS ANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS VITAMINAS B₁ E B₂ EM VEGETAIS FOLHOSOS NÃO CONVENCIONAIS

Ramos, K. L.²; Souza, E. M. T.¹; Godoy, H. T.²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Celular

² Universidade Estadual de Campinas, Depto. Ciência de Alimentos

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DAS ETAPAS ANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS VITAMINAS B₁ E B₂ EM ALIMENTOS NÃO CONVENCIONAIS

Ramos, K. L.²; Souza, E. M. T.¹; Godoy, H. T.²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Celular

² Universidade Estadual de Campinas, Depto. Ciência de Alimentos

RESUMO

A determinação de vitaminas em alimentos enfrentam uma série de desafios em função da baixa concentração dos micronutrientes e da presença de interferentes provenientes da matriz alimentícia. O presente estudo avaliou as etapas analíticas para determinação simultânea de tiamina (B₁) e riboflavina (B₂) por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) na serralha (*Sonchus oleraceus* L.), alimento não convencional. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a extração com associação das hidrólises ácida e enzimática e a limpeza do extrato com centrifugação e filtração em membranas de 0,45 µm. A melhor separação cromatográfica foi obtida em coluna analítica Shim-pack C₁₈, marca SHIMADZU, 250mm x 4,6mm d.i., 5µm, protegida por coluna de guarda 10mm x 4,6mm Inertsil ODS-3, a uma vazão de 1,2mL/min, utilizando eluição isocrática, com fase móvel composta por 22% metanol, 2,5% acetonitrila e 75,5% de fase aquosa (ácido hexanossulfônico 5Mm, trietilamina 0,15%, pH ajustado a 2,8 com ácido sulfúrico concentrado). As vitaminas foram detectadas, simultaneamente, por fluorescência. A derivação da tiamina a tiocromo e riboflavina a lumiflavina realizou-se por reação de oxidação com ferricianeto de potássio a 1%. A quantificação foi feita por padronização externa.

ABSTRACT

The quantification and determination of food vitamins are a challenge to reach because of the low concentration of micronutrients and the presence of interfering substances in the food matrix. Thus, the objective of this study was to evaluate the analytical stages of the simultaneous determination of thiamin (B₁) and riboflavin (B₂) by HPLC (high performance liquid chromatography) in unconventional green as serralha (*Sonchus oleraceus* L.). The best results were obtained using an extraction procedure with the association of acid and enzymatic hydrolysis and the cleaning of the extract using centrifugation and filtration with a 0.45 µm membrane. The best chromatographic separation of the vitamins was obtained using an analytic column SHIM-PACK C₁₈ CLC (M), 250mm x 4.6mm, 5µm, SHIMADZU, with guard-column 10mm x 4.6mm Inertsil ODS-3, flow rate of 1.2mL/min, and an isocratic elution with 22% methanol, 2.5% acetonitrile and 75.5% aqueous phase (5Mm hexanosulfonic acid and 0.15% triethylamine, pH adjusted to 2.8 with concentrate sulfuric acid). The simultaneous detection of the vitamins was performed using fluorescence. The derivation of thiamin to thiochrome and riboflavin to lumiflavin was achieved by oxidation reaction with potassium ferricyanide 1%. The quantification was done by external standardization.

2.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, programas de alimentação alternativa estimulam o consumo de novas fontes alimentares. Instituições não governamentais adotaram o uso de não convencionais, ou alimentos alternativos, com a finalidade de prevenir e recuperar crianças desnutridas com idade pré-escolar.

Os alimentos não convencionais são produtos e/ou subprodutos agrícolas, como farelos de cereais, pó da folha de mandioca (*Manihot esculenta*), sementes de girassol e abóbora. Também se incentiva a utilização dos folhosos verde-

escuros (beldroega - *Portulacca oleracea* L, Amaranthus sp, serralha - *Sonchus oleraceus* L. e tanchagem - *Plantago tomentosa* Lom. e folhas de beterraba, rabanete e chuchu (BEAUSSET, 1992).

A utilização desses alimentos como suplemento, vitamínico ou mineral, difundiu-se no Brasil em regiões que possuem altos índices de desnutrição e mortalidade infantil, principalmente em crianças menores de 5 anos (MADRUGA e CAMARA, 2000).

As vitaminas tiamina (B_1) e riboflavina (B_2) ocorrem na forma livre ou combinada nos alimentos. São comumente determinadas de forma isolada por meio de métodos microbiológicos ou fluorimétricos. A tiamina é extraída por hidrólise ácida e digestão enzimática. Posteriormente, é purificada por coluna cromatográfica, oxidada a tiocromo e detectada fluorimetricamente (λ_{Em} 435nm). A riboflavina sofre extração ácida e identificação fluorimétrica em λ_{Em} 525nm (WILLS *et al*, 1985).

A extração adotada para determinação por CLAE também se baseia na hidrólise ácida, com HCl ou H_2SO_4 0,1N, e enzimática. Porém, faz-se uso da autoclave (15-30min/121°C). Estas etapas têm por finalidade desnaturar proteínas, liberar as vitaminas associadas a complexos protéicos e converter açúcares complexos em simples (SIMS e SHOEMAKER, 1993; GEHRING *et al*, 1995; NDAW *et al*, 2000).

Na determinação vitamínica por CLAE, a etapa de clarificação utiliza agentes desproteinizantes para limpeza do extrato. Normalmente, a amostra é tratada com ácido tricloroacético a 50%, por 5min/60°C ou 10min/100°C (FELLMAN *et al*, 1982; WATADA e TRAN, 1985), ácido perclórico ou sulfossalicílico 5% a 10% (FINGLAS e FAULKS, 1987). A extração em fase sólida ou cartuchos Sep-Pak é capaz de isolar e concentrar o analito de interesse, minimizando os interferentes (MORENO e SALVADÓ, 2000).

As vitaminas hidrossolúveis são eluídas de modo isocrático, embora alguns pesquisadores referenciem o uso de gradiente para as determinações simultâneas (CHUANG *et al*, 1994; AGOSTINI e GODOY, 1997; CHU e TIN, 1998; MORENO e SALVADÓ, 2000). As fases móveis são constituídas, na sua maioria,

por tampões fosfato, carbonato de amônio, acetato de amônio em pH 5 a 7 (FINGLAS e FAULKS, 1984; BLANCO *et al*, 1994; Van Den BERG *et al*, 1996), por modificadores orgânicos, como metanol em concentrações que variam de 15% a 50%, (LAM *et al*, 1984; WIMALASIRI e WILLS, 1985; SIMS e SHOEMAKER, 1993; HOLLMAN *et al*, 1993b) e acetonitrila 9,5% a 20% (KAMMAN *et al*, 1980; STANCHER e ZONTA, 1986; RIBAROVA *et al*, 1987; CHASE *et al*, 1992).

A baixa sensibilidade do detector de UV limita sua utilização, principalmente em alimentos que contêm quantidades muito pequenas de vitaminas em relação às altas quantidades de interferentes. O detector de fluorescência, por apresentar alta sensibilidade, é muito utilizado na determinação de tiamina. Esta vitamina, por sua vez, é submetida à etapa de derivação, transformando-se em tiocromo (OHTA *et al*, 1984).

A identificação das vitaminas hidrossolúveis, normalmente, é realizada com a comparação dos tempos de retenção dos picos fornecidos pela amostra e pelos padrões, por co-cromatografia. O tempo de retenção da vitamina pode variar devido à complexidade e à presença de interferentes da matriz, o que dificulta a identificação (FINGLAS e FAULKS, 1987).

Este trabalho avaliou as etapas analíticas para determinação simultânea das vitaminas B₁ e B₂ na serralha (*Sonchus oleraceus* L.), alimento não convencional, por CLAE na forma *in natura*.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 MATERIAIS

As amostras de folhosos verde-escuros foram coletadas no Núcleo Rural Alexandre Gusmão, em Brazlândia, DF. Inicialmente, utilizou-se a serralha (*Sonchus oleraceus* L) para realização dos testes pertinentes a metodologia de extração.

Os padrões mononitrato de tiamina (vitamina B₁) e riboflavina (vitamina B₂) foram fornecidas pela Sigma Chemicals Co, USA. A tiamina foi eluída em etanol 20% em pH 3,5 e a riboflavina em ácido acético 0,02N. As soluções padrões das vitaminas foram armazenadas a temperatura de refrigeração. A enzima claradiastase, eluída em acetato de sódio 2,5N e pH 4,5, foi fornecida pela Fluka, Suíça.

Os solventes orgânicos metanol e acetonitrila (graus cromatográficos) foram fornecidos pela Mallinckro, Brasil. O sal 1-ácido hexanossulfônico (99%) foi fornecido pela Vetec. Os demais reagentes utilizados foram de grau de pureza analítico. Na preparação da fase móvel, utilizou-se a água duplamente deionizada ou Milli-Q (MILLIPORE). Todos os componentes da fase móvel foram filtrados em membranas de 0,45µm de diâmetro e degaseificado com gás Hélio.

2.2.2. EQUIPAMENTO

O equipamento de cromatografia a líquido utilizado foi da marca SHIMADZU série LC-10Avp, constituído por degaseificador de fase móvel, duas bombas LC-10ADvp, forno CTO-10ASvp contendo o injetor manual com alça de amostragem de 20µl, detectores UV-VIS SPD-10AVvp e de fluorescência RF-551, dispostos em série. A esse conjunto foi acoplado o controlador de sistema SCL-10Avp. A coluna cromatográfica utilizada foi a Shim-pack C₁₈ CLC(M) 25cm x 4,6mm, d.i. 5µm, marca SHIMADZU e coluna de guarda 10mm x 4,6mm Inertsil ODS-3.

2.2.3 MÉTODOS

2.2.3.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

A- AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E CLARIFICAÇÃO

Os testes iniciais de extração e clarificação foram realizados com a serralha (*Sonchus oleraceus* L.). Inicialmente, utilizaram-se 7,0g da amostra (folhas novas e velhas) e, posteriormente, foi triturada em gral de porcelana adicionando nitrogênio líquido. Desta forma, foi possível obter um pó homogêneo.

Na etapa de extração, a amostra foi submetida à hidrólise com HCl 0,1N e autoclave à temperatura de 110°C/30 minutos. Após resfriamento, o pH foi ajustado para 4,5 (NaOH 30%) e a amostra levada para hidrólise enzimática.

Testes enzimáticos foram realizados para obter o melhor procedimento de extração. As relações entre concentrações enzimáticas e tempos de incubação foram selecionadas com base no estudo de Van Den BERG, *et al*, 1996, que avaliaram e confrontaram diferentes protocolos de extração. As concentrações enzimáticas (Claradiastase - Fluka) utilizadas neste trabalho foram 40, 120 e 240mg de enzima/100g de amostra, incubadas a 37° C por 1, 4 e 8 horas (**Tabela 2**).

A- COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL E SISTEMA DE ELUIÇÃO

As composições das fases móveis testadas variaram a proporção do metanol e do tampão fosfato de amônio 0,005mol/L. A influência da acetonitrila, trietilamina e ácido hexanossulfônico também foi verificada em diferentes concentrações. As composições contendo acetato de amônio 0,005mol/L foram ajustadas para pH 5,0, as outras para pH 2,8, como indicado na **Tabela 1**. A escolha da fase móvel baseou-se na eficiência do sistema isocrático e na resolução dos picos dos padrões das vitaminas B₁ e B₂.

Tabela 1: Composição das fases móveis para determinação de B₁ e B₂ em alimentos não convencionais (sistema isocrático e detecção por UV (254nm)).

Nº	Fases móveis	(V/V)	Tempo retenção (min)*		Tempo corrida (min)	Vazão (mL/min)
			B ₁	B ₂		
1	MEOH: AcNH ₄ 0,005mol/L	28:72	NR	10,2	20	0,7
2	MEOH: AcNH ₄ 0,005mol/L	40:60	NR	5,4	20	0,7
3	MEOH: ACN: AcNH ₄ 0,005mol/L	20:20:60	10,9	2,1	20	0,7
4	MEOH: ACN: AcNH ₄ 0,005mol/L	30:5:65	10,5	6,7	20	0,7
5	MEOH: ACN: AcNH ₄ 0,005mol/L	35:5:60	NR	NR	25	0,7
6	MEOH: ACN: AcNH ₄ 0,005mol/L	40:20:40	11,2	1,8	20	0,7
7	MEOH: ACN: AcNH ₄ 0,005mol/L	55:40:5	NR	2,2	20	0,7
8	ACN: AcNH ₄ 0,005mol/L	40:60	12	1,8	20	0,7
9	MEOH: ACN: ÁGUA	20:20:60	12,2	NR	20	0,7
10	ACN: ASH+ AcNH ₄ 0,005mol/L	9,5:81,5	NR	NR	20	0,7
11	MEOH: ACN: FA	55:3:42	NR	2,1	20	0,7
12	MEOH: ACN+ FA	35:65	8,2	6,8	20	0,7
13	MEOH: ACN: FA	20:4:76	NR	9,5	20	0,7
14	MEOH: ACN: FA	20:2,5:77,5	10,47	NR	20	0,7
			7,2	11,7		1,0
15	MEOH: ACN: FA	10:2,5:87,5	2,4	18,9	20	0,7
16	MEOH: ACN: FA	15:2,5:82,5	8,6	12,3	20	1,0
17	MEOH: ACN: FA	15:1,5:83,5	NR	19	20	1,0
18	MEOH: ACN: FA	18:2,5:79,5	10,1	26	30	1,2
19	MEOH: ACN: FA	19:2,5:78,5	9,3	24	30	1,2
20	MEOH:ACN: FA	22:2,5:75,5	9,8	18,0	20	1,0
			7,9	16,0		1,2
21	MEOH: ACN: FA	25:2,5:72,5	10,6	21,3	30	1,0

NR - não retida na coluna.

FA - AHS 5Mm e TEA 0,15%

pH - 1- 9 pH 4,5; 10-21 pH 2,8

O extrato foi centrifugado, filtrado e guardado em frações no congelador. O mesmo procedimento de extração foi repetido sem a etapa da autoclave. Outros testes foram realizados visando a melhoria da clarificação. Utilizou-se o ácido tricloroacético (TCA) a 50%, metanol sob refrigeração de $-18^{\circ}\text{C}/60\text{min}$ e coluna de extração em fase sólida Sep-Pak C_{18} , com eluição em MEOH e tampão acetato de amônio (AcNH_4) $0,005\text{mol/L}$. A **Figura 1** apresenta o fluxograma do processo de extração e clarificação da amostra.

Os extratos foram filtrados em membranas de $0,45\mu\text{m}$ (MILLIPORE-HAWP 01300) e submetidos à cromatografia líquida utilizando o sistema isocrático de eluição composto por 22% MEOH, 2,5% ACN e 75,5% de fase aquosa (5mM AHS e 0,15% TEA, pH 2,8). A vazão de $1,2\text{mL/min}$ permitiu a eluição das vitaminas em uma corrida de 20 minutos.

2.2.3.2 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

O procedimento utilizado para análise de B_1 e B_2 nos folhosos foi padronizado para detecção em fluorescência com λ_{Ex} 375nm, λ_{Em} 508nm e 522nm para B_1 e B_2 , respectivamente. A derivação da tiamina a tiocromo foi realizada por oxidação pré-coluna, utilizando ferricianeto de potássio a 1%. Utilizou-se também a detecção por UV ($\lambda_{254\text{nm}}$) para as duas vitaminas. A identificação dos picos, foi realizada comparando os tempos de retenção obtidos nos padrões e por co-cromatografia.

2.2.3.3 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE QUANTIFICAÇÃO

A curva de padronização foi construída em diferentes concentrações: 0,05; 0,2; 0,6; 1; 2; 4; 6 e $8\mu\text{g/mL}$ de solução $50\mu\text{g/mL}$ de B_1 e B_2 , separadamente. As alíquotas foram diluídas em água com pH 3,5; posteriormente filtradas e injetadas.

Tabela 2: Teste enzimático de extração das vitaminas Tiamina (B₁) e Riboflavina (B₂), com claradiastase (Fluka).

Concentração enzimática	Tempo de incubação
40 mg/g de amostra	1h
40 mg/g de amostra	4h
40 mg/g de amostra	8h
120 mg/g de amostra*	4h
240 mg/g de amostra	1h
240 mg/g de amostra	4h
240 mg/g de amostra	8h

* Ensaio realizado em triplicata.

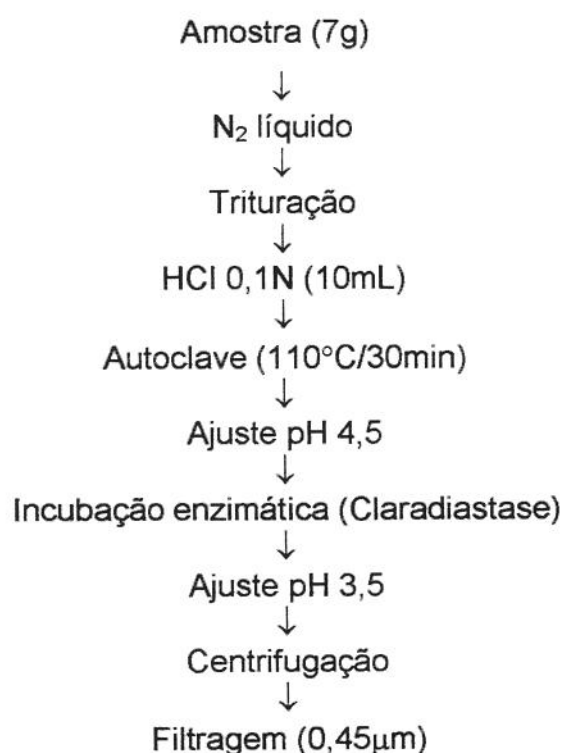


Figura 1: Fluxograma do processo de extração e clarificação da amostra.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

a) Composição da fase móvel

Os resultados mostram que o tempo de retenção das duas vitaminas varia com o pH e com a porcentagem de MEOH. Nas composições das fases móveis com pH 5,0 e diferentes porcentagens de MEOH, **Tabela 1** (números 1-9, exceto nº 8), a tiamina apresentou estreita variação no tempo de retenção: 10,5min a 12,2 min. No entanto, na maioria das composições, a tiamina não ficou retida na coluna. Para verificar a eluição dessa vitamina, foi coletado o volume correspondente a 3min de corrida (tempo morto) e feito uma leitura no espectrofotômetro (λ 254nm). Feita a leitura, foi possível detectar a tiamina no volume coletado, confirmando a suspeita de maior afinidade da B₁ pela fase móvel.

Nas composições seguintes, com adição AHS e TEA, números 10-21 (**Tabela 1**), a tiamina ficou retida na maioria das composições das fases móveis. Segundo WILLS *et al.* (1977), o par iônico afeta a resolução de compostos devido à formação de um equilíbrio entre amostras polares e a fase reversa apolar, proporcionando uma melhoria na resolução dos picos cromatográficos.

As variações de % MEOH na fase móvel, composta por MEOH: ACN: AcNH₄, mostrou a influência deste solvente no tempo de retenção das vitaminas B₁ e B₂. Constatou-se que a tiamina elui em tempos de retenção entre 10,5min a 11,2 min quando a concentração do metanol, na fase móvel, não é superior a 40%, enquanto a riboflavina apresenta maior faixa de variação (**Tabela 1**). Nas concentrações acima de 40% de metanol, a tiamina não eluiu e a riboflavina obteve tempos de retenção próximos ao pico do solvente. Os picos das vitaminas apresentaram alargamento de banda.

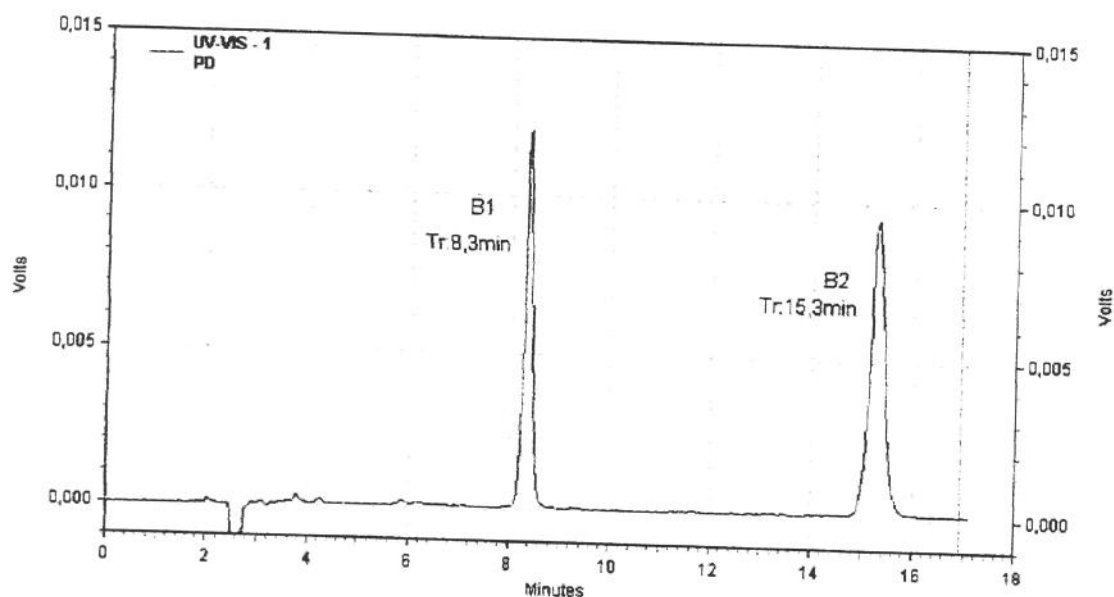
Na tentativa de melhorar a resolução dos picos cromatográficos e obter tempos de retenção afastados do tempo morto, foram testadas pequenas variações na % MEOH e substituição do tampão por AHS e TEA. A melhor resolução dos picos cromatográficos das vitaminas foi com 22% MEOH. A vitamina B₁ apresentou pequena variação no tempo de retenção, enquanto a B₂ foi fortemente influenciada pelo modificador orgânico (**Tabela 1**).

As fases móveis constituídas por MEOH e AcNH₄ não foram suficientes para eluir o padrão de tiamina, sugerindo a adição de outro modificador orgânico, a ACN. Sua presença influenciou na retenção da tiamina; porém, concentrações acima de 2,5% não eluíram a vitamina. A utilização do AHS 5mM e TEA 0,15%, como já mencionado, proporcionaram eluição e melhora na resolução dos picos cromatográficos da tiamina. Preferencialmente, utilizou-se a vazão 1,2mL/min para diminuição do tempo de corrida.

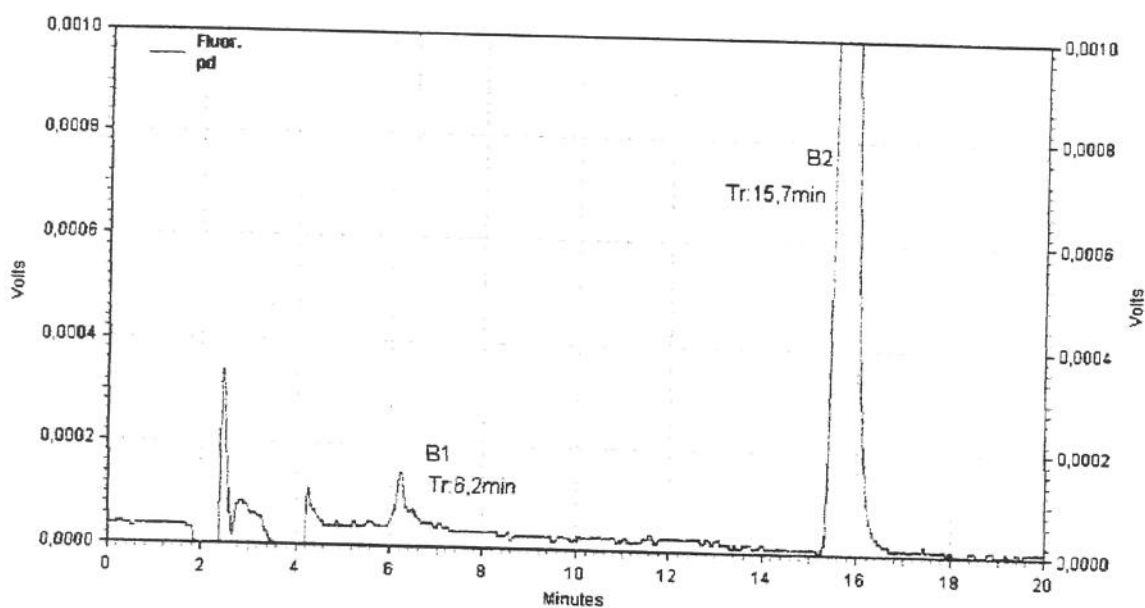
b) Sistema de eluição

O sistema isocrático foi satisfatório para determinação simultânea das vitaminas B₁ e B₂ na serralha (*Sonchus oleraceus L.*), folhoso não convencional, por fluorescência. Somente a vitamina B₂ pôde ser determinada por UV. A vitamina B₁ não obteve uma boa separação e resolução do pico, pois se apresentava eluída próxima aos interferentes da matriz. Os modificadores orgânicos MEOH e ACN conseguiram eluir as vitaminas de interesse. O AHS e a ACN mostraram-se decisivos no tempo de retenção da vitamina B₁.

A fase móvel de melhor resolução foi obtida com 22% MEOH, 2,5% ACN e fase aquosa (5mM AHS e 0,15% TEA, pH 2,8), com vazão de 1,2mL/min e tempo de corrida de 20 minutos (**Figura 2**). A detecção simultânea das vitaminas B₁ e B₂ foi obtida por UV λ 254nm e fluorescência, métodos da AOAC (CUNNIFF, 1995).



A



B

Figura 2: Cromatograma típico dos padrões de B₁ e B₂: (A) detector UV λ 254nm e (B) detector de fluorescência λ_{Ex} 370nm, λ_{Em} 508nm e 522nm B₁ e B₂, respectivamente. Condições cromatográficas: fase móvel com 22% ME OH, 2,5% ACN, 5mM AHS e 0,15% TEA, pH 2,8; vazão de 1,2mL/min.

2.3.2 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE CLARIFICAÇÃO DO EXTRATO

Dentre os agentes precipitantes utilizados nos extratos dos vegetais o TCA a 50% e o MEOH (refrigeração -18°C/ 60min) não conseguiram reduzir ou precipitar os compostos interferentes. A utilização da Sep-Pak C₁₈ não apresentou nenhum efeito positivo para a clarificação, pois as vitaminas eluíram juntamente com interferentes. Possivelmente, a proporção de 40% de tampão acetato de amônio 0,005mol/L e o 60% de metanol utilizada não apresentou eficiência na eluição das vitaminas e eliminação dos interferentes da matriz. Neste trabalho foram realizados poucos testes com a Sep-Pak C₁₈. As etapas de centrifugação e filtração foram utilizadas para remoção de interferentes e preparação do extrato para análise na CLAE. O mesmo procedimento foi adotado por KAMMAN (1980), RUSSELL e VANDERSLICE (1992)

2.3.3 AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

As misturas enzimáticas são, freqüentemente, utilizadas nos procedimentos de extração de vitaminas presentes naturalmente nos alimentos. Entretanto, o tratamento enzimático libera diversos compostos interferentes que dificultam a identificação e quantificação das vitaminas.

Nas hidrólises ácida e enzimática, com ou sem a etapa da autoclave, não foi possível separar, quantificar e identificar a B₁ nos diferentes tratamentos, por UV. Acredita-se que o tratamento térmico (autoclave 110°C/30min) produza grandes quantidades de interferentes, os quais impossibilitam a etapa de filtração, separação cromatográfica e identificação do analito. Quanto à extração sem autoclave, a etapa de limpeza e clarificação da amostra deve ser melhorada, pois os interferentes absorveram na região do UV (λ 254nm). Na determinação de B₂ (UV) o melhor tratamento foi de 4h-120mg de enzima/100g de amostra (**Tabela 3**).

A detecção por fluorescência mostrou resultados satisfatórios. As formas oxidadas da tiamina e da riboflavina facilitaram sua identificação, devido à

especificidade dos produtos. O melhor tratamento de extração enzimática para B₁ e B₂, com autoclave (110°C/30min.), foi de 1h-120mg de enzima/100g de amostra e, sem a autoclave, foi de 4h-120mg de enzima/100g de amostra (**Tabela 3**). Em alguns tratamentos enzimáticos, não foi possível a realização das etapas de filtração e separação cromatográfica devido à hidrólise excessiva de compostos.

A proposta de desenvolver metodologia para determinação simultânea de B₁ e B₂ em alimentos não convencionais, tanto por UV quanto por fluorescência, teve o mesmo procedimento de extração. Desta forma, julgou-se que o melhor tratamento enzimático detectado por UV seria também por fluorescência, o que de fato ocorreu na prática. O tratamento enzimático adotado para determinação simultânea de B₁ e B₂ foi de 4h-120mg de enzima/100g de amostra sem autoclave.

Tabela 3: Comparação dos diferentes tratamentos enzimáticos, com e sem a utilização da autoclave, para extração das vitaminas B₁ e B₂ (µg/100g) em UV e fluorescência.

Tratamento enzimático	Com autoclave (110°C/30min.)				Sem autoclave			
	(µg/100g)				(µg/100g)			
	B ₁		B ₂		B ₁		B ₂	
	UV	Fluor.	UV	Fluor.	UV	Fluor.	UV	Fluor.
1h - 40mg/100g	nd	62,5	27,3	139,1	nd	154,3	nd	73,5
1h - 200mg/100g	nd	nd	145,0	4,8	nd	29,6	57,2	155,3
4h - 120mg/100g	nd	90,5	170,0	147,5	nd	72,99	65,3	105
4h - 120mg/100g	nd	nd	nd	nd	nd	57,83	66,1	101
4h - 120mg/100g	nd	nd	nd	nd	nd	32,1	49,7	136
8h - 40mg/100g	nd	36,0	92,5	106,5	nd	nd	56,4	90,33
8h - 200mg/100g	nd	nd	80,1	3,8	nd	70,7	nd	75,7

*nd: não detectado

As vitaminas B₁ e B₂ presentes na serralha (*Sonchus oleraceus* L) foram detectadas por fluorescência, identificadas por co-cromatografia e quantificadas

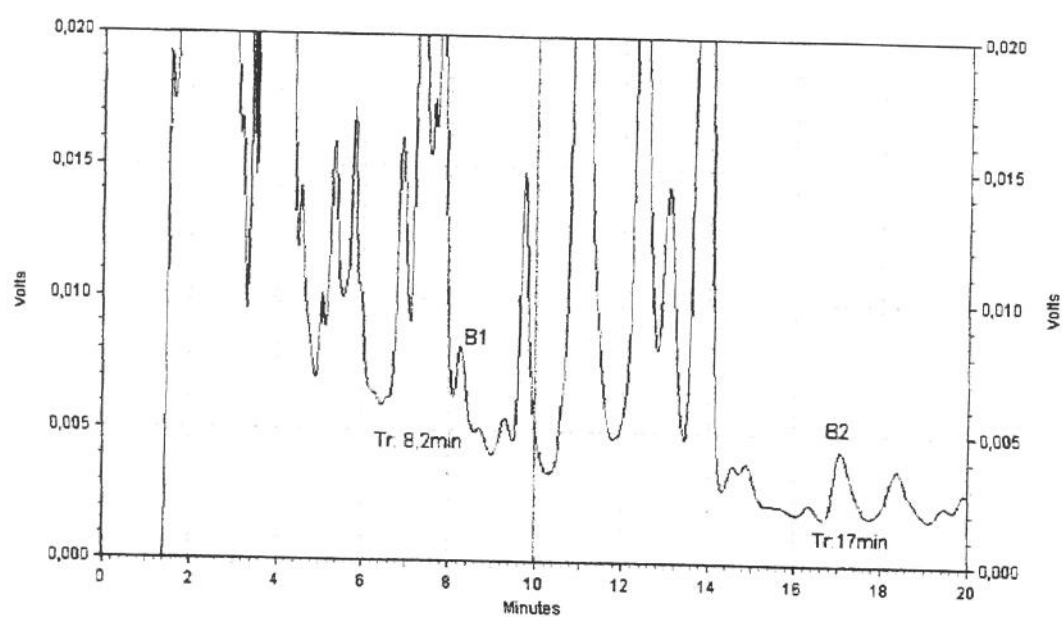
por padronização externa, somente a B₂ foi detectada por UV. Como já mencionado, em alguns testes enzimáticos, não houve a separação e detecção da tiamina por UV. Análises realizadas sem reprodutibilidade possibilitaram a separação (**Figuras 3**), no entanto, apresentaram interferentes que eluíram bem próximo ao tempo de retenção da B₁.

2.4 CONCLUSÃO

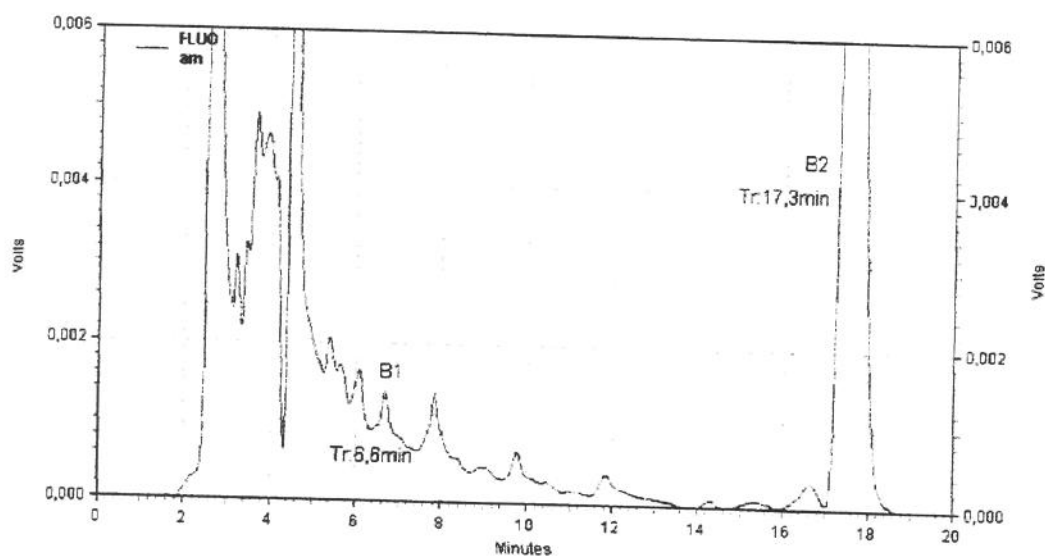
Dentre as etapas analíticas utilizadas na determinação simultânea das vitaminas B₁ e B₂ para serralha, a composição da fase móvel foi decisiva na separação, resolução e identificação dos analitos de interesse. O sistema isocrático apresentou-se satisfatório quando constituído por 22% MEOH, 2,5% ACN e fase aquosa (5mM AHS e 0,15% TEA, pH 2,8), com vazão de 1,2mL/min e tempo de corrida de 20 min. A substituição do tampão acetato de amônio 0,005mol/L por AHS 5Mm e TEA 0,15% proporcionou eluição e melhora na resolução dos picos cromatográficos da tiamina.

Nos tratamentos por hidrólise ácida e enzimática, com ou sem a etapa da autoclave, não foi possível separar, quantificar e identificar a B₁, por UV. Observou-se que para o detector UV, somente a B₂ poderá ser identificada e quantificada. Já a detecção por fluorescência mostrou-se satisfatória, pois as formas oxidadas da tiamina e riboflavina facilitaram sua identificação. O melhor tratamento para B₁ e B₂, sem a autoclave foi de 4h-120mg de enzima/100g de amostra.

Quanto à etapa de limpeza da amostra, a ação dos agentes precipitantes, TCA 50% e MEOH (refrigeração a -18° C/ 60min), não foi eficiente em reduzir os compostos interferentes. A utilização de coluna de Sep-Pak C₁₈ também não apresentou nenhum efeito positivo, o que impossibilitou a utilização da detecção na região do UV.



A



B

Figura 3: Cromatograma típico do extrato de serralha (*Sonchus oleraceus* L), sem autoclave: (A) UV 254nm e (B) fluorescência λ_{Ex} 370nm, λ_{Em} 508 e 522nm B₁ e B₂, respectivamente. Condições cromatográficas: fase móvel com 22% MEOH, 2,5% ACN, 5mM AHS e 0,15% TEA, pH 2,8; vazão de 1,2mL/min.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, T. S. e GODOY, H. T. Simultaneous Determination of Nicotinamide, Nicotinic Acid, Riboflavin, Thiamin, and Pyridoxine in Enriched Brazilian Foods by HPLC; **Journal High Resolution Chromatography**, v. 20:245-248,1997.

BLANCO, D.; SÁNCHEZ, L. A.; GUTIÉRREZ, M. D. Determination of water soluble vitamins by liquid chromatography with ordinary and narrow-bore columns. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 17 (7): 1525-1539, 1994.

BEAUSSET, I. Estudio de las bases científicas para el uso de alimentos alternativos en la nutrición humana; **INAN/UNICEF**, 1992.

CHASE, Jr. G. W.; LANDEN, Jr. W. O.; EITENMILLER, R. R.; SOLIMAN, A.G. Liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in infant formula. **Journal of AOAC International**, v. 75 (3): 561-565, 1992.

CHU, K., TIM, K. Analysis of commercial multi-vitamin preparation by HPLC with diode- array detector. **Analytical Letters**, v. 31(15): 2707-2715, 1998.

CHUANG, C.; AVERY RAGAN, Jr. F.; PRASAD, C. Use of triethylamine as an ion-pairing reagent. **Journal of Liquid Chromatography**, v.17 (11): 2383-2394, 1994.

CUNNIFF, P. (ed). Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed. **AOAC International**, Gaithersburg, Maryland, 1995.

FELLMAN, J. K.; ARTZ, W. E.; TASSINARI, P. D.; COLE, C. L.; AUGUSTIN, J. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in select foods by high-performance liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v. 47: 2048-2050, 1982.

- FINGLAS, P. M. e FAULKES, R. M. The HPLC analysis of thiamin and riboflavin in potatoes. **Food Chemistry**, v. 15: 37-44, 1984.
- FINGLAS, P. M. e FAULKES, R. M., Critical review of HPLC methods for determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 3: 251-283, 1987.
- GEHRING, T. A.; COOPER, W. M.; HOLDER, C. L. THOMPSON, JR. H. C.; Liquid chromatography determination of thiamine in rodent feed by postcolumn derivatization and fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v.78 (2): 307-309, 1995.
- HOLLMAN, P. C.; SLANGEN, J. H.; WAGSTAFFE, J.P.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D. A. T.; FINGLAS, P. M. Intercomparison of methods for the determination of vitamins in food. **Analyst**, v. 118:481-488, 1993b.
- KAMMAN, J. F.; LABUZA, T. P.; WARTHESEN, J. J. Thiamin and riboflavin analysis by high performance liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v.45: 1497-1504, 1980.
- LAM, F.; HOLCOMB, I. J.; FUSARI, S. A. Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, niacinamide, pyridoxine, thiamine and riboflavin in multivitamin-mineral preparations. **Journal Association Off Analytical. Chemistry**, v. 67 (5):1007-1011, 1984.
- MADRUGA, M. S. e CAMARA, F. S. The chemical composition of "Multimistura" as a food supplement. **Food Chemistry**, v. 68: 41-44, 2000.
- MORENO, P. e SALVADÓ, V. Determination of eight water and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870: 207-215, 2000.

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

OHTA, H., BABA, T., SUZUKI, Y. High-performance liquid chromatography analysis of thiamine in rice flour with fluorimetric post-column derivatization. **Journal of Chromatography**, v. **284**: 281-284, 1984.

RIBAROVA, F.; SHISHKOV, N.; OBRETEANOVA, N.; METCHKUEVA, L. Comparative determination of riboflavin in milk by HPLC and lumiflavin methods. **Die Nahrung**, v. **31** (1): 77-79, 1987.

RUSSELL, L. F. e VANDERSLICE, J. T. Comments on the standard fluorometric determination of riboflavin in foods and biological tissues. **Food Chemistry**, v. **43**: 79-82, 1992.

SIMS, A. e SHOEMAKER, D. Simultaneous liquid chromatographic determination of thiamine and riboflavin in selected foods, **Journal of AOAC International**, v. **76** (5): 1156-1160, 1993.

STANCHER, B. e ZONTA, F. High performance liquid chromatography analysis of riboflavin (vitamin B₂) with visible absorbance detection in Italian cheeses. **Journal Food Science**, v. **51** (3), 857-858, 1986.

Van Den BERG, 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** (1): 101-108, 1996.

WATADA, A. E. e TRAN, T. T. A sensitive high-performance liquid chromatography method for analysing riboflavin in fresh fruits and vegetables. **Journal of Liquid Chromatography**, v. **8** (9): 1651-1662, 1985.

WILLS, R. B. H.; SHAW, C. G.; DAY, W. R. Analysis of water soluble vitamins by high pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography Science**, v.15: 262-266, 1977.

WILLS, R. B. H.; WIMALASIRI, P. e GREENFIELD, H. Comparative determination of thiamin and riboflavin in foods by HPLC and fluorometric methods. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 1, 23-29, 1985.

WIMALASIRI, P. e WILLS, R. B. H. Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 318: 412-416, 1985.



Capítulo 3

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE, DAS VITAMINAS B₁ E B₂ EM VEGETAL FOLHOSO NÃO CONVENCIONAL

Ramos, K. L.²; Souza, E. M. T.¹; Godoy, H. T.²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Celular

² Universidade Estadual de Campinas, Depto. Ciência de Alimentos

Capítulo 3

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE, DAS VITAMINAS B₁ E B₂ EM VEGETAL FOLHOSO NÃO CONVENCIONAL

Ramos, K. L.²; Souza, E. M. T.¹; Godoy, H. T.²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Celular

² Universidade Estadual de Campinas, Depto. Ciência de Alimentos

RESUMO

A introdução de novas fontes alimentares via alimentação alternativa tem o objetivo de recuperar, nutricionalmente, crianças desnutridas utilizando produtos ou subprodutos alimentares que contribuem para o enriquecimento da dieta. Entretanto, a falta de metodologias analíticas apropriadas dificulta o conhecimento dos teores de micronutrientes, em especial as vitaminas, em alimentos não convencionais. Com a finalidade de suprir essa carência, este trabalho propõe-se a otimizar e validar metodologia para determinação simultânea das vitaminas B₁ e B₂, por CLAE. Inicialmente as vitaminas foram separadas em coluna C₁₈ e eluídas isocraticamente a uma vazão de 1,2 mL/min. A fase móvel foi composta por 22% metanol, 2,5% acetonitrila e 75,5% de fase aquosa (5Mm de ácido hexanossulfônico e 0,15% de trietilamina, pH 2,8 ajustado com H₂SO₄). O extrato vitamínico obtido da serralha (*Sonchus oleraceus* L.) foi submetido às hidrólises ácida e enzimática. A limpeza do extrato foi realizada por centrifugação e filtração em membranas de 0,45µm. Para determinação simultânea das vitaminas, utilizaram-se detectores UV λ 245nm e de fluorescência, com λ_{Ex} 370nm, λ_{Em} 508nm e 522nm para B₁ e B₂, respectivamente. A quantificação foi realizada por padronização externa e as curvas de padronização apresentaram linearidade (r²=0,9997) na faixa utilizada. Os limites de detecção para as duas vitaminas foram 0,02µg/mL e 0,01µg/mL (UV); 0,01µg/mL e 0,005µg/mL (fluorescência) para

B₁ e B₂, respectivamente. Os limites de quantificação foram considerados o dobro. As taxas de recuperação, determinadas em dois níveis, foram 74% e 114% para B₁, e 102% e 147% para B₂, no menor e maior nível, respectivamente. Os testes de repetibilidade da amostra, realizados apenas na fluorescência, apresentaram um coeficiente de variação para B₁ de 12,8% e 12,6% (I e II níveis) e para B₂ de 5,7% e 6,2% (I e II níveis). A metodologia proposta e validada apresentou-se eficiente quando aplicada em folhosos não convencionais na forma *in natura*.

ABSTRACT

The use of alternative supplements is a way to introduce new food sources for the recovery of malnourished children. This new food source is made by using food products or by-products which contribute to the enrichment of the diet. However, the lack of appropriate analytical methodologies makes it difficult to know the micronutrients content, especially vitamins, in unconventional foods. With the purpose to supply this need, this work proposes to optimize and validate a methodology for the simultaneous determination of B₁ and B₂ vitamins by HPLC. Initially, vitamins were separated in a C₁₈ column, isocratic eluted with a 1.2mL/min flow rate. The mobile phase was composed by 22% methanol, 2.5% acetonitrile and 75.5% aqueous phase (5Mm hexanosufonic acid and, 0.15% triethylamine, pH adjusted to 2.8 with dilute H₂SO₄). The clean-up of the extract revealed to be efficient using centrifugation and filtration with a 0.45µm membrane. The vitamin extract obtained from serralha (*Sonchus oleraceus* L.) was submitted to acid and enzymatic hydrolyses. For the simultaneous determination of vitamins, UV detector (λ 245nm) and fluorescence with λ_{Ex} 370nm, λ_{Em} 508nm and 522nm for B₁ and B₂, respectively, were used. The quantification was obtained though external standardization and the standard curves showed satisfactory linear behavior ($r^2=0.9997$) in the used limit. The detection limits for both vitamins were 0.02µg/mL e 0.01µg/mL (UV); 0.01 µg/ml and 0.005µg/ml (fluorescence) for B₁ and B₂, respectively. The quantification limits were double considered. The recovery rates,

determined in two levels, were 74% and 114% for B₁, and 102% and 147% for B₂, in the minor and higher levels, respectively. The repeatability tests of the sample, conducted only in the fluorescence, showed a variation coefficient of 12,8% and 12,6% (levels I and II) for B₁ and 5,7% and 6,2% (levels I and II) for B₂. The proposed and validated methodology showed efficiency when applied to raw unconventional green leaves.

3.1. INTRODUÇÃO

A alimentação alternativa no Brasil, desde 1986, é utilizada em trabalhos governamentais e por instituições não governamentais, como a Fundação Nacional da Saúde e a Pastoral da Criança (MADRUGA e CAMARA, 2000). A proposta de consumir alimentos não convencionais incentiva a diversificação da dieta e introduz novas fontes de nutrientes (NUÑEZ, 1996).

Nas tabelas brasileiras de composição de alimentos não há relato da composição química dos alimentos não convencionais ou alternativos. Além disso, essas tabelas encontram-se desatualizadas e incompletas. A falta de uma descrição detalhada do processo analítico e/ou o emprego de técnicas inadequadas tornam-nas pouco confiáveis (LAJOLO e MENEZES, 1997; LAJOLO, 1995).

A mensuração de vitaminas por métodos oficiais da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) é simples, porém demorada, minuciosa (HIRAYAMA e MARUYAMA, 1991; FINGLAS e FAULKS, 1984) e faz uso de reagentes altamente nocivos (brometo de cianogênio) e específicos, como as resinas iônicas (Mac BRIDE e WYATT, 1983; RUSSEL e VANDERSLICE, 1992).

A CLAE é uma técnica moderna. Possui alta especificidade, sensibilidade e reduzido tempo de análise. Determina satisfatoriamente a análise simples de um composto ou análise simultânea de vitaminas hidrossolúveis em vegetais frescos (FINGLAS e FAULKS, 1987). A comparação dos métodos desenvolvidos por CLAE com métodos fluorimétricos e microbiológicos propostos pela AOAC

demonstra as vantagens da CLAE nas análises de vitaminas quanto à recuperação, reprodutibilidade, sensibilidade, rapidez e praticidade.

Seja qual for o método analítico escolhido, este deve produzir resultados de alta qualidade e confiabilidade. A validação dos resultados é de extrema importância e pode ser realizada por estudos interlaboratoriais ou intralaboratoriais. A exatidão é um dos principais fatores a serem estabelecidos na validação. Este pode ser avaliado com o uso de materiais de referência certificados (FINGLAS *et al*, 1993). A maioria das vitaminas é instável, o que dificulta a obtenção de material de referência. Estudos recentes avaliam possibilidades no uso de padrões de referência secundários, como substitutos do material de referência. Estão sendo estudados o gérmen de trigo para tiamina, riboflavina e niacina e, para vitamina C, um suco em pó suplementado (GODOY, 2001)

A escolha do método recai na composição química da vitamina, na matriz alimentícia e nos recursos disponíveis. O presente estudo propõe otimizar e validar metodologia para a determinação simultânea dos teores de tiamina (B₁) e riboflavina (B₂) na serralha (*Sonchus oleraceus* L.), alimento não convencional, na sua forma *in natura*.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. MATERIAIS

Inicialmente, foi utilizada a serralha (*Sonchus oleraceus* L.) para realização dos testes pertinentes à validação da metodologia. Todas as amostras foram trituradas em gral de porcelana, utilizando nitrogênio líquido. O pó resultante foi guardado em frascos no freezer -70°C. O extrato obtido da serralha após extração enzimática foi acondicionado em frasco âmbar a 0°C.

3.2.2. REAGENTES

Os padrões mononitrato de tiamina (vitamina B₁) e riboflavina (vitamina B₂) foram fornecidos pela Sigma Chemicals Co, USA. A tiamina foi eluída em etanol 20% em pH 3,5 e a riboflavina em ácido acético 0,02N. As soluções padrões das vitaminas foram armazenadas a temperatura de refrigeração. A enzima claradiastase eluída em acetato de sódio 2,5N e pH 4,5, foi fornecida pela Fluka, Suíça.

Os solventes orgânicos metanol e acetonitrila (graus cromatográficos) foram fornecidos pela Mallinckro, Brasil. O sal 1-ácido hexanossulfônico (99%) foi fornecido pela Vetec. Os demais reagentes utilizados são de grau de pureza analítico. Na preparação da fase móvel utilizou-se a água duplamente deionizada ou Milli-Q (MILLIPORE). Todos os componentes da fase móvel foram filtrados em membranas de 0,45µm de diâmetro e degaseificado com gás Hélio.

3.2.3. EQUIPAMENTO

O equipamento de cromatografia líquida utilizado foi o SHIMADZU série LC-10Avp, constituído por degaseificador de fase móvel, duas bombas LC-10ADvp, forno CTO-10Asvp com sistema de injeção manual (20µl), detectores UV-VIS SPD-10AVvp e de fluorescência RF-551, dispostos em série. A esse conjunto foi acoplado o controlador de sistema SCL-10Avp. A coluna cromatográfica utilizada foi a Shim-pack C₁₈ CLC(M), 25cm x 4,6mm, d.i. 5µm, marca SHIMADZU e coluna de guarda 10mm x 4,6mm Inertsil ODS-3.

3.2.4. MÉTODOS

3.2.4.1. METODOLOGIA ANALÍTICA

Para a extração, utilizaram-se 7,0g de amostra, previamente homogeneizada em nitrogênio líquido e armazenada à -70°C. Na etapa da extração, utilizaram-se 10mL de HCl 0,1N para maceração e, posteriormente, ajustou-se o pH para 4,5 (com NaOH 30%). A etapa seguinte foi a incubação enzimática (claradiastase), na concentração de 120mg de enzima/g de amostra, à temperatura de 37°C a 39°C/4horas. Após o período de incubação, a ação enzimática foi inativada reduzindo o pH para 3,5. A amostra foi centrifugada na velocidade de 13.000rpm/20min, filtrada em membrana fluoropore, FHLP 01300, 0,45µm (MILLIPORE) e injetada no cromatógrafo.

A separação cromatográfica das vitaminas ocorreu por eluição isocrática com vazão de 1,2mL/min e tempo de corrida de 20 minutos. A fase móvel foi composta por 22% MEOH, 2,5% ACN e 75,5% de fase aquosa (AHS 5mM; 0,15% de TEA; pH 2,8). A detecção simultânea das vitaminas B₁ e B₂ foi obtida por UV $\lambda_{254\text{nm}}$ e fluorescência com λ_{Ex} 370nm e λ_{Em} 508nm e 522nm, para B₁ e B₂, respectivamente. As amostras detectadas por fluorescência passaram pela etapa de oxidação pré-coluna, promovendo derivação da tiamina a tiocromo. A identificação realizou-se por comparação dos tempos de retenção obtidos com padrões analisados nas mesmas condições e por co-cromatografia. Na quantificação das vitaminas utilizou-se padronização externa, por meio de curvas construídas com 8 níveis de concentração (0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 µg/mL), sendo cada ponto representado pela média de 3 determinações, a partir de soluções padrão contendo 4,5 e 4,8 µg/mL de B₁ e B₂, respectivamente. A degradação e perda das vitaminas, durante a análise, foram evitadas protegendo-as da ação direta da luz e efetuando as análises rapidamente.

3.2.4.2. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

a) Limite de detecção e de quantificação

Os valores adotados para os limites de detecção, de ambas vitaminas, foram obtidos com o uso de soluções padrão realizando sucessivas diluições, determinando a menor quantidade detectável. Esta menor quantidade detectável foi considerada aproximadamente duas a três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento (PRADO e GODOY, 2002).

O “limite de quantificação” do método é a menor concentração do analito que pode ser medida com uma precisão especificada. Geralmente, sugere-se $10s$ (s = desvio padrão do branco) (CDER, 1994; CHASIN *et. al*, 1998). Segundo, VALENTE SOARES (2001) o limite de quantificação usualmente adotado é 5 vezes o limite de detecção. No entanto, neste trabalho, os limites de quantificação foram estabelecidos em duas vezes o valor dos limites de detecção para cada vitamina.

b) Recuperação de padrões

Testes de recuperação foram realizados com soluções padrão e com a adição dessas soluções à amostra, em dois diferentes níveis de concentração (0,06µg/mL e 2,0µg/mL de B₁ e B₂). Este teste foi realizado apenas com folhas de serralha (*Sonchus oleraceus* L.).

c) Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada, por análises em quintuplicata, em dois níveis de concentrações vitamínicas, de soluções padrão. A partir da sensibilidade ou precisão medida por múltiplas injeções obtivemos o cálculo da estimativa do desvio padrão. No presente trabalho, realizou-se a repetibilidade em dois níveis de

concentração (1,0µg/mL e 2,0µg/mL). As amostras foram determinadas em oito repetições com dupla injeção.

d) Estabilidade dos padrões e da amostra

As soluções padrão das vitaminas foram avaliadas por um período de quatro semanas para a observação da estabilidade das mesmas; o mesmo foi adotado para a amostra.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. ETAPAS ANALÍTICAS

Na **Figura 1** nota-se a resolução dos picos cromatográficos e a separação simultânea das vitaminas das soluções padrão. As vitaminas B₁ e B₂ foram eluídas em tempos de retenção de 8,3min e 15,3min, no UV. Na fluorescência, a tiamina ficou retida em 6,2 min. A alteração no tempo de retenção deve-se à reação de oxidação utilizada para conversão da tiamina a tiocromo. Esta reação não influenciou no tempo da B₂, que se encontra na forma de lumiflavina. Os **Anexos 1 e 2** mostram os perfis dos espectros de absorção das vitaminas B₁ e B₂, presentes nas soluções padrão, obtidos por espectrofotômetro.

As curvas de padronização das vitaminas apresentaram linearidade, nas faixas de concentração pré-estabelecidas (**Anexo 3**). Isto pode ser verificado pelos valores dos coeficientes de correlação, pois estão próximos ao valor ideal 1, o que demonstra maior probabilidade de existir uma relação linear definida. As regressões lineares para estas curvas, onde $y = A + B x$, estão dispostas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Regressão linear das curvas de padronização das vitaminas B₁ e B₂.

Vitaminas	Deteção	A*	B*	R*
B ₁	UV	48899	-2106,1	0,9991
B ₁	Fluorescência	64258	-3024,3	0,9972
B ₂	UV	49531	1211,8	0,9993
B ₂	Fluorescência	756460	-20468	0,9997

* A: coeficiente linear; B: coeficiente angular; R: coeficiente de correlação.

3.3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os limites de detecção (**Tabela 2**) encontrados para as vitaminas B₁ e B₂ foram de 0,02µg/mL e 0,01µg/mL, respectivamente, no UV. Já a fluorescência mostrou-se duas vezes mais sensível. Esta sensibilidade pode ser confirmada por SIMS e SHOEMAKER (1993), que utilizaram a fluorescência e obtiveram limites de detecção 0,05ng para B₁ e B₂, e FINGLAS e FAULKS (1984), que obtiveram 0,5ng e 0,1ng, respectivamente. Os limites de quantificação foram considerados como duas vezes os limites de detecção obtidos nos respectivos detectores.

Tabela 2: Limite de detecção e quantificação da metodologia para detectores de UV e fluorescência.

Vitaminas	Limite de detecção (µg/mL)		Limite de quantificação* (µg/mL)	
	UV	Fluor.	UV	Fluor.
B ₁	0,02	0,01	0,04	0,02
B ₂	0,01	0,0005	0,02	0,001

* Limite de quantificação considerado foi de duas vezes o limite de detecção.

Na repetibilidade dos padrões (**Tabela 3**) utilizou-se concentração de 1µg/mL e 2µg/mL, em duplicata. Pode-se observar que os coeficientes de variação (CV) foram inferiores a 8%, no UV, e inferiores a 5%, na fluorescência. O valor obtido na fluorescência demonstra a sensibilidade desse detector e a especificidade da etapa de derivação pré-coluna. A etapa de derivação pré-coluna confere picos mais definidos e de melhor resolução, se compararmos com pós-coluna (LYNCH e YOUNG, 2000). A repetibilidade da amostra (**Tabela 4**) detectada por fluorescência obteve coeficientes de variação de 12,8% e 5,7% para o nível I (1µg/mL), 12,69% e 6,24% para o nível II (2µg/mL) das vitaminas B₁ e B₂, respectivamente.

Tabela 3: Repetibilidade das vitaminas Tiamina (B₁) e Riboflavina (B₂), em solução padrão, detectado por UV (λ 254nm) e fluorescência (λ_{EX} 370nm).

Variáveis	Vitaminas (µg/mL)			
	UV		Fluorescência	
	B ₁	B ₂	B ₁ (λ_{Em} 508nm)	B ₂ (λ_{Em} 522nm)
Nível I*				
Média + DP**	0,94 ± 0,03	1,02 ± 0,03	0,81 ± 0,03	0,86 ± 0,03
CV(%)***	3,2	2,9	3,7	3,5
Nível II*				
Média + DP	2,07 ± 0,14	2,00 ± 0,15	1,43 ± 0,06	2,11 ± 0,09
CV(%)	6,8	7,5	4,2	4,3

* Concentrações injetadas: nível I, 1µg/mL e nível II, 2µg/mL.

** Média e estimativa do desvio padrão de 5 injeções em duplicata.

*** CV: coeficiente de variação

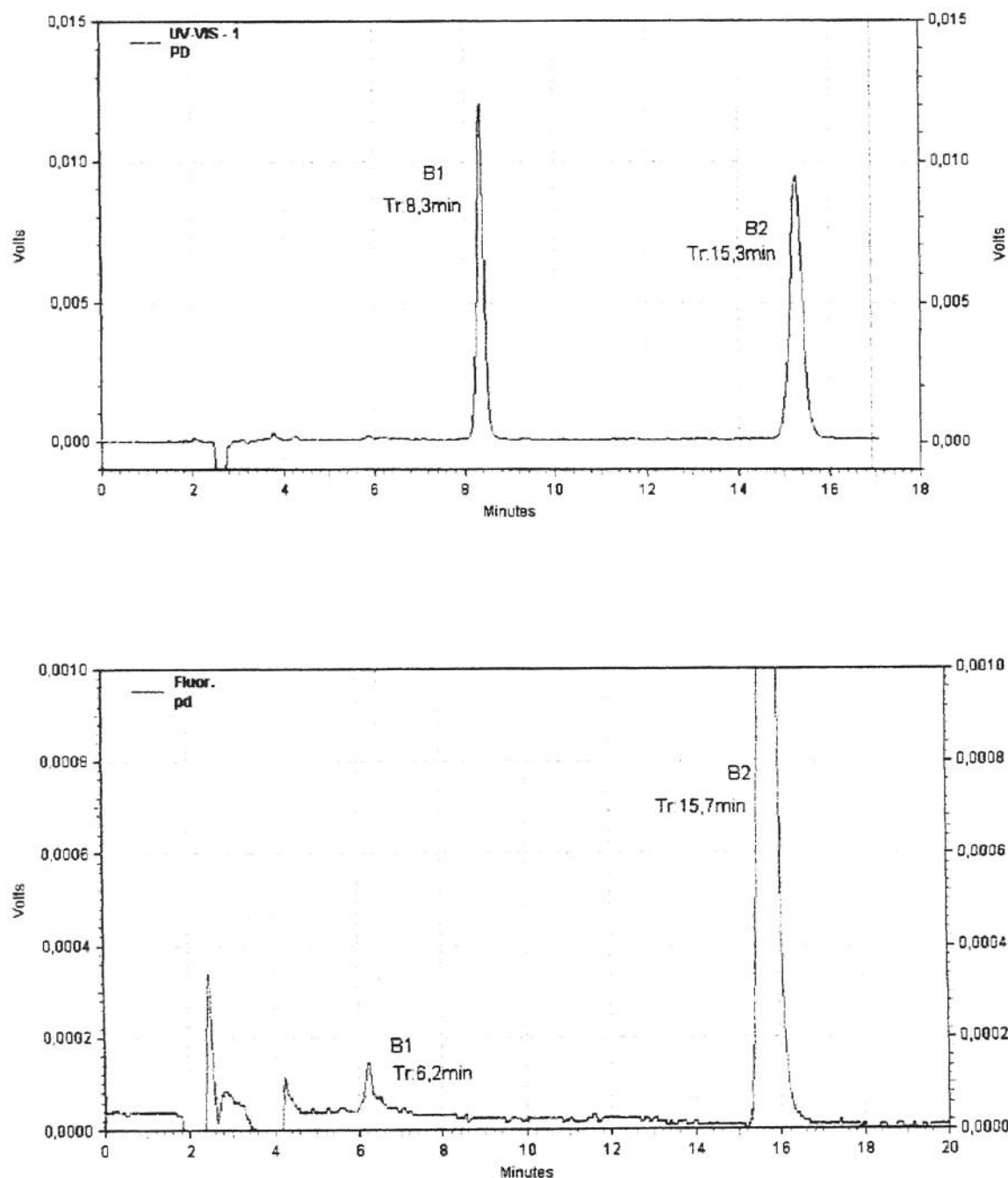


Figura 1: Cromatograma típico dos padrões de B₁ e B₂: (A) detector UV λ 254nm e (B) detector de fluorescência λ_{Ex} 370nm, λ_{Em} 508nm e 522nm B₁ e B₂, respectivamente. Condições cromatográficas descritas no texto, em 3.2.4.1.

Tabela 4: Repetibilidade das vitaminas Tiamina (B₁) e Riboflavina (B₂) na amostra de serralha (*Sonchus oleraceus* L.), detectado por fluorescência (λ_{Ex} 370nm).

Variáveis	Vitaminas ($\mu\text{g/mL}$)	
	B ₁ (λ_{Em} 508nm)	B ₂ (λ_{Em} 522nm)
Nível I*		
Média + DP**	27,3 $\pm$ 3,5	116,4 $\pm$ 6,7
CV(%)***	12,8	5,7
Nível II*		
Média + DP	99,2 $\pm$ 12,6	185,2 $\pm$ 11,6
CV(%)	12,7	6,2

* Concentrações injetadas: nível I, 1 $\mu\text{g/mL}$ e nível II, 2 $\mu\text{g/mL}$.

** Média e estimativa do desvio padrão de 8 injeções em duplicata.

*** CV: coeficiente de variação

Os padrões das vitaminas foram utilizados diariamente para identificação e quantificação das amostras. Desta forma, houve a necessidade de conhecer a estabilidade e o comportamento das vitaminas B₁ e B₂ durante o armazenamento sob temperatura de 4°C. O **Gráfico 1** demonstra que as soluções padrão (50 $\mu\text{g/mL}$), detectadas por fluorescência, se mantiveram estáveis por 30 dias. Cabe ressaltar que a tiamina foi diluída em solução de etanol a 20%, com pH 3,5, e a riboflavina em ácido acético 0,02N. O meio ácido favorece a estabilidade das vitaminas. Na amostra, as duas vitaminas analisadas permaneceram estáveis por 30 dias quando submetidas à estocagem na temperatura de 0°C. Observou-se pequenas alterações nas concentrações finais das vitaminas, quando comparado com os valores iniciais (**Gráfico 2**).

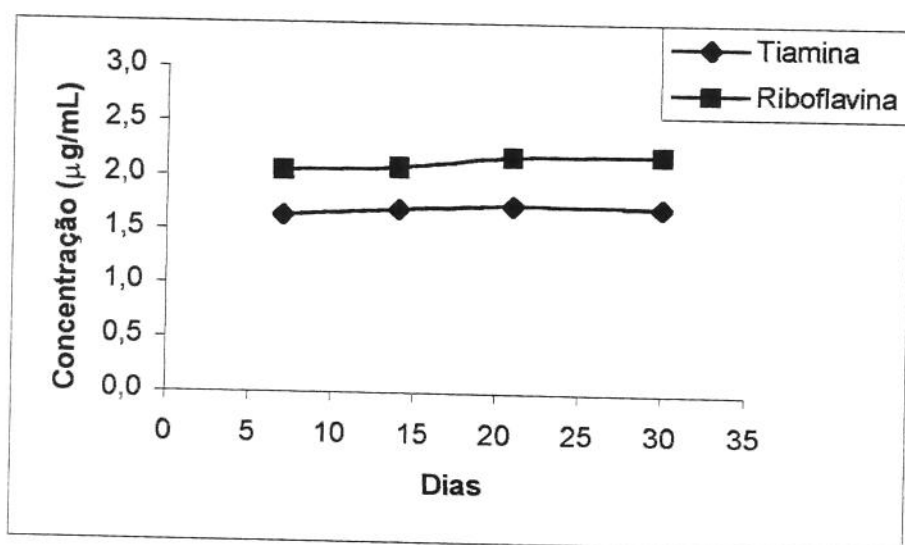


Gráfico 1: Estabilidade dos padrões Tiamina em etanol 20% (pH 3,5) e Riboflavina em ácido acético 0,02N.

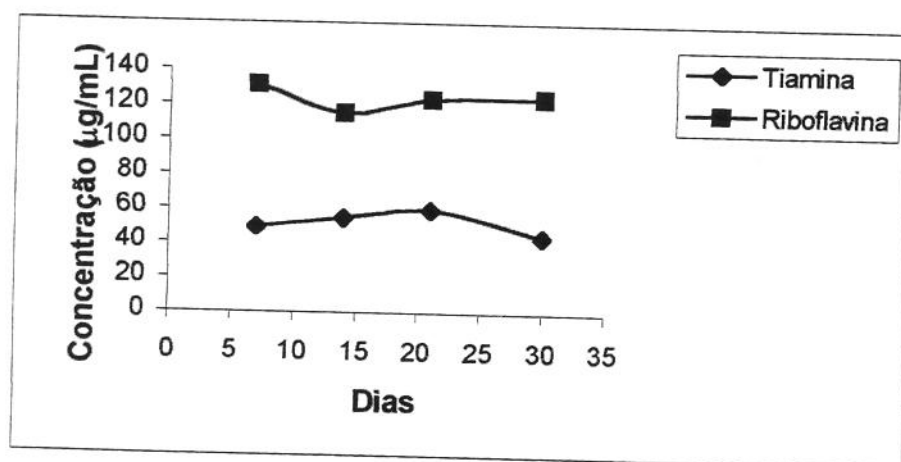


Gráfico 2: Estabilidade das vitaminas B₁ e B₂ na serralha (*Sonchus oleraceus* L.).

As taxas de recuperação das vitaminas B₁ e B₂ adicionadas a na serralha (*Sonchus oleraceus* L.), variaram entre 74,3% e 114%, para tiamina, e 102% e 147%, para riboflavina, nos nível I (1µg/mL) e nível II (2µg/mL), respectivamente (**Tabela 7**). Estes valores indicaram boa recuperação para níveis vitamínicos presentes no alimento *in natura*, com exceção da taxa de recuperação da B₂ com

147%, pois valores muito acima de 100% indicam ineficácia na etapa de limpeza. Na **Tabela 8** encontram-se as taxas de recuperação dos padrões que foram submetidos ao mesmo procedimento de extração e limpeza. A tiamina obteve recuperação entre 81,6% e 61,5% e a riboflavina entre 73,3% e 69%, níveis I e II, respectivamente. As taxas do nível II apresentaram-se muito próximas ao limite aceitável, o que indica perda do analito durante os procedimentos analíticos.

Tabela 7: Taxas de recuperação dos padrões de Tiamina (B_1) e Riboflavina (B_2) adicionados a serralha (*Sonchus oleraceus* L.), detectado por fluorescência (λ_{Ex} 370nm).

Níveis	B_1 (λ_{Em} 508nm)		B_2 (λ_{Em} 522nm)	
	Concentração ($\mu g/100g$)	Recuperação (%)	Concentração ($\mu g/100g$)	Recuperação (%)
I	26,7	74,3	129,2	102
II	70,0	114	224,2	147

* Concentrações adicionadas: nível I, 1 $\mu g/mL$ e nível II, 2 $\mu g/mL$.

Tabela 8: Taxas de recuperação dos padrões de Tiamina (B_1) e Riboflavina (B_2) submetidos ao procedimento de extração, detectado por fluorescência (λ_{Ex} 370nm).

Concentração (B_1 e $B_2 \mu g/mL$)	Recuperação (%)	
	B_1 (λ_{Em} 508nm)	B_2 (λ_{Em} 522nm)
0,06	81,6	73,3
2,0	61,5	69

3.4 CONCLUSÃO

Nas etapas de validação, os resultados obtidos foram satisfatórios para as duas vitaminas. Os parâmetros de limite de detecção e quantificação obtiveram valores em unidades μg e até ng , no detector de fluorescência. As taxas de repetibilidade obtiveram CV inferiores a 8% no UV e inferiores a 5% na fluorescência. Quanto à recuperação, os valores indicaram boa recuperação para níveis vitamínicos presentes nos alimentos *in natura*, com exceção da B_2 , com 147% no nível II de recuperação. Cabe lembrar, que valores de recuperação baixos podem indicar perda do composto de interesse durante os procedimentos analíticos, e recuperações muito acima de 100% podem indicar ineficácia na etapa de limpeza.

Os padrões das vitaminas obtiveram estabilidade durante o armazenamento sob temperatura de 4°C , por 30 dias. O mesmo ocorreu com a amostra, mesmo sob estocagem a 0°C . Estas vitaminas foram diluídas em solução de 20% etanol com pH 3,5 (tiamina) e ácido acético 0,02N (riboflavina); o meio ácido favoreceu a estabilidade.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Center for Drug Evaluation and Research (CDER), **Reviewer Guidance: Validation of chromatographic methods**, USA, 1994.
- CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S., Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11(1): 1-6, 1998.
- FINGLAS, P. M. e FAULKES, R. M. The HPLC analysis of thiamin and riboflavin in potatoes. **Food Chemistry**, v.15, 37-44, 1984.
- FINGLAS, P. M., Thiamin. **International Journal Vitamin Nutrition Research**, v.63 (4): 270-274, 1993.
- GODOY, H. T. Avanços em Análise de vitaminas. In: **Ciência de Alimentos - avanços e perspectivas**, Vol.II, Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp Campinas. p. 65-67, 2001.
- HIRAYAMA, S. e MARAYAMA, M. Determination of a small amount of niacin in foodstuffs by HPLC. **Journal Chromatography**, v. 588, 171-175, 1991.
- LAJOLO, F. M. e MENEZES, E. W. Uma análise retrospectiva e contextualização da questão. Palestra: XV Congresso da SBCTA, grupo de trabalho: Composição de alimentos, 4-7agosto de 1996, Poços de Caldas, MG. **Boletim da SBCTA**, 31(2): 90-92, 1997.
- LAJOLO, F. M. Grupo de trabalho: composição de alimentos. **Boletim da SBCTA**, v.29 (1): 57-69, 1995.

LYNCH, P. L. M. e YOUNG, I. S., Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. **881**: 267-284, 2000.

MacBRIDE, D. E. e WYATT, C. J. Evaluation of a modified AOAC determination for thiamin and riboflavin in foods. **Journal of Food Science**, v. **48**, 748-750, 1983.

MADRUGA, M. S. e CAMARA, F. S. The chemical composition of "Multimistura" as a food supplement. **Food Chemistry**, v. **68**: 41-44, 2000.

NUÑEZ, I. M. Prevención y lucha contra la anemia carencial mediante una alimentación alternativa. **Trabajo de investigación. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**. Universidad Nacional de Assuncion, 56p., 1996.

PRADO, M. A. e GODOY, H. T. Validation of the methodology to determination synthetic dyes in foods and beverages by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. **25** (6): 2455-2472, 2002.

RUSSELL, L. F. e VANDERSLICE, J. T. Comments on the standard fluorometric determination of riboflavin in foods and biological tissues. **Food Chemistry**, v. **43**: 79-82, 1992.

SIMS, A. e SHOEMAKER, D. Simultaneous liquid chromatographic determination of thiamine and riboflavin in selected foods, **Journal of AOAC International**, v. **76** (5): 1156-1160, 1993.

VALENTE SOARES, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Aldof Lutz**, v. **60** (1): 79-84, 2001.

CAPÍTULO 4

OTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS B₁ E B₂ EM VEGETAL FOLHOSO NÃO CONVENCIONAL POR MEIO DA ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.

Ramos, K. L.²; Souza, E. M. T.¹; Godoy, H. T.²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Celular

² Universidade Estadual de Campinas, Depto. Ciência de Alimentos

CAPÍTULO 4

OTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS B₁ E B₂ EM VEGETAL FOLHOSO NÃO CONVENCIONAL POR MEIO DA ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.

Ramos, K. L.²; Souza, E. M. T.¹; Godoy, H. T.²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Celular

² Universidade Estadual de Campinas, Depto. Ciência de Alimentos

RESUMO

Dentre as etapas analíticas utilizadas na determinação simultânea das vitaminas B₁ e B₂ em alimentos, a extração é a responsável pelos maiores erros nas determinações. Isto ocorre devido à extração incompleta, a não mensuração das possíveis formas ativas, à presença de interferentes e, ainda, à possível degradação durante a análise. Com base nestas observações, é de interesse científico investigar e otimizar novos métodos para análise de vitaminas em vegetais frescos. Para análise e otimização do processo utilizou-se a metodologia multivariada de superfície de resposta, que investigou as alterações nas concentrações da tiamina (B₁) e riboflavina (B₂) em serralha (*Sonchus oleraceus* L.), por meio do delineamento estatístico fatorial completo 2⁴. Foram avaliados quatro parâmetros: tempo de centrifugação (min); velocidade da centrifuga (rpm); peso da amostra (g); e tempo de maceração (min). O extrato vitamínico obtido da serralha (*Sonchus oleraceus* L.) foi submetido às etapas pré-estabelecidas de análise. Segundo os resultados obtidos pelo gráfico de superfície de resposta, a correlação entre as variáveis independentes peso de amostra X tempo de maceração encontram-se próximas da faixa teórica ótima, para as duas vitaminas.

ABSTRACT

Amongst the used analytical phases in the simultaneous determination of vitamins B₁ and B₂ in foods, the extraction phase is the responsible for the biggest errors in the determination. This occurs due to incomplete extraction, not quantifying the possible active forms, the presence of interferences and, still, the possible degradation during the analysis. Based on these observations, it is of scientific interest to investigate and optimize new methods for vitamin analysis in fresh vegetables. Response surface analysis was applied to analyze and optimize the process in order to investigate the variation in concentrations of thiamin (B₁) and riboflavin (B₂) in serralha (*Sonchus oleraceus* L.) according to statistic delineation complete factorial 2⁴. Four parameters were evaluated: centrifugation time (min); centrifugation rotation (rpm); sample weight (g) and maceration time (min). The obtained vitaminic extract of serralha (*Sonchus oleraceus* L.) was submitted to the pre-established steps of the analysis. According to the results obtained by the graph of reply surface, the correlation between the independent variables, weight of sample X maceration time is next to the optimum theoretical zone, for both vitamins.

4.1 INTRODUÇÃO

A utilização de alimentos alternativos, como suplemento alimentar, demonstra ser um veículo no combate à desnutrição em algumas regiões do Brasil. Os programas de combate à fome e à desnutrição utilizam produtos e subprodutos não convencionais, como farelos de cereais (arroz e trigo), pó da folha de mandioca (*Manihot esculenta*), sementes de girassol e abóbora, folhosos verde-escuros, como a beldroega (*Portulacca oleracea* L.), o caruru (*Amaranthus* sp), a serralha (*Sonchus oleraceus* L.), tanchagem (*Plantago tomentosa* Lom.) (LORENZI, 2000) e folhas de beterraba, rabanete e chuchu (BEAUSSET, 1992). Estes alimentos regionais contribuem na diversificação da dieta e oferecem novas fontes de nutrientes, pois se aproveita toda a parte comestível da planta.

A diversidade e potencialidade dos alimentos alternativos, como fonte de micronutrientes, ressaltam a importância do conhecimento científico para averiguar a real contribuição destes alimentos para a nutrição humana e, se possível, para classificá-los como substitutos de alimentos convencionais.

Alguns trabalhos interlaboratoriais propuseram-se a determinar, quantificar e avaliar parâmetros independentes da metodologia com a finalidade de isolar e identificar as vitaminas B₁ e B₂, por CLAE, em alimentos infantis, leveduras, cereais, leite em pó, farinha de trigo, vegetais liofilizados, entre outros (CHASE *et al*, 1992; CHASE *et al*, 1993a; STANCHER e ZONTA, 1986; WIMALASIRI e WILLS, 1985. Os trabalhos realizados por Van Der BERG *et al* (1996), ARELLA *et al* (1996), NDAW *et al* (2000) enfocaram extração e hidrólise enzimática, composição da fase móvel e tipos de colunas, com pré-derivação das vitaminas detectadas por fluorescência. Apenas SIMS e SHOEMAKER (1993) determinaram vitaminas B₁ e B₂ em brócolis. Até o presente momento, nenhum trabalho analisou a concentração dessas vitaminas hidrossolúveis utilizando uma metodologia multivariada de superfície de resposta.

Este estudo teve o objetivo de verificar as melhores condições de extração das vitaminas B₁ e B₂ e limpeza da amostra, na serralha, segundo o método desenvolvido nesta dissertação (**capítulos 2 e 3**). Para análise e otimização do processo, utilizou-se a metodologia multivariada de superfície de resposta, que relacionou os efeitos das variáveis independentes sobre a concentração das vitaminas.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 MATERIAIS

Utilizou-se apenas a serralha (*Sonchus oleraceus* L.), coletada no Núcleo Rural Alexandre Gusmão (Brazlândia/DF), para análise de superfície de resposta. As amostras foram trituradas em grau de porcelana utilizando nitrogênio líquido. O pó resultante foi guardado em frasco âmbar numa câmara fria a -70° C. O pó obtido era sempre homogeneizado antes de iniciar a análise das amostras. O extrato obtido da serralha, após extração enzimática, foi acondicionado em frasco âmbar a 0°C.

4.2.2 REAGENTES

Os padrões mononitrato de tiamina (vitamina B₁) e riboflavina (vitamina B₂) foram fornecidos pela Sigma Chemicals Co, USA. A tiamina foi eluída em etanol 20% em pH 3,5 e a riboflavina em ácido acético 0,02N. As soluções padrões das vitaminas foram armazenadas a temperatura de refrigeração. A enzima claradiastase eluída em acetato de sódio 2,5N e pH 4,5, foi fornecida pela Fluka, Suíça.

Os solventes orgânicos metanol e acetonitrila (grau cromatográfico) foram fornecidos pela Mallinckro, Brasil. O sal 1-ácido hexanossulfônico (99%) foi fornecido pela Vetec. Os demais reagentes utilizados são de grau de pureza analítico. Na preparação da fase móvel utilizou-se a água duplamente deionizada ou Milli-Q (MILLIPORE). Todos os componentes da fase móvel foram filtrados em membranas de 0,45µm de diâmetro e degaseificado com gás hélio.

4.2.3 EQUIPAMENTO

O equipamento de cromatografia líquida utilizado foi o SHIMADZU série LC-

10Avp, constituído por degaseificador de fase móvel, duas bombas LC-10ADvp, forno CTO-10ASvp contendo o injetor manual com alça de amostragem de 20 μ l, detectores UV-VIS SPD-10AVvp e de fluorescência RF-551, dispostos em série. A esse conjunto foi acoplado o controlador de sistema SCL-10Avp. A coluna cromatográfica utilizada foi a Shim-pack C₁₈ CLC(M) 25cm x 4,6mm; d.i. 5 μ m, marca SHIMADZU e coluna de guarda 10mm x 4,6mm Inertsil ODS 3.

4.2.4 MÉTODOS

4.2.4.1 METODOLOGIA ANALÍTICA

As amostras foram trituradas em gral de porcelana adicionando nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas à -70°C, desta forma, foi possível obter um pó homogêneo. Estas amostras foram submetidas, primeiramente, a extração ácida com HCl 0,1N e o pH ajustado para 4,5 (com NaOH 30%), este ajuste prepara a amostra para hidrólise enzimática (120mg de enzima/4h). A inativação enzimática foi realizada por diminuição do pH para 3,5 e, finalmente, as amostras foram centrifugadas e filtradas (membrana de 0,45 μ m). O peso da amostra, tempo de maceração, velocidade e tempo de centrifugação foram os parâmetros utilizados no delineamento estatístico fatorial completo 2⁴. Os extratos foram filtrados em membranas de 0,45 μ m (MILLIPORE-HAWP 01300) e injetados no cromatógrafo.

O sistema isocrático de eluição foi composto por 22% MEOH, 2,5% ACN e 75,5% de fase aquosa (5mM AHS e 0,15% TEA, pH 2,8). A vazão de 1,2mL/min garantiu a eluição das vitaminas em uma corrida de 20 minutos. A detecção simultânea das vitaminas foi realizada por fluorescência, λ_{Ex} 370nm, λ_{Em} 508nm e 522nm, para B₁ e B₂, respectivamente, por meio do processo oxidativo (ferricianeto de potássio 1%). Para identificação, utilizou-se a comparação dos tempos de retenção obtidos com os padrões nas mesmas condições e por co-cromatografia. A quantificação realizou-se por curvas de padronização externa.

4.2.5 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Para elaboração do delineamento estatístico observaram-se os fatores que mais interferiram na etapa de extração das vitaminas e na limpeza da amostra. Os parâmetros considerados foram a velocidade e tempo de centrifugação (referente à limpeza da amostra), tempo de maceração e peso da amostra (referente à extração), com o objetivo de analisar o comportamento das vitaminas B₁ e B₂ na serralha (*Sonchus oleraceus* L.).

O delineamento estatístico utilizado foi o fatorial completo 2⁴ (**Tabela 1**). Para avaliação da estimativa do erro experimental realizaram-se 3 repetições dos pontos centrais. Utilizaram-se 8 pontos axiais adicionados ao planejamento no centro do experimento completo para medir a possibilidade da não-linearidade nos valores de concentração de B₁ e B₂ relacionados às quatro variáveis (BOX, et al, 1978). Os dados obtidos foram analisados no programa Statistica versão 5.0.

Na **Tabela 2** encontram-se os valores Y, ou da variável dependente, que corresponde à concentração de vitaminas B₁ e B₂ na serralha (*Sonchus oleraceus* L.). As primeiras 16 linhas determinam o modelo linear e são referentes ao experimento completo 24. As linhas 17 a 19 correspondem aos pontos centrais, enquanto os experimentos 20 a 27 correspondem aos pontos axiais. O modelo experimental, com valores reais e codificados, encontra-se na **Tabela 2**.

Tabela 1: Variáveis independentes preestabelecidas [nível superior (+), nível inferior(-), intermediário (0) e pontos axiais (α)].

Variáveis	α (-)	(-)	(0)	(+)	α (+)
Tempo de centrifuga (min)	16	18	20	22	24
Velocidade da centrifuga (rpm)	9000	11000	13000	15000	17000
Peso da amostra (g)	3	5	7	9	11
Tempo de maceração (min)	1	2	3	4	5

Tabela 2: Modelo experimental com valores reais e codificados.

Valores experimentais										
Ensaio	Real				Codificado				Y (µg/100g)	
	Tc**	Vc**	Ps**	Tm**	X1	X2	X3	X4	Fluorescência	
	(min)	(rpm)	(g)	(min)					B ₁ *	B ₂ *
1	18	11000	6	2	-	-	-	-	36,83	140,33
2	22	11000	6	2	+	-	-	-	50,33	157,83
3	18	15000	6	2	-	+	-	-	69,67	133,67
4	22	15000	6	2	+	+	-	-	60,83	134,50
5	18	11000	8	2	-	-	+	-	46,25	85,13
6	22	11000	8	2	+	-	+	-	59,13	115,00
7	18	15000	8	2	-	+	+	-	33,25	80,00
8	22	15000	8	2	+	+	+	-	35,13	77,13
9	18	11000	6	4	-	-	-	+	61,83	151,33
10	22	11000	6	4	+	-	-	+	60,17	144,50
11	18	15000	6	4	-	+	-	+	35,33	154,83
12	22	15000	6	4	+	+	-	+	30,17	119,17
13	18	11000	8	4	-	-	+	+	28,38	113,38
14	22	11000	8	4	+	-	+	+	60,50	123,25
15	18	15000	8	4	-	+	+	+	35,75	107,13
16	22	15000	8	4	+	+	+	+	44,63	106,38
17	20	13000	7	3	0	0	0	0	43,43	127,43
18	20	13000	7	3	0	0	0	0	37,64	121,86
19	20	13000	7	3	0	0	0	0	47,86	131,43
20	16	13000	7	3	-2	0	0	0	45,57	116,86
21	24	13000	7	3	+2	0	0	0	48,14	121,14
22	20	9000	7	3	0	-2	0	0	51,29	152,00
23	20	17000	7	3	0	+2	0	0	67,71	122,86
24	20	13000	5	3	0	0	-2	0	82,8	141,4
25	20	13000	9	3	0	0	+2	0	34,00	89,33
26	20	13000	7	1	0	0	0	-2	39,14	78,71
27	20	13000	7	5	0	0	0	+2	28,00	125,86

* λ_{Ex} 370nm; λ_{Em} 508nm; λ_{Em} 522nm B₁ e B₂, respectivamente.

**Tc: Tempo de centrifuga, Vc: Velocidade da centrifuga, Ps: Peso da amostra e Tm: Tempo de maceração.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas pelo delineamento experimental demonstraram que, dentre as variáveis independentes investigadas, somente o peso da amostra mostrou-se estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança, para as duas vitaminas (Tabela 3). Sua influência na extração para obtenção da B₁ apresenta efeito negativo, ou seja, amostras com peso acima de 6g respondem de forma insatisfatória ao processo de extração, o que resulta em teores subestimados dessa vitamina.

O coeficiente de correlação (r) representa a relação entre as respostas observadas e os valores previstos pelo modelo matemático. Este valor, quanto mais próximo de 1 ou 100%, mais preditivo é o modelo (NETO *et al*, 1995). Desta forma, a vitamina B₁, com $r = 0,62946$, indica que o modelo explica apenas 62,94% da variação dos dados observados. O baixo valor de r pode ser explicado pela etapa de derivação da B₁ (fluorescente). Isso ocorre devido à presença de compostos (matriz alimentícia) que causam supressão, ou seja, diminuem a intensidade da fluorescência da amostra. Outro fator importante a ser considerado é o volume de HCl 0,1N utilizado no processo de maceração. Este atuou de forma insuficiente nos ensaios com peso acima de 6g, devido à desintegração parcial da matriz, o que reflete diretamente na ação da enzima claradiastase.

Ao verificar os efeitos das variáveis sobre a B₂, observou-se que a velocidade da centrífuga, o peso da amostra, o tempo de maceração e a interação peso da amostra X tempo de maceração, mostraram-se estatisticamente significativas ao nível de 95% de confiança (Tabela 3).

As variáveis peso de amostra, velocidade de centrífuga e tempo de maceração (Q) apresentaram efeito negativo. A primeira variável influencia a vitamina B₂ da mesma forma que a B₁. Quanto às demais, quanto maior a velocidade da centrífuga e o tempo de maceração (Q), menor será o teor de B₂. A variável tempo de maceração (L) e a interação peso de amostra X tempo de maceração obtiveram efeito positivo, ou seja, quanto maior o valor destas variáveis maior será o teor encontrado para B₂. A interação entre tempo e velocidade de centrífuga apresentou efeito negativo, não contribuindo satisfatoriamente na obtenção desta vitamina.

A vitamina B₂ apresentou $r = 0,95728$; isto indica que o modelo explica 95,7% da variação dos dados observados. O valor próximo a 1,0 deve-se à fluorescência natural da B₂, a qual é pouco afetada pela reação de oxidação por ferricianeto de potássio 1%, o mesmo utilizado para derivação da B₁.

Tabela 3: Estimativa dos efeitos, erro puro e significância dos efeitos (p) e t de Student.

Fator	*Estimativa dos efeitos							
	Estimativa dos efeitos		Erro puro		t (2)		p	
	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂
Média	42,3833	126,9067	3,503409	4,633961	12,09774	27,3862	0,006763	0,000000
Tc (L)	5,7283	1,6700	2,477285	3,276705	2,31234	0,5097	0,146901	0,619534
Tc(Q)	1,5042	-2,9592	2,627557	3,475471	0,57246	-0,8514	0,624786	0,411193
Vc (L)	-2,9850	-14,7250	2,477285	3,276705	-1,20495	-4,4938	0,351456	0,000734
Vc (Q)	7,8267	6,2558	2,627557	3,475471	2,97869	1,8000	0,096645	0,097033
Ps (L)	-14,1450	-36,0350	2,477285	3,276705	-5,70988	-10,9973	0,029330	0,000000
Ps (Q)	7,2767	-4,7767	2,627557	3,475471	2,76937	-1,3744	0,109404	0,194443
Tm (L)	-5,5783	15,9300	2,477285	3,276705	-2,25179	4,8616	0,153160	0,000390
Tm (Q)	-5,1383	-11,3167	2,627557	3,475471	-1,95556	-3,2562	0,189688	0,006878
Tc X Vc(L)**	-8,7600	-11,0475	3,034042	4,013128	-2,88724	-2,7528	0,101944	0,017510
Tc X Ps(L)**	5,9900	7,4750	3,034042	4,013128	1,97426	1,8626	0,187051	0,087166
Tc X Tm(L)**	0,5950	-9,8975	3,034042	4,013128	0,19611	-2,4663	0,862645	0,029695
Vc X Ps(L)**	-2,7925	-1,8475	3,034042	4,013128	-0,92039	-0,4604	0,454532	0,653485
Vc X Tm(L)**	-7,6675	3,4450	3,034042	4,013128	-2,52716	0,8584	0,127348	0,407474
Ps X Tm(L)**	4,4575	11,2325	3,034042	4,013128	1,46916	2,7989	0,279549	0,016076

*Confiança de 95%, t de Student; p-significância

**Tc: Tempo de centrifuga, Vc: Velocidade da centrifuga, Ps: Peso da amostra e Tm: Tempo de maceração.

Na análise de variância (ANOVA) (**Tabela 4**) encontra-se a validade do modelo pelo teste F e o resíduo, os quais mostram a extensão do erro experimental. Esta análise realizou-se apenas com a variável 6 (concentração de B₂), pois na análise da rusticidade, esta vitamina sofreu influência de todas as variáveis independentes, como

demonstra o gráfico de Pareto (**Figura 1**). Quanto à vitamina B₁, apenas a variável peso da amostra mostrou significância ao nível de 95% de confiança. Isto demonstra que o método é rústico para extração da B₁, segundo as variáveis independentes analisadas (**Figura 1**).

Baseado na ANOVA, o valor do F tabelado ($F_{(6,20)} = 2,60$) foi menor que o F calculado (20,41), o que demonstra a validade do modelo experimental. Quanto ao resíduo, o valor obtido de 2028,41 foi muito abaixo do da regressão, o que demonstra um pequeno erro experimental (46,20) e indica reprodutibilidade nas análises.

Tabela 4: Análise de variância para desenvolvimento experimental (ANOVA).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F. calculado	F tabelado
Regressão	12417,24	6	2069,54	20,41	2,60
Resíduo	2028,41	20	101,42		
Falta de ajuste	1982,21	18	110,12		
Erro puro	46,20	2	23,10		
Total	14445,65	26			

• Limite de confiança de 95%.

A **Equação 1** representa o modelo experimental da extração da riboflavina em função das variáveis analisadas.

$$Z = 344,549333333333 - 34,86625 \cdot x + 1,71325000000007 \cdot y - 5,51033333333333 \cdot y^2 + 5,61624999999999 \cdot x \cdot y - 47,85625$$

Equação 1

Gráfico de Pareto (Tiamina - B₁)

4 fatores, 1 bloco, 27 ensaios, erro puro = 36,82163

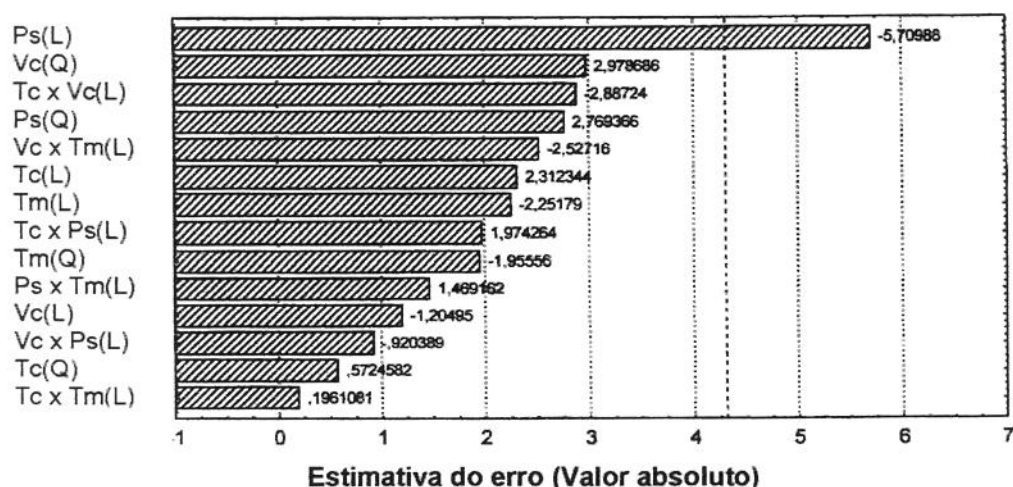


Gráfico de Pareto (Riboflavina - B₂)

4 fatores, 1 bloco, 27 ensaios, erro puro = 64,442078

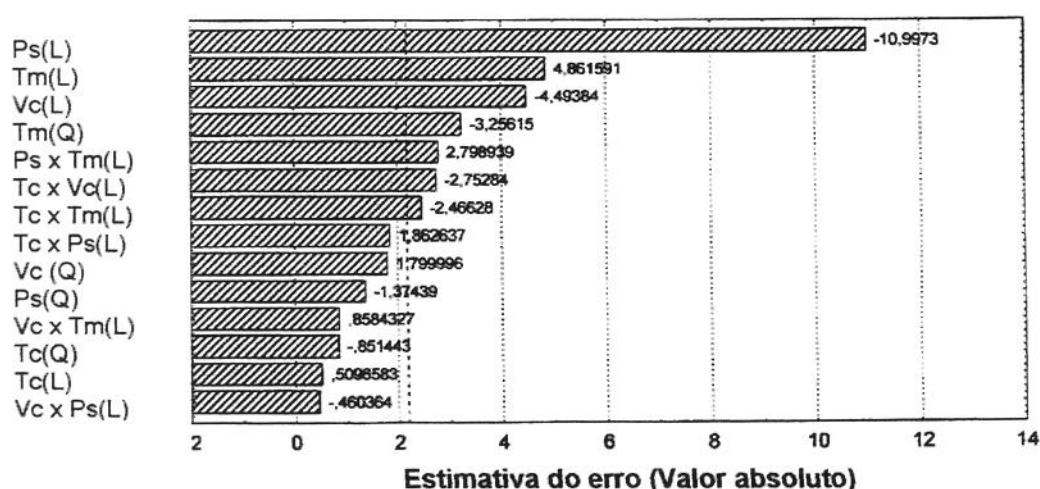


Figura 1: Representação gráfica da significância do modelo para determinação de Tiamina (B₁) e Riboflavina (B₂) em serralha (*Sonchus oleraceus* L.).*Tc: Tempo de centrifuga, Vc: Velocidade da centrifuga, Ps: Peso da amostra e Tm: Tempo de maceração.

As variáveis independentes peso da amostra e tempo de maceração foram as que se destacaram na extração das duas vitaminas e foram utilizadas na obtenção do gráfico de superfície de resposta. Na **Figura 2**, observa-se que as faixas ótimas de extração das vitaminas B₁ e B₂ estão próximas do ideal. Cabe ressaltar que a quantificação simultânea das vitaminas, a partir do mesmo extrato, só foi possível devido às condições idênticas na etapa da extração, ou seja, 5g de amostra para 3min de maceração. Este ponto ótimo de extração das vitaminas foi utilizado para quantificação dos lotes das diferentes amostras analisadas (**Capítulo 5**).

4.4 CONCLUSÃO

A análise da superfície de resposta relacionou os efeitos das variáveis independentes sobre a concentração das vitaminas. Constatou-se que, dentro das faixas estabelecidas de trabalho, as variáveis determinantes da extração foram peso da amostra e tempo de maceração. Pode-se observar que somente o peso da amostra mostrou-se significativo ao nível de 95% de confiança. Esta variável tem efeito negativo para as duas vitaminas.

A **Figura 2** mostra que as faixas ótimas de extração das vitaminas estão próximas do ideal. A quantificação simultânea das vitaminas, a partir do mesmo extrato, só foi possível devido às condições idênticas obtidas na etapa de extração, ou seja, 5g de amostra para 3min de maceração.

Observou-se que todas as variáveis preestabelecidas, utilizadas para averiguar as melhores condições de extração das vitaminas, foram significativas para obtenção da B₂. O mesmo não ocorreu para B₁, o que demonstra ser um método rústico para esta vitamina.

O delineamento estatístico utilizado determinou a melhor faixa de trabalho para extração das vitaminas, porém sugere-se elaboração de outros planejamentos experimentais que estudem melhor as variáveis independentes de tempo e velocidade de centrifugação para melhorar a etapa de clarificação.

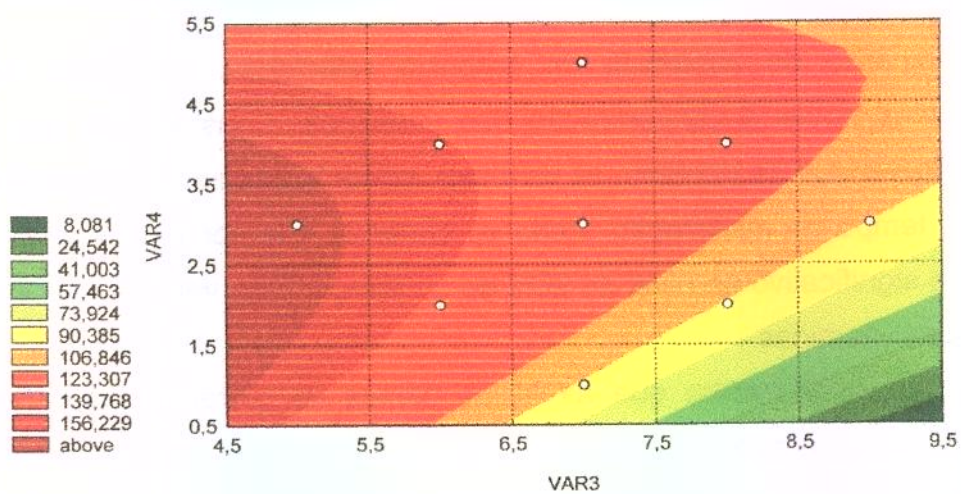
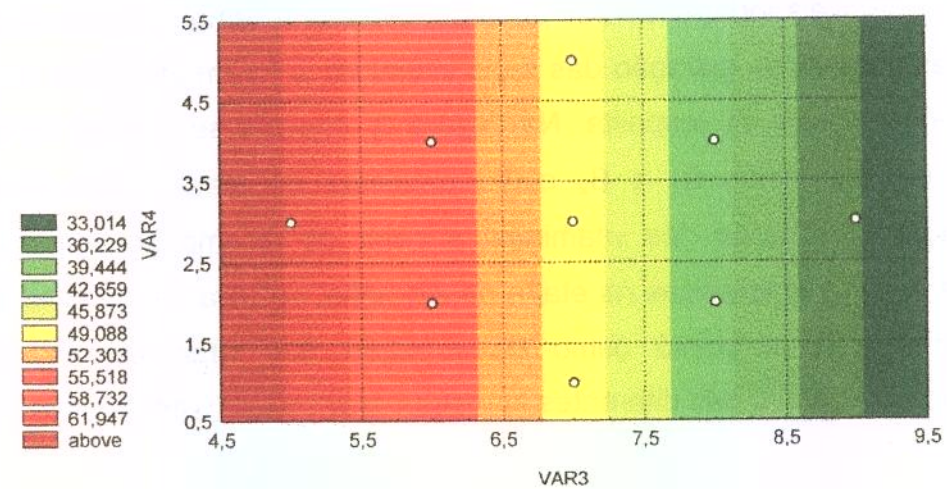


Figura 2: Faixas de trabalho para extração de B₁ (A) e B₂ (B) na serralha (*Sonchus oleraceus* L.).
 * Var 4 (Peso da amostra) e Var 3 (Tempo de maceração).

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARELLA, F.; LAHÉLY, S.; BOURGUIGNON, J. B.; HASSELMANN, C. Liquid chromatographic determination of vitamins B₁ and B₂ in foods. A collaborative study. **Food Chemistry**, v. **56** (1): 81-86, 1996.
- BEAUSSET, I. Estudio de las bases científicas para el uso de alimentos alternativos en la nutrición humana; **INAN/UNICEF**, 1992.
- BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. **Statistic for experimenters**. In introduction to design, data analysis and model building. Nova York, Wiley, 1978.
- CHASE, Jr. G. W.; LANDEN, Jr. W. O.; EITENMILLER, R. R.; SOLIMAN, A.G. Liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in infant formula. **Journal of AOAC International**, v. **75** (3): 561-565, 1992.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O.; SOLIMAN, A. G. Method modification for liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and pyridoxine in medical foods. **Journal of AOAC International**, v. **75** (3), 561-565, 1993a.
- LORENZI, H. **Manual de identificação e de controle de plantas daninhas**. 5ª edição, 2000.
- NETO, B. B., SACRMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Ed. Unicamp, 1995.
- NDRAW, S.; BERGAENTZLÉ, M.; AOUDE-WERNER, D.; HASSELMANN, C. Extraction procedures for the liquid chromatography determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. **Food Chemistry**, v. **71**: 129-138, 2000.

SIMS, A. e SHOEMAKER, D. Simultaneous liquid chromatographic determination of thiamine and riboflavin in selected foods. **Journal of AOAC International**, v 76 (5): 1156-1160, 1993.

STANCHER, B. e ZONTA, F. High performance liquid chromatography analysis of riboflavin (vitamin B₂) with visible absorbance detection in Italian cheeses. **Journal Food Science**, v. 51 (3), 857-858, 1986.

Van Den BERG, 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 (1): 101-108, 1996.

WIMALASIRI, P. e WILLS, R. B. H. Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.318: 412-416, 1985.

CAPÍTULO 5

DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS B₁ E B₂ EM VEGETAIS FOLHOSOS NÃO CONVENCIONAIS POR CLAE.

Ramos, K. L.²; Souza, E. M. T.¹; Godoy, H. T.²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Celular

² Universidade Estadual de Campinas, Depto. Ciência de Alimentos

CAPÍTULO 5

DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS B₁ E B₂ EM VEGETAIS FOLHOSOS NÃO CONVENCIONAIS POR CLAE.

Ramos, K. L.²; Souza, E. M. T.¹ e Godoy, H. T.²

¹ Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Celular

² Universidade Estadual de Campinas, Depto. Ciência de Alimentos

RESUMO

Considerando que os alimentos não convencionais são de baixo custo e alto valor nutricional, julgou-se imprescindível o conhecimento da composição, principalmente vitamínica, desses alimentos. Neste trabalho foram avaliados os teores de tiamina e riboflavina de folhosos não convencionais como a beldroega (*Portulacca oleracea* L.), caruru (*Amaranthus* sp), serralha (*Sonchus oleraceus* L.), tanchagem (*Plantago tomentosa* Lom.) e pó da folha de mandioca (*Manihot esculenta*) comparando os níveis desses nutrientes com os da couve manteiga (*Brassica oleracea*). A metodologia empregada para determinação simultânea das vitaminas B₁ e B₂, por CLAE, utilizou a extração ácida seguida de hidrólise enzimática. A separação cromatográfica foi realizada em coluna C₁₈ com fase móvel composta por 22% MEOH, 2,5% ACN e 75,5% de fase aquosa (5mM ASH e 0,15% TEA, pH 2,8). O vazão de 1,2mL/min garantiu a eluição das vitaminas em uma corrida de 20 minutos. A detecção simultânea foi realizada em detector de fluorescência. Os teores de B₁ para serralha, caruru e tanchagem apresentaram-se próximos aos da couve manteiga (*Brassica oleracea*). O mesmo não ocorreu com a beldroega, que apresentou teores mais elevados. Quanto aos teores de B₂, somente a serralha obteve valores próximos à couve manteiga. O caruru apresentou valores expressivos, enquanto a beldroega e a tanchagem obtiveram teores inferiores a couve manteiga. No pó da folha de mandioca os teores de

vitaminas encontram-se elevados, cerca de 7,5 vezes mais conteúdo de B₁ e 5,0 vezes mais conteúdo de B₂, quando comparada com a couve manteiga.

ABSTRACT

Considering that the unconventional foods are of low cost and high nutritional value, it become essential to know the composition, specially of vitamins, of these foods. In this work, the levels of thiamin and riboflavin of green vegetables unconventional as beldroega (*Portulacca oleracea* L.), caruru (*Amaranthus* sp), serralha (*Sonchus oleraceus* L.), tanchagem (*Plantago tomentosa* Lom.) and cassava leaf powder (*Manihot esculenta*) were evaluated comparing these levels to the ones of kale. The methodology used for simultaneous determination of vitamins B₁ and B₂ by HPLC, applied acid extraction followed by enzymatic hydrolysis. In the chromatographic process, a C₁₈ column and isocratic elution were used, with a mobile phase of 22% methanol, 2.5% acetronitrile and 75.5% of aqueous phase (5mM hexanosulfonic acid and 0.15% triethylamine, pH 2.8). The flow rate of 1.2mL/min guaranteed the vitamins elution in 20 minutes. The simultaneous detection was carried out in a fluorescence detector. The levels of B₁ for serralha, caruru and tanchagem showed to be close to kale (*Brassica oleracea*). The same didn't occur for beldroega that showed higher levels. As for the B₂ levels, only serralha presented values close to kale. Caruru presented good values while beldroega and tanchagem obtained values lower than kale. In cassava leaf powder the vitamins levels are about 7.5 times higher for B₁ and 5.0 times for B₂ when compared to kale.

5.1 INTRODUÇÃO

A desnutrição infantil nos países em desenvolvimento está associada à dieta inadequada e infecções. O combate ao quadro de desnutrição incentivou a adoção de programas de intervenção alimentar ou nutricional, direcionados à

população de baixa renda, visando recuperar crianças desnutridas por meio da introdução de alimentos alternativos ou não convencionais.

A ingestão de vitaminas está relacionada, proporcionalmente, ao consumo calórico. Desta forma, acredita-se que a deficiência de tiamina advém da diminuição do consumo de pão, farinhas e outras fontes de B₁ (ANDERSON *et al*; 1986). Algumas variáveis, como fatores psicológicos e estilo de vida, também influenciam na relação entre a ingestão vitamínica e níveis séricos (BENTON *et al*, 1997).

A avaliação do conteúdo químico da dieta é crítica para a interpretação da relação entre nutrição e saúde. Ao considerarmos a diversidade e potencialidade dos alimentos alternativos no Brasil, como fonte de micronutrientes, sua disponibilidade e acessibilidade tornam imprescindível o conhecimento da composição desses alimentos como informativo relatado em tabelas de composição, tanto para os profissionais (nutricionistas, nutrólogos, dietistas), quanto para os programas não governamentais extensamente difundidos no combate à desnutrição, em especial a composição dos nutrientes no produto cru.

MERCADANTE e AMAYA, 1990 e PENTEADO *et al*, 1986 analisaram a composição e o teor dos carotenóides (α -caroteno, β -caroteno e outros pró-vitamina A) em vegetais nativos do Brasil, como beldroega (*Portulaca oleracea*), serralha (*Sonchus oleranceus*), caruru (*Amarantus viridis*) e folha de mandioca (*Manihot esculenta*), e concluíram que estes folhosos são fontes de pró-vitamina A. Posteriormente, LIU *et al*, (2000) chegou à mesma conclusão quando analisou o teor de β -caroteno na beldroega.

No entanto, até o presente momento, não há publicações que relatem a determinação das vitaminas hidrossolúveis B₁ e B₂ nestes alimentos, nem tampouco a avaliação da equivalência dos teores de B₁ e B₂ entre os alimentos não convencionais e a couve manteiga (*Brassica oleracea*), alimento considerado convencional, utilizado como parâmetro de comparação.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 MATERIAIS

As amostras dos alimentos não convencionais, os folhosos verde-escuros como beldroega - *Portulacca oleracea* L, caruru - *Amaranthus* sp, serralha - *Sonchus oleraceus* L, tanchagem - *Plantago tomentosa* Lom. e couve manteiga - *Brassica oleracea* foram coletadas no Núcleo Rural Alexandre Gusmão, em Brazlândia, DF. O pó da folha de mandioca (*Manihot esculenta*) foi fornecido pela Creche Comunitária da Ceilândia (DF). Este pó foi obtido por secagem natural à sombra. No prazo de 3 a 7 dias a secagem é considerada completa. As folhas foram trituradas e armazenadas (-20°C) em sacos plásticos e identificadas como complemento alimentar.

A couve, fonte de vitaminas do complexo B e alimento convencional, foi adotada como referência na análise dos teores de B₁ e B₂ nos diferentes folhosos.

5.2.2 REAGENTES

Os padrões mononitrato de tiamina (vitamina B₁) e riboflavina (vitamina B₂) foram fornecidos pela Sigma Chemicals Co, USA. A tiamina foi eluída em etanol 20% em pH 3,5 e a riboflavina em ácido acético 0,02N. As soluções padrões das vitaminas foram armazenadas a temperatura de refrigeração. A enzima claradiastase eluída em acetato de sódio 2,5N e pH 4,5, foi fornecida pela Fluka, Suíça. Os solventes orgânicos metanol e acetonitrila (grau cromatográfico) foram fornecidos pela Mallinckro, Brasil. O sal 1-ácido hexanossulfônico (99%) foi fornecido pela Vetec. Os demais reagentes utilizados foram de grau de pureza analítico. Na preparação da fase móvel utilizou-se a água duplamente deionizada ou Milli-Q (MILLIPORE). Todos os componentes da fase móvel foram filtrados em membranas de 0,45µm de diâmetro e degaseificado com gás hélio.

5.2.3 EQUIPAMENTO

O equipamento de cromatografia líquida utilizado foi SHIMADZU, série LC-10Avp, constituído por degaseificador de fase móvel, duas bombas LC-10ADvp, forno CTO-10Asvp, contendo o injetor manual com alça de amostragem de 20µl, detectores UV-VIS SPD-10AVvp e de fluorescência RF-551, dispostos em série. A esse conjunto foi acoplado o controlador de sistema SCL-10Avp. A coluna cromatográfica utilizada foi a Shim-pack C₁₈ CLC(M), 5 µm, 25cm x 4,6mm, d.i. 5µm marca SHIMADZU e coluna de guarda, 10mm x 4,6mm, Inertsil ODS 3.

5.2.4 MÉTODOS

5.2.4.1 METODOLOGIA ANALÍTICA

Para extração das vitaminas B₁ e B₂ em folhosos não convencionais, utilizaram-se 5g das diferentes amostras. Estas foram quantificadas em quatro lotes em duplicata. As amostras foram trituradas em gral de porcelana adicionando nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas à -70°C, desta forma, foi possível obter um pó homogêneo. As amostras foram submetidas, primeiramente, a extração ácida com HCl 0,1N e o pH foi ajustado para 4,5 (com NaOH 30%), para que ocorresse a incubação enzimática (120mg de enzima/4h). A inativação enzimática foi realizada por diminuição do pH para 3,5. Na etapa da limpeza, a centrifugação foi a 13000rpm por 20min. Os extratos foram filtrados em membranas de 0,45µm (MILLIPORE- HAWP 01300) e injetados no cromatógrafo.

O sistema isocrático de eluição apresentou 22% MEOH, 2,5% ACN e 75,5% de fase aquoso (5mM e 0,15% TEA, pH2,8). A vazão de 1,2mL/min garantiu a eluição das vitaminas em uma corrida de 20 minutos. A detecção simultânea das vitaminas foi realizada por fluorescência, λ_{Ex} 370nm, λ_{Em} 508nm e 522nm, para B₁ e B₂, respectivamente, por meio do processo oxidativo

(ferricianeto de potássio 1%). Para identificação, utilizou-se a comparação dos tempos de retenção obtidos com os padrões nas mesmas condições e por cromatografia. A quantificação realizou-se por padronização externa (**Anexos 3 e 4**). As curvas apresentaram boa linearidade $r^2 = 0,9997$, construídas com oito níveis de concentração 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ;2,0; 3,0; 4,0 μ g/mL, sendo cada ponto média de três determinações.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Tabela 1** encontram-se os teores das vitaminas B₁ e B₂ em folhosos não convencionais e na couve manteiga (*Brassica oleracea*), alimento considerado convencional. Pode-se observar que os teores de B₁, para as diferentes amostras, foram muito próximos; porém, apresentaram coeficientes de variação bem diversificados. Quanto aos teores de B₂, estes se apresentaram com larga faixa de variação, tanto para as médias como para coeficientes de variação.

Para avaliar a equivalência ou não dos teores de B₁ e B₂ entre os alimentos não convencionais e a couve manteiga foi realizada a análise de variância. Ao aplicar o teste observou-se que a serralha (*Sonchus oleraceus*), o caruru (*Amaranthus sp.*) e a tanchagem (*Plantago tomentosa Lom.*) apresentaram $p > 0,05$, para teores de B₁. Esta observação sugere a equivalência entre os folhosos não convencionais e a couve manteiga, para teores desta vitamina. O mesmo não ocorreu com a beldroega (*Portulacca oleracea L*), que apresentou o conteúdo desta vitamina muito superior ao da couve manteiga.

Ao avaliar os teores da vitamina B₂, nos mesmos folhosos, observou-se que apenas a serralha obteve $p > 0,05$, enquanto ao outros folhosos apresentaram valores de $p=0,027$, $p=0,0003$ e $p=0,00002$, respectivamente para caruru, tanchagem e beldroega. A partir desta análise, observou-se que apenas a serralha apresentou equivalência com a couve manteiga, para vitamina B₂. Cabe ressaltar que o caruru apresentou teor de riboflavina superior à couve manteiga, enquanto os outros folhosos, beldroega e tanchagem, apresentaram teores inferiores.

O método desenvolvido e validado para determinação simultânea das vitaminas B₁ e B₂ utilizou, como referência, um folhoso não convencional, a serralha. As etapas de extração e limpeza são determinantes na obtenção das vitaminas. Partindo desta observação, realizou-se análise de superfície de resposta para obter o ponto ótimo de extração destes analitos (**capítulo 4**). Esta análise comprovou que o ótimo foi alcançado para as duas vitaminas. O mesmo pode ser verificado pelos valores dos coeficientes de variação obtidos na serralha. Porém, valores de B₁ e B₂ encontrados nos outros folhosos, não respondem tão bem à metodologia como a serralha, o que foi demonstrado pelas largas faixas dos coeficientes de variação. Observou-se que, para obter desvio padrão e CV adequados, será necessário verificar o ponto ótimo de extração das vitaminas para cada material folhoso estudado, por meio de análise de superfície de resposta. Só assim será possível averiguar se a variação dos coeficientes está relacionada à metodologia ou à diversidade da matriz alimentícia.

Outros estudos realizados por SIMS e SHOEMAKER (1993) e GARCIA *et al* (1993) determinaram os teores de vitaminas B₁ e B₂ em folhosos por CLAE, com detector de fluorescência, adotando a metodologia da AOAC (métodos adaptados 957.17 B₁ e 970.65 B₂). O primeiro trabalho determinou, no brócolis, teores de 40µg/100g e 50µg/100g de B₁ e B₂, respectivamente. O segundo determinou, no repolho e na alface, teores de 11µg/100g e 26µg/100g de B₁, e 175µg/100g e 237µg/100g de B₂, respectivamente. Cabe ressaltar que a metodologia utilizada na determinação destas vitaminas foi a mesma para repolho e alface.

A **Tabela 2** apresenta os teores de B₁ e B₂ no pó da folha de mandioca. Esta amostra possui elevado teor de vitaminas, cerca de 7,5 vezes mais conteúdo de B₁ e 5,0 vezes mais conteúdo de B₂, quando comparada com a couve manteiga. Esta relação ocorre devido ao baixo conteúdo de umidade presente nesta amostra. A folha de mandioca só pode ser consumida após processamento de secagem e trituração; só assim ocorre a eliminação do ácido cianídrico, composto tóxico encontrado naturalmente nas folhas. Na forma de pó, a folha de mandioca possui baixa toxicidade (BOKANGA, 1994; LANCASTER e BROOKS,

1983). Se fizermos a correção da umidade em 61% de água, para folha *in natura*, poderemos verificar que este alimento não convencional também é uma fonte potencial das vitaminas B₁ e B₂. Os cromatogramas típicos dos folhosos e do pó da folha de mandioca encontram-se nas **Figuras 1, 2 e 3**.

Tabela 1: Concentração das vitaminas Tiamina (B₁) e Riboflavina (B₂) em folhosos verdes escuros.

Amostras/ Lotes	Tiamina (µg/100g)		Riboflavina (µg/100g)	
Beldroega (<i>Portulacca oleracea L</i>)	Média + DP	CV (%)	Média + DP	CV (%)
Lote 1	48,9 ± 3,5	7,1	44,2 ± 0,6	1,3
Lote 2	47,9 ± 0,6	1,3	46,6 ± 0,9	2,0
Lote 3	50,0 ± 1,3	2,7	43,5 ± 0,9	2,1
Lote 4	49,1 ± 0,6	1,3	49,5 ± 0,9	1,9
Média + DP	49 ± 1*	2,0	46 ± 3*	6,5
Caruru (<i>Amaranthus sp</i>)	Média + DP	CV (%)	Média + DP	CV (%)
Lote 1	41,8 ± 2,0	4,7	195,8 ± 8,2	4,2
Lote 2	31,3 ± 2,7	8,6	236,0 ± 2,0	0,8
Lote 3	27,0 ± 1,3	4,8	206,3 ± 7,5	3,6
Lote 4	33,8 ± 2,2	6,3	194,5 ± 0,4	0,2
Média + DP	34 ± 6	17,6	208 ± 19*	9,1
Serralha (<i>Sonchus oleraceus L</i>)	Média + DP	CV (%)	Média + DP	CV (%)
Lote 1	29,8 ± 1,0	3,5	144,3 ± 13	9,0
Lote 2	32,0 ± 0,2	0,7	143,4 ± 2,5	1,7
Lote 3	30,5 ± 1,2	3,9	145,6 ± 19,2	13,2
Lote 4	26,3 ± 0,8	3,0	135,8 ± 12,4	9,2
Média + DP	30 ± 2	6,6	142 ± 4	2,8
Tanchagem (<i>Plantago tomentosa Lom.</i>)	Média + DP	CV (%)	Média + DP	CV (%)
Lote 1	32,7 ± 1,8	5,6	63,6 ± 9,8	15,5
Lote 2	25,4 ± 0,7	2,8	91,7 ± 2,3	2,5
Lote 3	32,4 ± 0,5	1,5	78,6 ± 2,2	2,8
Lote 4	29,6 ± 2,8	9,3	85,7 ± 17,5	20,0
Média + DP	30 ± 3	10,0	80 ± 12*	15,0
Couve manteiga (<i>Brassica oleracea</i>)	Média + DP	CV (%)	Média + DP	CV (%)
Lote 1	28,9 ± 1,9	6,6	186,4 ± 8,5	4,6
Lote 2	32,9 ± 0,1	0,2	160,9 ± 13,2	8,2
Lote 3	35,5 ± 0,9	2,6	141,5 ± 14	9,8
Lote 4	41,7 ± 1,3	3,2	180,7 ± 3,0	1,6
Média + DP	35 ± 5	14,3	167 ± 20	12,0

* p < 0,05 diferença significativa, comparada à couve.

DP: Estimativa do desvio padrão

CV: coeficiente de variação

Tabela 2: Concentração das vitaminas Tiamina (B₁) e Riboflavina (B₂) no pó da folha de mandioca (*Manihot esculenta*).

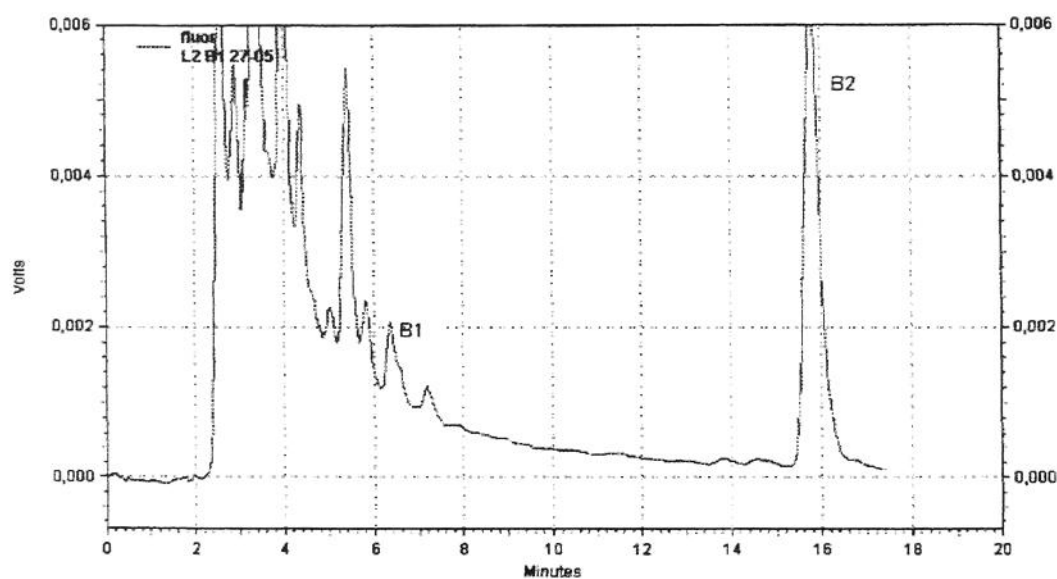
Amostras/ Lotes	Tiamina (µg/100g)		Riboflavina (µg/100g)	
	Média + DP	CV (%)	Média + DP	CV (%)
Folha de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)				
Lote 1	263,3 ± 21,5	8,2	952,5 ± 22,1	2,3
Lote 2	251,4 ± 20,7	8,2	827,6 ± 40,1	4,8
Lote 3	244,7 ± 9,5	3,9	742,2 ± 44,9	6,1
Média + DP	253 ± 9	3,5	841 ± 106	12,6

DP: Estimativa do desvio padrão
CV: coeficiente de variação

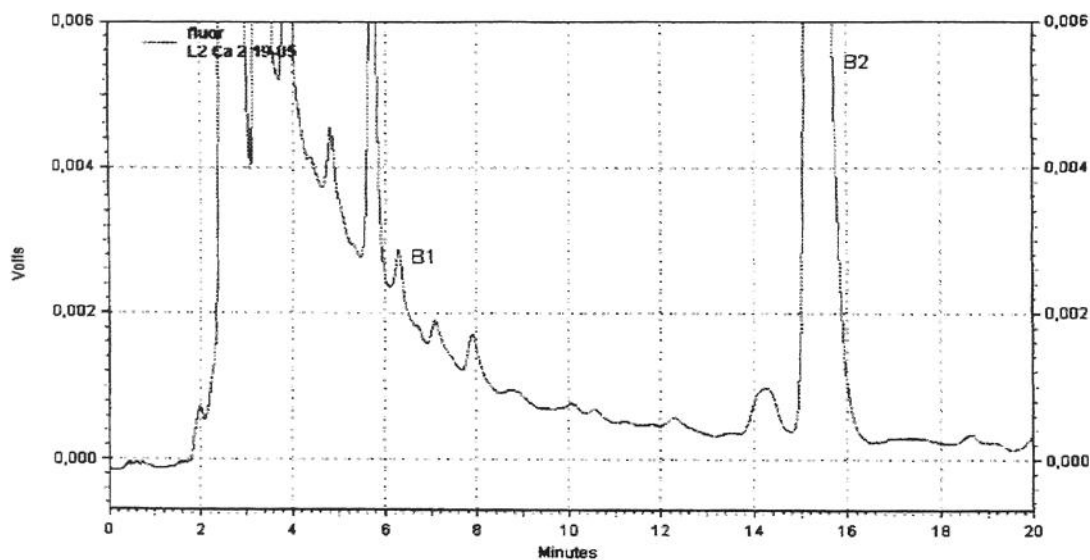
5.4 CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida e validada apresentou-se satisfatória na determinação das vitaminas B₁ e B₂ nos alimentos não convencionais e na couve manteiga (*Brassica oleracea*). Foi possível avaliar a equivalência nos teores das vitaminas entre as diferentes matrizes pela análise de variância. Para os teores de B₁ observou-se que a serralha (*Sonchus oleraceus*), o caruru (*Amaranthus sp.*) e a tanchagem (*Plantago tomentosa Lom.*) podem ser consideradas fontes desta vitamina por não apresentarem diferença significativa com $p > 0,05$. A beldroega, por apresentar teor superior à couve manteiga, também pode ser considerada fonte de B₁. A mesma análise permitiu verificar, para vitamina B₂, que apenas a serralha é considerada equivalente à couve manteiga, porém o caruru se destaca pois possui teores elevados de B₂. Os folhosos beldroega e tanchagem não são considerados fontes desta vitamina porque possuem teores inferiores ao alimento referência.

A larga faixa de variação nos resultados de desvio padrão e CV encontrada nas diferentes amostras sugere que se faça um estudo minucioso, pela análise de superfície de resposta, para verificar o ponto ótimo de extração destes analitos, para cada folha, e observar se essa variação é inerente à metodologia ou à diversidade da matriz alimentícia.

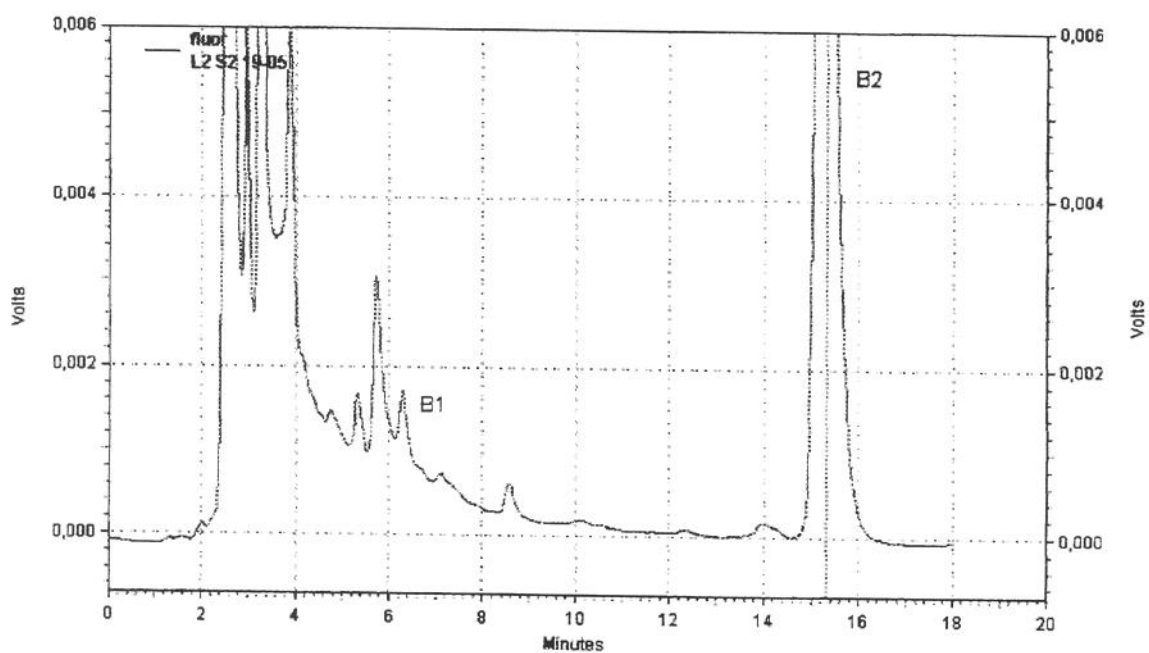


A

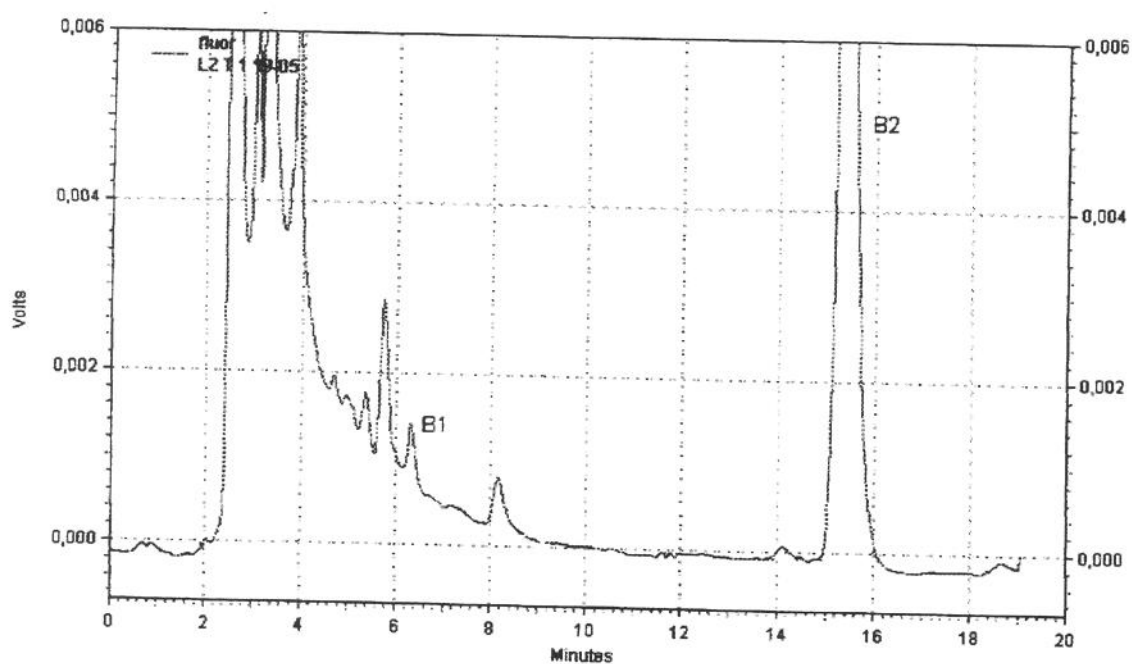


B

Figura 1: Cromatogramas típicos dos extratos de beldroega (*Portulacca oleracea L*) (A) e caruru (*Amaranthus sp*) (B) λ_{Ex} 370nm, λ_{Em} 508nm e 522nm, para B₁ e B₂, respectivamente. Condições cromatográficas: fase móvel com 22% MEOH, 2,5% ACN, 5mM AHS e 0,15% TEA, pH 2,8; vazão de 1,2mL/min.



C



D

Figura 2: Cromatograma típico dos extratos de serralha (*Sonchus oleraceus* L) (C) e tanchagem (*Plantago tomentosa* Lom.) (D) λ_{Ex} 370nm, λ_{Em} 508nm e 522nm, para B₁ e B₂, respectivamente. Condições cromatográficas: fase móvel com 22% MEOH, 2,5% ACN, 5mM SHA e 0,15% TEA, pH 2,8; vazão de 1,2mL/min.

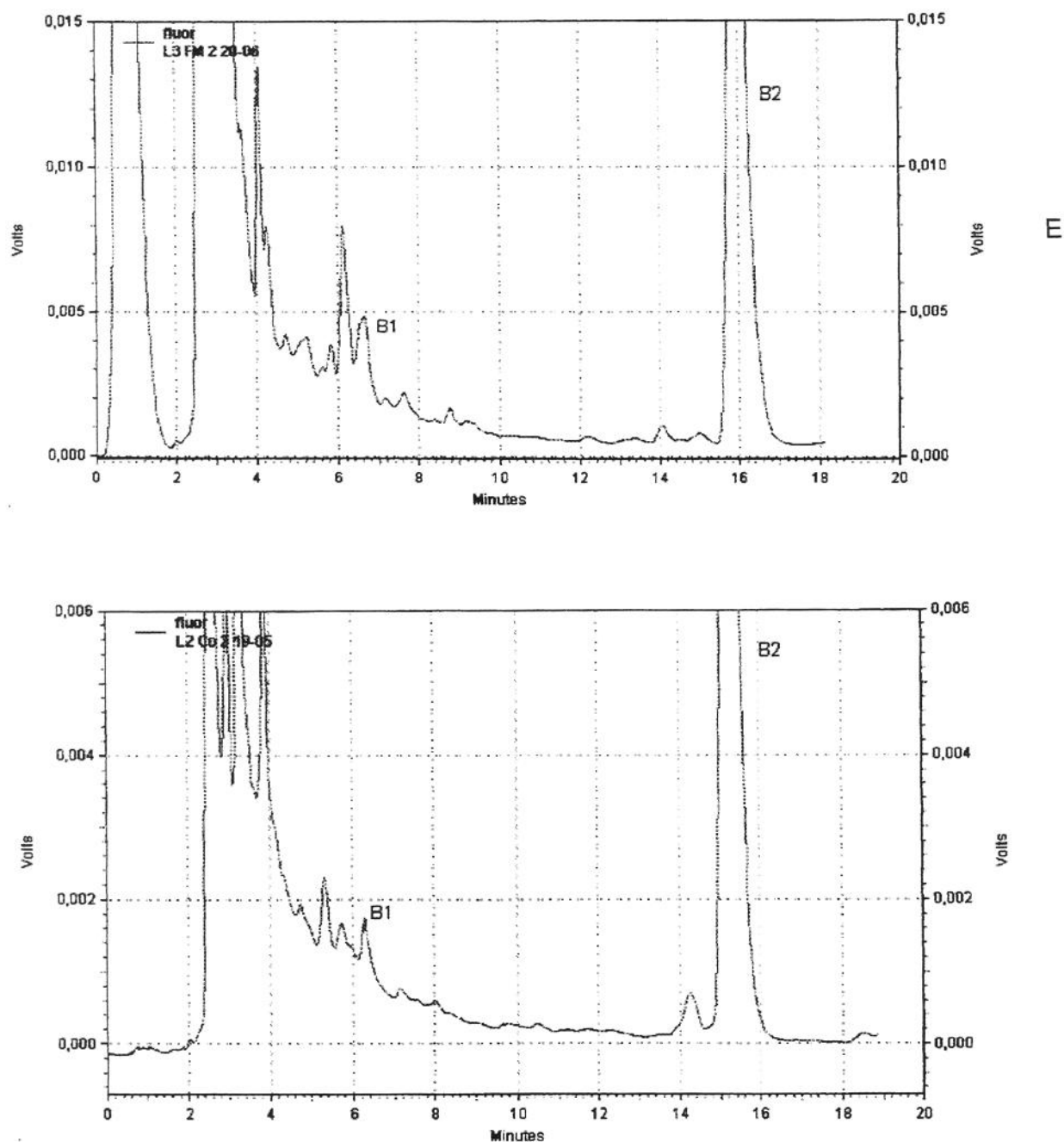


Figura 3: Cromatograma típico dos extratos de pó de folha de mandioca (*Manihot esculenta*) (E) e couve manteiga (*Brassica oleracea*) (F) λ_{Ex} 370nm, λ_{Em} 508nm e 522nm, para B₁ e B₂, respectivamente. Condições cromatográficas: fase móvel com 22% MEOH, 2,5% ACN, 5mM SHA e 0,15% TEA, pH 2,8; vazão de 1,2mL/min.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, S. H., Adult thiamine requirements and the continuing need to fortify processed cereals. **The Lancet**, July 12: 85-89, 1986.

BENTON, D., HALLER, J., FORDY, J. The vitamin status of young british adults. **International Journal Nutrition Research**, v. 67: 34-40, 1997.

BOKANGA, M. Processing of cassava leaves for human consumption. **Acta Horticulturae**, v. 375: 203-207, 1994.

GARCIA, F. P.; DÍAZ, C.; HARDISSON, A., Spectrofluorometric determination of thiamin and riboflavin in vegetable foods. **Analytical Letters**, v. 26 (9): 1977-1996, 1993.

LANCASTER, P.A. e BROOKS, J. E. Cassava leaves as human food. **Economic Botany**, v. 37(3): 331-348, 1983.

LIU, L.; HOWE, P.; ZHOU, YeFang.; XU, Zhi-Qiang.; HOCART, C.; ZHANG, R. Fatty acids and β - carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 893: 207-213, 2000.

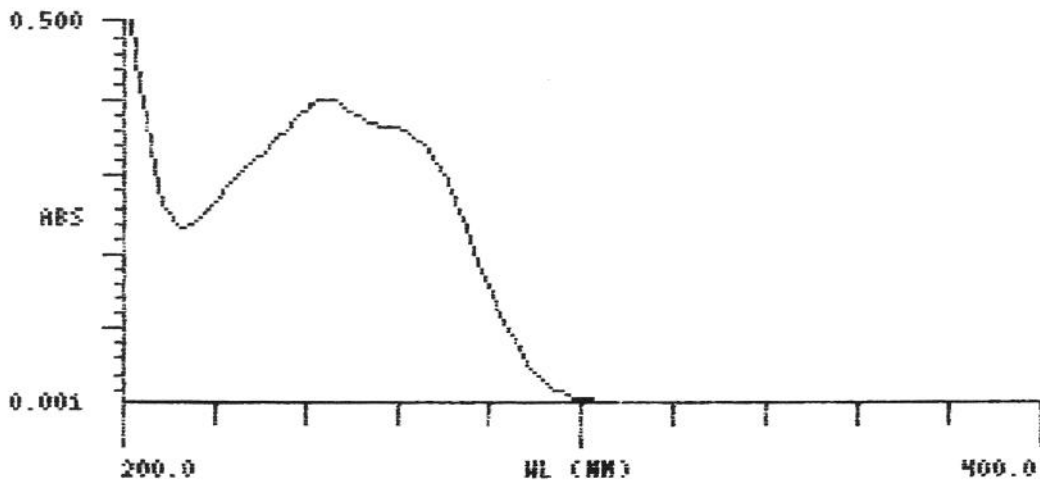
MERCADANTE, A. Z. e AMAYA, D. B. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 25: 213-219, 1990.

PENTEADO, M. V. C.; MINAZZI, R. S.; ALMEIDA, L. B. Carotenóides e atividade pró-vitamínica A de folhas de hortaliças consumidas no norte do Brasil. **Revista Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 22 (2): 97-102, 1986.

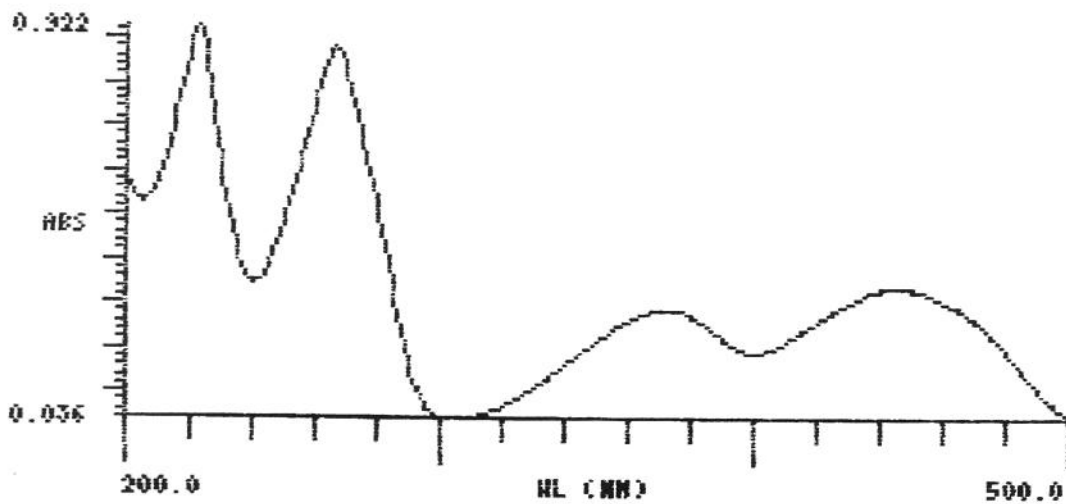
SIMS, A. e SHOEMAKER, D. Simultaneous liquid chromatographic determination of thiamine and riboflavin in selected foods, **Journal of AOAC International**, v. 76 (5): 1156-1160, 1993.

ANEXOS

ANEXOS

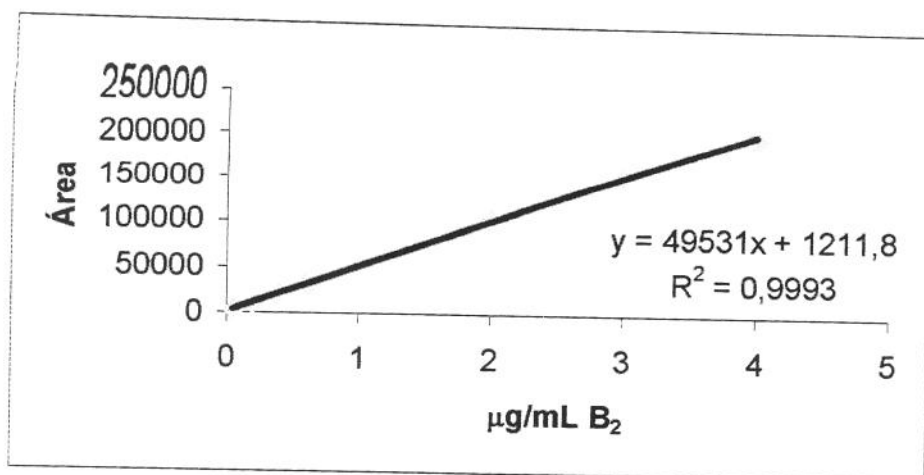
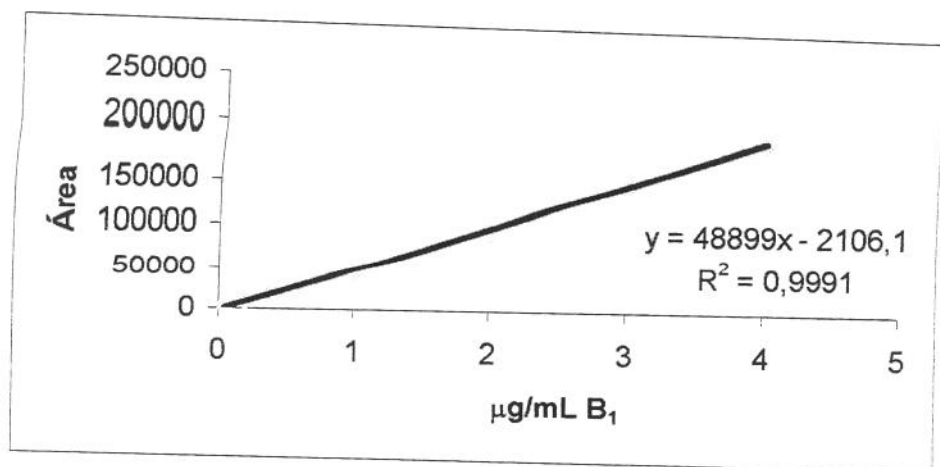


Anexo 1: Espectro de absorção da solução padrão de tiamina (eluida em etanol 20%, pH 3,5) por espectrofotômetro.

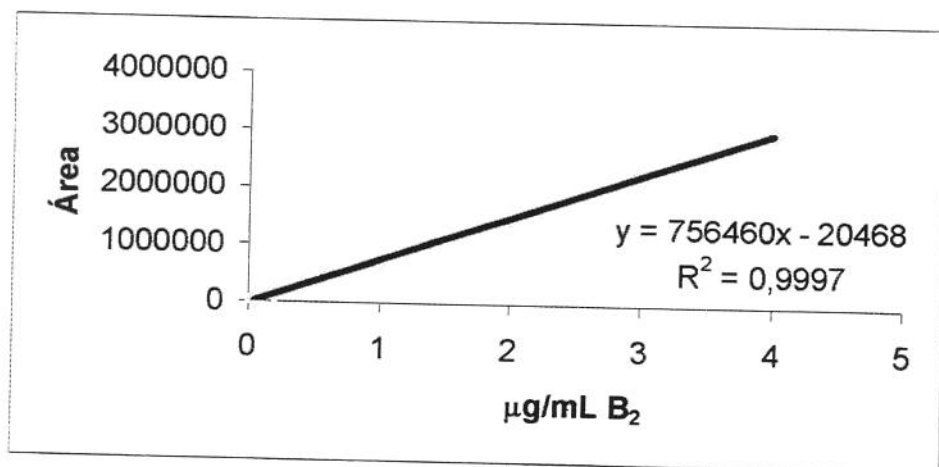
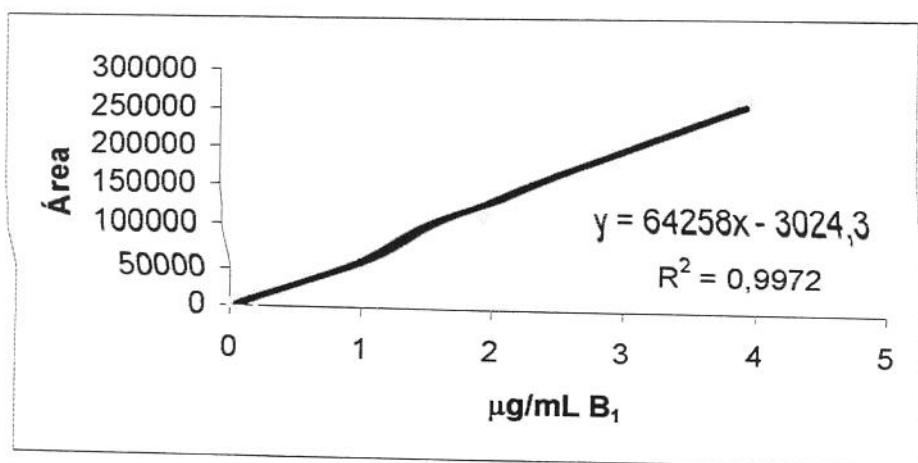


Anexo 2: Espectro de absorção da solução padrão da riboflavina (eluida em ácido acético 0,02N) por espectrofotômetro.

Curvas de padronização externa



Anexo 3 : Curva de padronização da Tiamina (A) e Riboflavina (B); UV λ 254nm (média de triplicata).



Anexo 4 : Curva de padronização da Tiamina (C) e Riboflavina (D); fluorescência λ_{Ex} 370nm; λ_{Em} 508nm e 522nm, respectivamente (média de triplicata).

ERRATA

- Onde se lê: " A tiamina foi eluída por etanol..." leia-se, " A tiamina foi diluída em etanol..." (**página 48- Capítulo 2**).
- Onde se lê: " Espectro de absorção da solução padrão de tiamina (eluída em etanol 20% pH 3,5)..." leia-se, "Espectro de absorção da solução padrão de tiamina (diluída em etanol 20% pH 3,5)..." (**página 116- Anexos**).
- Os dois primeiros parágrafos da **página 51** deveriam estar na **página 49** dando continuidade ao texto escrito no tópico A - Avaliação dos procedimentos de extração e clarificação (**Capítulo 2**).