

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE ÁCIDO FÓLICO EM
ALIMENTOS ENRIQUECIDOS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Rodrigo Ramos Catharino, aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de outubro de 2000.

Campinas, 20 de outubro de 2.000

Rodrigo Ramos Catharino
Farmacêutico

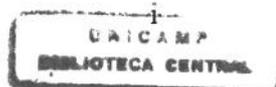
Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy
Presidente da Banca

Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy
Orientadora

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

CAMPINAS – SP
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



200018971

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
1/Unicomp
C284d
V. Ex
TOMBO BC/ 48199
PROC. 16-278100
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 15/12/00
N.º CPD

CM-00154400-2

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

C284d Catharino, Rodrigo Ramos
Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para
análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos / Rodrigo
Ramos Catharino. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

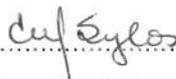
Orientador: Helena Teixeira Godoy
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Vitamina M. 2.Alimentos enriquecidos. 3.Cromatografia
líquida de alta eficiência. 4.Vitaminas – Análise. I.Godoy,
Helena Teixeira. II.Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy
FEA/UNICAMP
Presidente



Prof. Dra. Célia M. Sylos
UNESP/ARARAQUARA
Membro

Prof. Dra. Isabel Cristina S. F. Jardim
IQ/UNICAMP
Membro



Prof. Dra. Neura Bragagnolo
FEA/UNICAMP
Membro

Campinas, 2000.

Em especial,

dedico este trabalho

à minha família,

José Roberto, Jamira, Raquell, Dog e Wurts,

pelo amor e carinho.

Dedico

*à minha namorada Milena,
minha orientadora Profa. Helena
e aos meus amigos que fiz durante este trabalho,
Profa. Regina, Cris, Marcelo, Jesuí, Teca,
Juliana, Antonio e Ana, Natália, Cadu e a
todos que conheci durante todos os anos da minha vida.*

Alegria Infinita

Deus criou o homem para que tenha alegria.

A alegria está nos amigos.

Por isso estou sempre preenchido pelo sentimento de alegria.

*Um bom trabalho é construído somente quando temos bons amigos
que nos estimula no sucesso e nos consolam nas horas tristes.*

*A alegria chama a alegria
e a minha alegria aumenta a cada dia porque tenho muitos amigos.*

Sorria, os amigos estão em todos os lugares.

AGRADECIMENTOS

Ao *Pai Celestial*, por todas as bênçãos derramadas em minha vida, serei grato todo o sempre, mesmo sabendo que nunca sereia suficiente toda a minha gratidão para retribuir as grandes maravilhas ocorridas em minha vida.

Aos meus grandes, maravilhosos e corajosos pais, os quais, amo muito, *José Roberto e Jamira*, pelo amor, carinho, sacrifício e por tudo que me ensinaram durante toda a vida, aos quais, serei grato todo sempre.

À minha irmã e grande amiga que amo muito *Raquell*, companheira de muitos momentos, pelo eterno carinho, paciência e pelo estímulo nos momentos de cansaço.

À minha namorada e amiga *Milena*, por quem tenho muita admiração e amor, pela compreensão, paciência, amor e carinho.

À minha orientadora Profa *Helena*, minha mãe no laboratório, por quem tenho muita estima, respeito, amizade e exemplo profissional, por uma grande oportunidade na vida, pela grande ajuda em minha vida acadêmica, profissional e pessoal, a qual, serei grato todo sempre.

À Profa. Dra. *Maria Regina*, por quem tenho muita estima e respeito, pelas oportunidades e confiança.

Ao Prof. Dr. *Graciliano de Oliveira Neto*, por quem tenha muito respeito e estima, pela grande ajuda em minha vida acadêmica, profissional e pessoal.

Às professoras *Ildenize B.S. Cunha e Ângela Ramalho Custódio*, por quem tenho muito respeito e estima, pela confiança, ajuda e apoio.

Ao meu grande amigo *Jesuí*, por quem tenho muita estima, admiração e respeito, por todos os conselhos e palavras que vão me ajudar por toda a minha vida.

Ao meu amigo *Marcelo*, a quem adotei como irmão mais velho, por toda ajuda e paciência.

Aos meus amigos *Antonio e Ana*, por toda amizade, ajuda e companheirismo.

Aos meus amigos *Cris e Jorge*, pelas palavras de consolo, pela alegria, e por trazer o meu amiguinho *Matheus* no laboratório.

À minha amiga *Natália*, a quem admiro, pelas conversas e palavras de alegria.

Às minhas amigas *Teca e Ju*, minhas queridas segunda mãe e irmã de laboratório, as quais, estariam na minha lista de “desagradecimento,” se não fosse pela paciência durante as brincadeiras no laboratório, pelas palavras alegres e pela grande amizade.

Ao meu amigo *Cadu*, pela ajuda, amizade e alegria.

Às minhas amigas *Neide e Edna*, que ajudaram na minha formação pessoal e profissional, por todo estímulo, paciência, conselhos e amizade.

Ao meu amigo *Cosme*, pela grande ajuda e por toda atenção .

Aos meus amigos *Marquinho, Marcão e Jardete*, pela grande ajuda, amizade e paciência.

Aos amigos da *Fundação André Tosello*, que ajudaram na minha formação pessoal.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições e sugestões apresentadas para a redação da tese final.

A *CAPES*, pelo apoio financeiro.

À M. CASSAB Comércio e Indústria LTDA., na pessoa do Sr. *Waldir Horobert*, pelo padrão de vitamina M concedido.

A todos que diretamente ou indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho.

Muito obrigado

Rodrigo

RESUMO

O conhecimento dos níveis de enriquecimento dos alimentos, com ácido fólico (AF), tem sido dificultado, especialmente, pela falta de metodologias apropriadas. Visando atender a esta necessidade, foi desenvolvida e avaliada uma metodologia para determinação do ácido fólico em alimentos enriquecidos, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método desenvolvido foi aplicado em 36 diferentes tipos/marcas de alimentos enriquecidos, como leite em pó, leite esterilizado, bebida láctea, queijo tipo *petit suisse*, cereal matinal e farinha láctea. As vantagens do método proposto foram versatilidade, simplicidade e rapidez, principalmente das etapas de extração e limpeza. A extração do AF foi feita com KOH (0,1mol/L), através de vibração ultra-sônica por 10 minutos, e a limpeza do extrato com H₃PO₄ (0,1mol/L), tampão fosfato e ácido tricloroacético. Através dos resultados obtidos pelo método de superfície de resposta, constatou-se que essas etapas foram realizadas dentro da faixa ótima para todos os parâmetros estabelecidos. No sistema cromatográfico utilizou-se coluna de fase reversa C₁₈, e a eluição por gradiente permitiu uma corrida rápida de apenas 9 minutos, necessitando de mais 5 minutos para o re-equilíbrio da coluna, antes de uma nova injeção. A detecção foi feita a 290nm e a quantificação por curva de padronização externa. Os limites de detecção e quantificação e a recuperação, determinados nos níveis de enriquecimento para o leite em pó, foram 1,3ng/mL, 2,6ng/mL e 98,6%, respectivamente. Testes de repetibilidade apresentaram coeficientes de variação inferiores a 7,3%. Dos alimentos enriquecidos analisados, 25 foram produtos lácteos, sendo que em 16 deles o ácido fólico estava presente em quantidade igual ou superior a declarada, 7 produtos apresentaram quantidades inferiores, principalmente os leites esterilizados e as bebidas lácteas. Em duas amostras, do mesmo fabricante, de queijo tipo *petit suisse*, embora constasse no rótulo, não foi detectado ácido fólico. Entre cereais matinais e farinhas lácteas foram analisadas 11 amostras, das quais somente 5 apresentaram concentrações iguais ou superiores às especificadas nos rótulos. Os resultados obtidos neste trabalho, além de demonstrarem as vantagens e aplicabilidade da metodologia desenvolvida e validada, apontam para a necessidade de maior rigor no controle das taxas de enriquecimento destes alimentos e reforçam a necessidade de futuros estudos de vida de prateleira dos mesmos.

SUMMARY

Food enrichment with folic acid (FA) has been difficult to control, due to the lack of appropriate methodology. With the aim of solving this problem, methodology for the determination of folic acid in enriched foods was developed and evaluated, using high performance liquid chromatography (HPLC). The method developed was applied to 36 types/brands of enriched foods, such as powdered milk, sterilized milk, milk based beverages, *petit suisse* type cheese, breakfast cereals and milk based mixes. The advantages of the method proposed were versatility, simplicity and speed, especially in the extraction and clean-up steps. Ultrasonication for 10 minutes in KOH (0.1 mol/L) was used to extract the FA, followed by a clean-up procedure using H₃PO₄ (0.1 mol/L), phosphate buffer and trichloroacetic acid. Response surface methodology applied to the results, showed that these steps were carried out within the optimum range for all the parameters established. In the chromatographic step, a C₁₈ reverse phase column was used, and gradient elution allowed for a quick run of only 9 minutes, requiring a further 5 minutes to re-equilibrate the column before injecting another sample. Detection was at 290nm and quantification by means of an external standard curve. For the determination of the enrichment levels in powdered milk, the limits of detection, quantification and recuperation were respectively 1.3ng/mL, 2.6ng/mL and 98.6%. Repeatability tests presented coefficients of variation below 7.3%. Of the enriched foods analyzed, 25 were milk based, and in 16 of these, folic acid was present in amounts equal to or greater than those declared on the label, whilst in 7 products the values were below those declared, these being mainly sterilized milk samples and milk based beverages. In two samples of *petit suisse* type cheese, both from the same manufacturer, folic acid was not detected, although it appeared on the label. Of the 11 samples of breakfast cereal and milk based mix analyzed, only 5 presented concentrations equal to or greater than those specified on the label. In addition to showing the advantages and applicability of the methodology developed and validated, the results of this study showed the need for greater control of the enrichment levels of these foods, and reforced the need for further studies on the shelf life of the products.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
Referências Bibliográficas.....	3
CAPÍTULO 1 - ÁCIDO FÓLICO E FOLATOS EM ALIMENTOS - UMA REVISÃO...	5
Resumo.....	7
Summary.....	7
1. Introdução.....	8
2. Funções Bioquímicas.....	9
3. Necessidades Nutricionais de Folatos.....	10
4. Toxidez.....	12
5. Fontes de Folatos.....	12
6. Biodisponibilidade e Estabilidade.....	12
7. Enriquecimento de Alimentos.....	14
8. Métodos de Análise para Ácido Fólico e Folatos.....	15
8.1 Métodos Biológicos.....	16
8.2 Métodos Microbiológicos.....	16
8.3 Métodos Químicos.....	17
8.4 Métodos Imunológicos.....	17
8.5 Métodos Cromatográficos.....	18
8.5.1 Métodos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	18
8.5.1.1 Extração.....	19
8.5.1.2 Limpeza do extrato.....	19
8.5.1.3 Etapa Cromatográfica.....	20
a) Fase Móvel.....	20
b) Fase Estacionária.....	21
8.5.1.4 Sistema de Detecção.....	21
8.5.1.5 Identificação.....	22
8.5.1.6. Quantificação.....	23
9. Validação da Metodologia.....	23
10. Referência Bibliográficas.....	24
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS POR CLAE	30
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Material e Métodos.....	34
Material.....	34
Métodos.....	34
a) Avaliação da composição da fase móvel e sistema de eluição	34
b) Avaliação dos processos de extração e de limpeza do extrato	35

c) Avaliação da detecção e identificação.....	37
d) Avaliação da estabilidade do padrão.....	37
Resultados e Discussão.....	38
Avaliação dos Parâmetros Cromatográficos.....	38
Fase móvel e sistema de eluição.....	38
Avaliação dos Procedimentos de Limpeza do Extrato e Extração.....	40
Avaliação dos procedimentos de detecção e Identificação.....	41
Avaliação da Estabilidade do Padrão.....	43
Conclusões.....	44
Referências Bibliográficas.....	45

CAPÍTULO 3 – OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA..... 49

Resumo.....	49
Abstract.....	50
Introdução.....	51
Material e Métodos.....	53
Material.....	53
Reagentes.....	53
Equipamentos.....	53
Métodos.....	54
Metodologia Analítica.....	54
Validação do Método.....	56
Limites de detecção e quantificação.....	56
Recuperação de padrões.....	56
Repetibilidade.....	56
Resultados e Discussão.....	57
Etapas Analíticas.....	57
Validação de Metodologia.....	61
Conclusões.....	63
Referências Bibliográficas.....	64

CAPÍTULO 4 – APLICAÇÃO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES E PRODUTOS LÁCTEOS..... 67

Resumo.....	67
Abstract.....	68
Introdução.....	69
Material e Métodos.....	70
Amostragem.....	70
Padrão.....	70

Equipamentos.....	70
Extração líquido/líquido.....	71
Extração em Fase Sólida (SPE).....	71
Método Cromatográfico.....	72
Resultados e Discussão.....	72
Conclusões.....	74
Referência Bibliográficas.....	76

CAPÍTULO 5 – DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM PRODUTOS LÁCTEOS ENRIQUECIDOS..... 79

Resumo.....	79
Abstract.....	80
Introdução.....	80
Material e Métodos.....	82
Material.....	82
Reagentes.....	82
Equipamentos.....	82
Métodos.....	83
Resultados e Discussão.....	84
Estudo de Prateleira com Queijo Tipo Petite Suisse.....	85
Conclusões.....	86
ReferênciaS Bibliográficas.....	90

CAPÍTULO 6 – DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO,POR CLAE, EM 93 CEREAIS MATINAIS E FARINHAS LÁCTEAS

Resumo.....	93
Abstract.....	94
Introdução.....	95
Material e Métodos.....	96
Material.....	96
Reagentes.....	96
Equipamentos.....	96
Métodos.....	97
Extração.....	97
Cromatografia.....	97
Resultados e Discussão.....	98
Conclusões.....	101
Referência Bibliográficas.....	102

CAPÍTULO 7 – OTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA..... 105

Resumo.....	105
Abstract.....	106
Introdução.....	106
Material e Métodos.....	107
Amostra.....	107
Reagentes.....	107
Equipamentos.....	108
Método.....	108
Delineamento Estatístico.....	108
Método de Superfície de Resposta.....	110
Resultados.....	112
Conclusões.....	114
Referências Bibliográficas.....	116
CONCLUSÕES.....	119
SUGESTÕES.....	121
ANEXOS.....	124

INTRODUÇÃO

As vitaminas são substâncias orgânicas indispensáveis a manutenção das funções metabólicas do organismo e da saúde. Sua inclusão na dieta é necessária por não serem sintetizadas pelo homem. Foram denominadas assim por se acreditar que eram aminas, porém, sabe-se hoje que as vitaminas possuem estrutura química variada. As vitaminas são importantes para o homem, pois sua carência acarreta várias doenças como o beribéri, escorbuto, anemia, entre outras (BRODY, 1994).

Devido a diferença de solubilidade existente entre as diferentes vitaminas, ocorreu uma divisão genérica desses compostos em dois grupos. As lipossolúveis são solúveis em solventes orgânicos, facilmente oxidáveis e não possuem nitrogênio na sua constituição. Fazem parte dessa classe as vitaminas A, D, E e K. As hidrossolúveis são solúveis em água e, portanto, não se armazenam com facilidade nos organismos animais, possuem estrutura química diversificada e geralmente atuam como coenzimas. Nesta categoria estão as vitaminas do complexo B e a vitamina C.

O ácido fólico (AF), também conhecido como vitamina B₉, B₁₁, B_c e M, apresenta funções ainda pouco conhecidas. Novas descobertas sobre a ação do AF e da sua importância nos alimentos e no organismo foram feitas nesta última década (KATZUNG, 1994). Hoje, os pesquisadores estão convencidos que o ácido fólico é indispensável à dieta humana e animal, exatamente por estar diretamente ligado a processos bioquímicos importantes.

O AF está amplamente distribuído nos alimentos na forma de folato, principalmente nas verduras frescas, fígados, leveduras e algumas frutas. Contudo, nos dias atuais, a ingestão de uma dieta insuficiente em folatos tem levado a deficiência dessa vitamina. Isso é facilmente explicado, o ser humano hoje tem despendido cada vez menos tempo com a sua alimentação, como também, não se tem preocupado com a qualidade dos alimentos consumidos diariamente.

Dietas carentes dessa vitamina podem provocar deficiência na síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) em toda e qualquer célula que sofra replicação cromossômica para divisão. As pessoas mais afetadas com a deficiência de AF são mulheres em idade fértil, grávidas, crianças e idosos, entre outros casos especiais. Muitos estudos levam a crer que o AF previna o câncer, malformações congênitas, anemia e doenças cardiovasculares (KATZUNG, 1994). No

entanto, sabe-se que doses elevadas de AF podem vir a mascarar certas doenças, causar convulsões em pessoas suscetíveis e até mesmo degenerar células cerebrais, assim sendo, a concentração de ácido fólico foi limitada em 1 mg/dia ou menos por pessoa (TUCKER et al., 1996).

O processo de enriquecimento aumenta a qualidade dos alimentos e pode vir a ser uma das soluções empregadas para resolver o problema da ingestão insuficiente, não só de AF mas também de outros nutrientes (AUGUSTIN et al., 1982; MAXWELL, 1990; GASSIN, 1991; RANUM, 1991; WALTER, 1994). Entre os alimentos escolhidos para o enriquecimento, leites e cereais, de uma maneira geral, são os produtos mais comumente adicionados dessa vitamina. O leite em pó é uma das principais fontes de alimentação para crianças de 0 a 2 anos. Seu fácil acesso e preparo, preços mais compatíveis nos últimos anos e, principalmente, por colaborar com um melhor desenvolvimento da criança são os principais motivos para o favorecimento do seu consumo. Já os cereais possuem um importante papel no atendimento às necessidades nutricionais humanas e são alimentos tradicionalmente utilizados no processo de enriquecimento com vitaminas hidrossolúveis.

Embora um grande número de alimentos estão sendo enriquecidos com ácido fólico, o controle desses produtos tem sido dificultado pela falta de laboratórios preparados para a realização das análises, mas, principalmente, pela falta de metodologias analíticas adequadas (MACRAE, 1990; POLESELLO e RIZZOLO, 1990). O método oficial (CUNNIFF, 1997) para a determinação de AF e folatos em alimentos é um método microbiológico que apresenta muitos inconvenientes, como baixa precisão, lentidão na análise e exatidão questionável.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido empregada nos últimos anos em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão e com a possibilidade de se determinar as diferentes formas de folatos ativos em uma única análise, mesmo em quantidades pequenas e em matrizes complexas (MACRAE, 1990).

O ácido fólico é a forma comercial utilizada para o enriquecimento, principalmente, pela sua estabilidade às condições de processamento e estocagem (GUBLER, 1991). No entanto, poucos foram os pesquisadores que se dedicaram à determinação do ácido fólico em alimentos (OSSEYI et al., 1998; RADER et al. 1998), os demais desenvolveram e aplicaram métodos para a

determinação de folatos (VAHTERISTO et al., 1997; FINGLAS et al., 1999; KONINGS, 1999; RUGGERI et al., 1999).

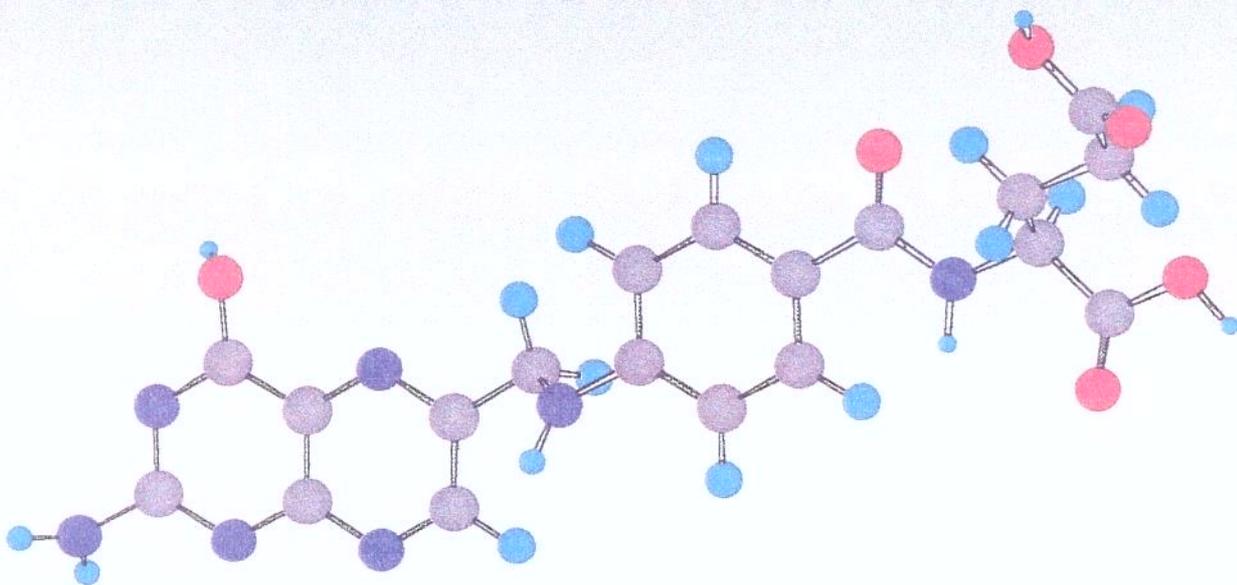
O desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de uma metodologia, utilizando a CLAE, para a determinação dos teores de ácido fólico é de extrema importância para os organismos de fiscalização e a própria indústria de alimentos, possibilitando-os exercer melhor controle de qualidade sobre os produtos e processos tecnológicos.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram o de desenvolver uma metodologia, utilizando a CLAE, para determinação de ácido fólico em alimentos enriquecidos; validar interlaboratorialmente a metodologia; e aplicar em algumas matrizes alimentícias, como em produtos lácteos e cereais matinais enriquecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUSTIN, J.; TASSINARI, P.D.; FELLMAN, J.K.; COLE, C.L. B vitamin content of selected cereals and baked products. **Cereal Foods World**, 27 (4): 159-161, 1982.
- BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. United Kingdom. Honolulu, Hawaii: Academic Press Limited, 1994
- CUNNIFF, P. (ed) **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17ed AOAC International, Gaithersburg, Maryland, 1997.
- FINGLAS, P.M.; WIGERTZ, K.; VAHTERISTO, L.; WITTHÖFT, C.; SOUTHON, S.; FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**, 64: 245-255, 1999.
- GASSIN, A.L. Aspects réglementaires de l'enrichissement en France et en Europe. **Cah. Nutrition Diétics**, 26 (1): 85-88, 1991.
- GUBLER, C.J. Thiamin: In: **Handbook of vitamins**. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc, New York, 595, 1991.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- KONINGS, E.J.M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. **Journal of AOAC International**, 82 (1): 119-127, 1999.
- MACRAE, R. HPLC determination of vitamins. **Journal Micronutrient Analysis**, 7: 247-260, 1990.
- MAXWELL, D.P.E. Cost-control implications of nutrients fortification. **Prepared Food**, Feb: 87-88, 1990.

- OSSEYI, E. S.; WEHLING, R.L.; ALBRECHT, J. A. Liquid chromatographic method for determination added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, **826** (2): 235-240, 1998.
- POLESELLO, A.; RIZZOLO, A. Application of HPLC to the determination of water soluble vitamins in foods: 2 (a review 1985-1989). **Journal Micronutrients Analysis**, **8**: 105-158, 1990.
- RADER, J.I.; WEAVER, C.M.; AGYAL G. Use of microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. **Food Chemistry**, **62** (4): 451-465, 1998.
- RANUM, P. Cereal enrichment . In: **Handboock of cereals science and technology**. Ed Lowrenz, New York, 882, 1991.
- RUGGERI, S.; VATHERISTO, L.T.; AGGUZZI, A.; FINGLAS, P.; CARNOVALE, E. Determination of folate vitamers in food and italian reference diet by high performace liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, **855** (1):237-245, 1999.
- TUCKER, K.L.; MAHNKEN, B.; WILSON, P.W.F.; JACQUES, P.; SELHUB, J. Folic acid fortification of the food supply. Potential benefits and risks for the Elderly population. **Jounal of the American Medical Association**, **276** (23): 1879-1885, 1996.
- VAHTERISTO, L.T.; OLLILAINEN, V.; VARO P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg, and dairy products consumed in Finland. **Journal of AOAC International**, **80** (2): 373-378, 1997.
- WALTER, P. Vitamin requeriments and enrichment of foods. **Food Chemistry**, **49**: 113-117, 1994.



CAPÍTULO 1

ÁCIDO FÓLICO E FOLATOS EM ALIMENTOS UMA REVISÃO

Trabalho a ser submetido à revista **Brazilian Journal of Food Teechnology**

ÁCIDO FÓLICO E FOLATOS EM ALIMENTOS -UMA REVISÃO-

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

Resumo

Há cerca de uma centena de anos foi reconhecida a necessidade de pequenas quantidades de substâncias orgânicas específicas, cuja falta pode causar distúrbios ao ser humano. Essas substâncias essenciais, orgânicas e não energéticas, são fornecidas na dieta. Recentemente, os folatos, também conhecidos como vitamina B₉, M ou B_c, ganharam a atenção dos pesquisadores devido a muitos estudos que apontam a deficiência dessa vitamina como possível causa de doenças graves que assolam a humanidade. Os folatos são encontrados principalmente em vegetais folhosos, carnes, frutas e cereais. A importância dessa vitamina tem levado alguns governos a implantar programas de enriquecimento de alimentos e até campanhas elucidativas sobre a importância dos folatos, conseqüentemente aumentou a preocupação dos analistas em desenvolver metodologias apropriadas para a determinação dessa vitamina.

Summary

Somewhere about one hundred years ago the necessity of small quantities of specific organic substances were attested, whose lack can cause some trouble for the human being. Such substantial essences, organic and not energetic, are supplied with diet. Recently the folates, also known as B₉, M or B_c vitamin, were noticed by researches because of great deal of studies pointing out the insufficiency of that vitamin as a possible reason of serious diseases which damage humanity. The folates are mainly found in leafy vegetables, meat, fruits and cereal. The importance of that vitamin has led some governments to introduce elucidative

campaigns for the enrichment of foods and even some elucidative ones about the importance of folates, and, consequently, it intensified the worry of analysts to develop appropriate methodologies on the determination of that vitamin.

1. INTRODUÇÃO

Em 1935 foi descrito um fator responsável pela deficiência nutricional em macacos denominado de “vitamina M”. Logo depois, em 1939, um outro fator, o qual a falta ocasionava anemia em galinhas, foi batizado de “vitamina B”. Em 1941 foi descrito um composto necessário para a nutrição de uma bactéria (*Lactobacillus casei*) denominado de “fator L. casei” e, no mesmo ano, foi isolado um composto cristalino do espinafre que recebeu o nome de ácido fólico (folium é folha). Descobriu-se então que esses e outros compostos, descritos desde 1935 com características nutricionais e químicas parecidas, pertenciam a família do ácido pteroilglutâmico, cujo protótipo do grupo é o ácido fólico.

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico) também é conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B₉, vitamina B₁₂ e vitamina M. A fórmula estrutural do ácido pteroilglutâmico (PteGlu1) é apresentada na **Figura 1**. Folatos é um termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente, mas também com atividade semelhante a do ácido fólico (AF) (BRUBACKER *et al.*, 1985, KEAGY, 1985, BÜHLER, 1988, BRODY, 1991, ZANINI, OGA, 1994, BRODY, 1994, DALY *et al.*, 1997).

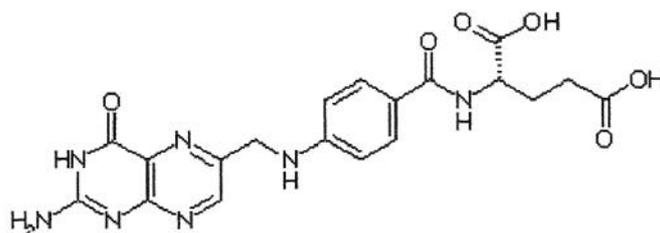


Figura 1. Estrutura do Ácido Pteroilglutâmico (ácido fólico).

2. FUNÇÕES BIOQUÍMICAS

Apesar do ácido pteroilglutâmico ser a estrutura química comum aos folatos, ele não é o principal congênere nos alimentos, nem a coenzima ativa para o metabolismo intracelular. Após a absorção, que ocorre no intestino, o PteGlu1 é rapidamente reduzido para dar origem, primeiro ao ácido 7,8-diidrofolico (H_2 PteGlu1), reação catalizada pela enzima redutase diidrofolato, e em seguida ao ácido plenamente reduzido nas posições 5,6,7 e 8, o ácido tetraidrofolico (H_4 PteGlu1) que atua como acceptor de várias unidades monocarbônicas (**Figura 2**). Essas unidades ligam-se a posição 5 ou 10 da pteridina ou fazem ponte com esses átomos, formando um novo anel de 5 membros.



Figura 2. Redução do ácido fólico à ácido tetraidrofolico.

As formas mais importantes do ácido pteroilglutâmico que são sintetizadas a partir das reações de metilação e replicação celular no organismo humano estão apresentadas na **Tabela 1**. Cada uma desempenha um papel específico no metabolismo intracelular, no entanto, o principal papel dos folatos é a formação de cofatores essenciais as reações de metilação e replicações celulares (GOODMAN , GILMAN, 1991, KATZUNG, 1994 , ZANINI , OGA 1994, ALVAREZ, 1997, DALY *et al.*, 1997).

Tabela 1. Estruturas e nomenclatura dos congêneres do ácido pteroilglutâmico (ácido fólico).

Composto	Congêneres	Radical	Posição
Metiltetraidrofolato	CH ₃ H ₄ PteGlu	-CH ₃	N5
Ácido folínico	5-CHOH ₄ PteGlu	-CHO	N5
10-Formiltetraidrofolato	10-CHOH ₄ PteGlu	-CHO	N10
5,10-Meteniltetraidrofolato	5,10-CHH ₄ PteGlu	-CH-	N5-10
5,10-Metilenotetraidrofolato	5,10CH ₂ H ₄ PteGlu	-CH ₂ -	N5-10
Formiminotetraidrofolato	CHNHH ₄ PteGlu	-CHNH	N5
Hidroximetiltetraidrofolato	CH ₂ OHH ₄ PteGlu	-CH ₂ OH	N10

Fonte: GOODMAN, GILMAN (1991).

3. NECESSIDADES NUTRICIONAIS DE FOLATOS

A deficiência e o requerimento de ácido fólico nos animais varia muito. Em galinhas a deficiência de folatos resulta na redução de crescimento e em anemia, em cobaias resulta em leucopenia, baixo crescimento e morte (BRODY, 1991).

A deficiência de AF em humanos, freqüentemente tem origem nutricional, ou seja é causada pela ingestão de dieta insuficiente em folatos. Idosos e pessoas dadas aos caprichos alimentares, cujas dietas carecem de verduras, ovos e carne, freqüentemente desenvolvem deficiência de AF. A deficiência pode também provir de uma complicação comum do intestino delgado, que interfere na absorção do folato dos alimentos e na circulação do AF pelo ciclo êntero-hepático. Há evidências de que o álcool e as doenças hepáticas interferem na absorção e metabolismo dos folatos. Mulheres grávidas e pacientes com anemia hemolítica têm maior necessidade de folatos e podem tornar-se deficientes, especialmente se suas dietas oferecerem quantidades marginais dessa vitamina (**Tabela 2**). Drogas que interferem na absorção, como os anticonvulsivantes, e os anticoncepcionais, ou no metabolismo de folatos podem levar a deficiência dessa vitamina. Nefropatas também desenvolvem deficiência de folatos, pois estes são removidos do plasma cada vez que os pacientes são dializados.

Tabela 2. Necessidades diárias de vitaminas hidrossolúveis, em destaque para os folatos.

Vitaminas Hidrossolúveis								
Categoria	Idade (anos) Condições	Vitamina C mg	Vitamina B₁ mg	Vitamina B₂ mg	Niacina (mg EN) ^a	Vitamina B₆ mg	Folato µg	Vitamina B₁₂ µg
Lactentes	0,0-0,5	30	0,3	0,4	5	0,3	25	0,3
	0,5-1,0	35	0,4	0,5	6	0,6	35	0,5
Crianças	1-3	40	0,7	0,8	9	1,0	50	0,7
	4-6	45	0,9	1,1	12	1,1	75	1,0
Homens	7-10	45	1,0	1,2	13	1,4	100	1,4
	11-14	50	1,3	1,5	17	1,7	150	2,0
	15-18	60	1,5	1,8	20	2,0	200	2,0
	19-24	60	1,5	1,7	19	2,0	200	2,0
	25-50	60	1,5	1,7	19	2,0	200	2,0
Mulheres	51+	60	1,2	1,4	15	2,0	200	2,0
	11-14	50	1,1	1,3	15	1,4	150	2,0
	15-18	60	1,1	1,3	15	1,5	180	2,0
	19-24	60	1,1	1,3	15	1,6	180	2,0
	25-50	60	1,1	1,3	15	1,6	180	2,0
Gestantes	51+	60	1,0	1,2	13	1,6	180	2,0
		70	1,5	1,6	17	2,2	400	2,2
Lactação	Primeiro semestre	95	1,6	1,8	20	2,1	280	2,6
	Segundo semestre	90	1,6	1,7	20	2,1	260	2,6

^a1 EN (equivalentes de niacina) é igual a 1 mg de niacina ou 60 mg de triptofano dietético.

Fonte: NAS - NCR (1989).

A deficiência de folatos pode causar também alterações no trato intestinal. Existem ainda pesquisas que apontam a relação entre a deficiência de congêneres de AF com doenças do coração, câncer de cólon, leucemia, doenças mieloproliferativas, certas enfermidades crônicas da pele, e outras doenças debilitantes crônicas. A deficiência de folatos gera um grande impacto sobre o sistema hematopoiético e a anemia megaloblástica é uma das várias doenças que acometem o sistema (BRODY,1991, CZEIZE, DUDAS, 1992, KATZUNG, 1994; ULENE,ULENE, 1995, OAKLEY *et al.*, 1995, CRANE *et al.*, 1995, DALY *et al.*, 1997, RANG *et al.*, 1997, MALINOW *et al.*, 1998, MOSHFEGH *et al.*, 1998). Pesquisas recentes apontam a deficiência materna de AF na ocorrência de malformações no tubo neural do feto (DALY *et al.*, 1997).

4. TOXIDEZ

O ácido fólico não apresenta grau de toxicidade comprovada, mesmo com doses elevadas de 15mg por dia, não há relatos de efeitos danosos ao organismo (ZANINI, OGA, 1994). Porém, em grandes quantidades pode mascarar a anemia ocasionada pela falta de cianocobalamina (vitamina B₁₂), mas não evita e nem alivia os defeitos neurológicos decorrentes da carência da mesma, podendo ocasionar danos irreparáveis ao sistema nervoso central. Tendo em vista os problemas causados quando AF mascara os efeitos da cianocobalamina, o Food and Drug Administration (FDA) recomendou que a concentração dos folatos fosse limitada em 1mg/dia ou menos para todos os produtos farmacêuticos e alimentícios (BRODY, 1991, ANNOTATION, 1994, KATZUNG, 1994; ZANINI, OGA, 1994, TUCKER *et al.*, 1996, RANG *et al.*, 1997).

5. FONTES DE FOLATOS

Os folatos são encontrados nos vegetais folhosos, carne, fígado, rim, frutas, cereais, leguminosas e em leveduras (BRODY, 1991, FRANCO, 1992).

Entretanto, o conteúdo de folatos apresentado nas tabelas de composição de alimentos e nos trabalhos científicos publicados na área apresentam grandes diferenças para o mesmo tipo de alimento (**Tabela 3**), isto, provavelmente, em virtude de diferentes técnicas analíticas empregadas na obtenção dos resultados e a fatores edafoclimáticos.

6. BIODISPONIBILIDADE E ESTABILIDADE

O ácido fólico (AF) pode ser considerado como o composto original de um grupo de folatos de ocorrência natural. O termo ácido fólico e folatos são trocados frequentemente, mas o AF é aproximadamente duas vezes mais bioativo do que os folatos (RUGGERI *et al.*, 1999, DANG *et al.*, 2000). Os folatos poliglutamatos são consideravelmente mais ativos do que os monoglutamatos. Para possuir atividade, o folato deve estar em sua forma tetraidro, na qual é

mantido pela enzima diidrofolato redutase. O ácido folínico, um ácido tetraidrofólico sintético, é convertido muito mais rapidamente para a forma de poliglutamato do que o AF.

Tabela 3. Teores de folatos em alimentos.

Alimentos	Folatos ($\mu\text{g/g}$ peso úmido)		
	BRODY (1991)	FRANCO (1992)	MARKS (1975)
Leite fresco de vaca	0,05-0,12	0,08	
Fígado cozido	10,7		
Fígado cru	1,41	1,20	0,3-1,50
Banana	0,28		
Ovo	1,4	0,80	0,04
Repolho cru	0,30		
Repolho cozido	0,16		
Queijo	0,20	0,16	
Vegetais verdes			0,09
Brócolos cru	1,69		
Brócolos cozido	0,65		
Brócolos	0,91	1,00	
Atum enlatado	0,15		
Batata			0-0,018
Tomate	0,06		
Laranja, suco	1,4	0,40	

Estudos recentes sugerem que o metiltetraidrofolato seja um cofator não muito eficaz para a formação de poliglutamatos, ao contrário do diidrofolato, do tetraidrofolato e do formiltetraidrofolato. O metiltetraidrofolato é a forma na qual os folatos costumam ser transportados no sangue e penetram na célula, é também uma forma funcionalmente inativa do folato. Existem evidências de que o substrato preferido para a síntese de poliglutamatos seja o formiltetraidrofolato e que a conversão de tetraidrofolato exija um doador de formatos, como a metionina (KATZUNG, 1994, ZANINI, OGA, 1994).

O AF é um composto cristalino amarelo pouco solúvel em água quando na forma ácida, porém mais solúvel na forma de sal, sensível ao oxigênio, a luz e a pH ácido e neutro, sendo estável em pH alcalino (Tabela 4) (BRUBACKER *et al.*, 1985, BÜHLER, 1988, BRODY, 1991, CARVALHO, 1996, RANG *et al.*, 1997).

Trabalhos mostram a ocorrência de perdas de folatos durante a cocção dos alimentos, sendo que variam de 50% (FRANCO, 1992) até 90% (KATZUNG, 1994). Assim como para outros nutrientes, estudos de perdas devido ao processamento devem ser analisados e avaliados com muito cuidado, já que os alimentos podem tanto perder como reter água. A armazenagem e outros processos também podem afetar a quantidade de folatos, porém os trabalhos científicos não citam números (BÜHLER, 1988, BRODY, 1991, FRANCO, 1992, CARVALHO, 1994, KATZUNG, 1994, ULENE, ULENE, 1995, TAMURA, MESSING, 1997).

Tabela 4. Estabilidade relativa das vitaminas.

Vitamina	Calor	pH Neutro	pH Ácido	pH Básico	Ar ou Oxigênio	Luz
Carotenos (Pro-A)	I	E	I	E	I	I
Vitamina A	I	E	I	E	I	I
Vitamina D	I	E	E	I	I	I
Vitamina E	I	E	E	E	I	I
Vitamina K	E	E	I	I	E	I
Vitamina B ₁	I	I	E	I	I	E
Vitamina B ₂	I	E	E	I	E	I
Vitamina B ₆	I	E	E	E	E	I
Vitamina B ₁₂	E	E	E	E	I	I
Biotina	I	E	E	E	E	E
Niacina	E	E	E	E	E	E
Ácido Pantotênico	I	E	I	I	E	E
Ácido Fólico	I	I	I	E	I	I
Vitamina C	I	I	E	I	I	I

I – Instável E – Estável.
Fonte: CARVALHO (1996).

7. ENRIQUECIMENTO DE ALIMENTOS

O ser humano hoje tem despendido cada vez menos tempo a sua alimentação, bem como também, não tem se preocupado com a qualidade dos alimentos consumidos diariamente.

O pouco tempo disponível para o preparo doméstico de alimentos aliado a necessidade de produtos com maior vida de prateleira vem alterando o hábito alimentar da população mundial que recorre cada vez mais aos produtos industrializados. Procurando compensar as perdas no processamento de alimentos ou mesmo com o intuito de reforçar o conteúdo nutritivo dos mesmos é que vem sendo feita a adição de vitaminas, aminoácidos e minerais aos alimentos.

O ácido fólico, forma mais estável entre os folatos, é o mais usado para o enriquecimento de vários produtos, tendo em vista os problemas ocasionados quando existe sua deficiência no organismo (DANG *et al.*, 2000).

O FDA nos USA, desde 1996, determinou que o AF deveria ser adicionado (140µg/100g) em produtos como cereais, incluindo a farinha, pão, cereais matinais, arroz e macarrão, normativa com efeito a partir de Janeiro de 1998 (CARVALHO, 1994, MOSHFEGH *et al.*, 1998). No Chile, está sendo desenvolvido um estudo para verificação dos verdadeiros efeitos do ácido fólico sobre as malformações congênitas, sendo que toda a população do país está ingerindo o ácido fólico através do enriquecimento da farinha de trigo (220µg/100g) destinada à fabricação de pães, tendo uma estimativa de consumo de 250g de pão/dia/pessoa. Este estudo deve ser concluído no final de 2002 (CASTILHA, 2000).

Os alimentos enriquecidos, juntamente com uma orientação nutricional, podem vir a solucionar o problema ocasionado pela dieta insuficiente de folatos, pois, é uma vitamina extremamente importante, porém pouco conhecida (TAMURA, MESSING, 1997).

8. MÉTODOS DE ANÁLISE PARA ÁCIDO FÓLICO E FOLATOS

Para assegurar a qualidade de produtos enriquecidos e para confirmar ou descobrir novas fontes de folatos é que são desenvolvidas as metodologias de identificação e quantificação de AF e folatos. Os métodos para a determinação dessas vitaminas podem ser agrupados em biológico, microbiológico, químicos, imunológicos e físicos (cromatográficos).

8.1 Métodos Biológicos

Os métodos biológicos avaliam os efeitos da suplementação de dietas pobres em folatos sobre as características e comportamentos fisiológicos de animais de laboratório, tais como reprodução, crescimento e estocagem no fígado.

O método biológico, utilizando frangos, foi o primeiro a ser desenvolvido por O' DELL, HOGAN (1943) para determinar a substância então conhecida como ácido fólico. Métodos utilizando ratos também foram desenvolvidos (GREGORY, 1985). Porém, são inevitavelmente demorados, dispendiosos e de baixa repetibilidade, hoje raramente utilizados. No entanto, os métodos biológicos são importantes ferramentas para o estabelecimento das vias bioquímicas dos folatos no organismo e das bioatividades das diferentes formas de folatos (HORNE, HOLLOWAY, 1997).

8.2 Métodos Microbiológicos

Em comparação com os métodos biológicos e químicos para determinação de vitaminas hidrossolúveis, as técnicas microbiológicas são mais reprodutíveis e precisas. Entretanto, muitos microrganismos podem sintetizar vitaminas a partir de certos precursores, porém, o uso de branco e fatores de correção podem melhorar a exatidão neste caso (AGOSTINI, 1996). Para a determinação de AF os métodos microbiológicos são melhores e geralmente mais aceitos oficialmente (GOLI, VADERSLICE, 1989, KELLY *et al.*, 1996, HORNE, HOLLOWAY, 1997, RADER *et al.*, 1998).

Os microrganismos que podem ser usados no método microbiológico para determinação de AF, incluem os gêneros de bactérias, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Pediococcus*, sendo que a bactéria mais utilizada para se determinar AF é o *Lactobacillus casei* (DAY, GREGORY III, 1981, DUCH *et al.*, 1983, WILSON e HORNE 1984, GOLI, VADERSLICE, 1989, KELLY *et al.*, 1996, HORNE, HOLLOWAY, 1997, OSSEYI *et al.*, 1998, RADER *et al.*, 1998, RUGGERI *et al.*, 1999), no entanto, não são métodos seletivos, respondendo igualmente as inúmeras formas de folatos. No método oficial 992.05, descrito na Association of Official Analytical Chemistry (CUNNIFF, 1997), bem como no Coopération Européenne dans le domaine de la recherche Science et Technique (BRUBACKER *et al.*,

1985), para a determinação de folatos é usado o *Lactobacillus casei* American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC) 7469.

Tanto os métodos microbiológicos quanto os biológicos não permitem a determinação simultânea das diferentes formas de folatos.

8.3 Métodos Químicos

Os métodos químicos são métodos muito criticados, principalmente pela falta de sensibilidade quando comparados aos métodos microbiológicos. Além disso, a influência de muitos interferentes acabam por comprometer a análise dos folatos. Os métodos químicos têm maior aplicação na purificação do AF e seus derivados, na determinação de concentrados vitamínicos e em produtos farmacêuticos. Existem técnicas empregadas cujo princípio baseia-se na reação do ácido fólico com permanganato, liberando ácido p-aminobenzóico (PABA) (KEAGY, 1985).

8.4 Métodos Imunológicos

As metodologias imunológicas podem também ser utilizadas para a determinação de AF. São métodos que, por sua vez, apresentam vantagens, como especificidade, rapidez e sensibilidade.

Existem duas técnicas para a determinação de AF. A primeira (radioimunoensaio) baseia-se na competição pela proteína ligante de folacina (FBP), porém esta técnica exige normas rigorosas de segurança e pessoas altamente capacitadas para realização dos ensaios, devido a manipulação de compostos radioativos, aumentando assim o custo do método (GREGORY, 1985). A segunda técnica se dá pelo método de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). O limite de detecção obtido por REICHERT, RUBACH (1991) para o AF foi de 1ng/mL, utilizando essa técnica. Contudo, muitas substâncias podem ser interferentes dos métodos imunológicos (RAUCH *et al.*, 1989, REICHERT, RUBACH, 1991).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

8.5 Métodos Cromatográficos

Entre os folatos existem compostos com diferentes bioatividades, (RUGGERI *et al.*, 1999), portanto, é necessário para uma determinação mais exata a separação e quantificação individual de cada composto, considerando-se a atividade de cada um deles. As técnicas cromatográficas se aplicam muito bem a essa finalidade.

A cromatografia em papel (CP) e a cromatografia em camada delgada (CCD) foram as primeiras técnicas aplicadas para a determinação de folatos, porém os métodos apresentam grandes dificuldades para realização, em especial, a quantificação. A cromatografia a gás (CG) não foi muito empregada na tentativa de determinação de folatos em alimentos, devido a baixa volatilidade e termoinstabilidade da vitamina limitando assim o uso (McCORMACK, NEWMAN, 1992).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) está sendo hoje a técnica mais empregada para a análise de folatos (DAY, GREGORY III, 1981, GREGORY *et al.*, 1984, SCHULZ *et al.*, 1985, WITTHÖFT, BITSCH, 1993, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, VAHTERISTO *et al.*, 1997a,b, KONINGS, 1999). As vantagens no uso da CLAE, para a determinação de vitaminas, incluem rapidez, alta sensibilidade e exatidão, além da melhor resolução na separação das diversas formas bioativas presente nos alimentos (GREGORY *et al.*, 1984, AGOSTINI, 1996).

Outra técnica, como a eletroforese capilar (GOMIS *et al.*, 1999) vem sendo desenvolvida para a determinação de todas as vitaminas do complexo B, incluindo o AF e vitamina C, em produtos farmacêuticos. Entretanto, é uma técnica bastante recente, hoje utilizada mais para fins de pesquisa, não estando ainda disponível na maioria dos laboratórios nacionais.

8.5.1 Métodos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A aplicação da CLAE na determinação de folatos em materiais biológicos e em alimentos ocorre de forma rápida, geralmente dependo da otimização da extração da amostra, da purificação e dos métodos de detecção para cada tipo de análise requerida (PARRISH, 1984, GREGORY, 1985, LUCOCK *et al.*, 1993, HOLLMAN *et al.*, 1993, LUCOCK *et al.*,

1995). FINGLAS et al. (1999) comparam vários procedimentos de extração, limpeza e condições cromatográficas para a análise de folatos, por CLAE, através de estudo interlaboratorial.

8.5.1.1 Extração

A determinação de vitaminas em alimentos envolve a extração de compostos complexos e frequentemente lábeis, em concentrações da ordem de parte por milhão (ppm) a partir de matrizes orgânicas complexas (AGOSTINI, 1996).

A extração de folatos com o uso de tampão fosfato na concentração de 0,075 até 0,1mol/L, adicionado de ácido ascórbico numa concentração de 0,1% até 2%, em pH variando de 4,5 até 7,4 foi a mais freqüente nos trabalhos revisados (DAY, 1981, GREGORY *et al.*, 1984, SCHULZ *et al.*, 1985, JACOB, HENRY, 1992, WITTHÖFT *et al.*, 1993, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, KONINGS, 1999). Tampão acetato, em substituição ao fosfato, também foi utilizado na extração em concentrações que variaram de 0,05 até 0,1mol/L (GREGORY et al. 1984, FARRAR *et al.*, 1992, WIGERTZ, JÄGERSTAD, 1995, STOKES, WEBB, 1999), bem como, em substituição ao ácido ascórbico, o ascorbato de sódio. (DAY, GREGORY III, 1981, GREGORY *et al.*, 1984). Mais recentemente, STOKES, WEBB (1999), VAHTERISTO et al. (1996) e RUGGERI et al. (1999), utilizaram o 2-mercaptoetanol, juntamente com o ácido ascórbico, para prevenir a oxidação dos folatos durante a extração.

Hidrólise enzimática para realização da extração dos folatos, utilizando plasma humano (HP) e pâncreas de porco (HK), com um tempo de reação de 3 horas a temperatura de 37°C, foi utilizada por GREGORY et al. (1984), SCHULZ et al. (1985), WITTHÖFT, BITSCH (1993), LUCOCK et al. (1995) e VAHTERISTO et al. (1996). A α -amilase foi empregada por OSSEYI et al. (1998) e RUGGERI et al. (1999).

8.5.1.2 Limpeza do extrato

O extrato proveniente do processo de extração deve apresentar-se livre de impurezas e interferentes e análogos biologicamente inativos (AGOSTINI,1996), no entanto, na prática,

trabalhando com alimentos isto se torna quase que impossível, necessitando de procedimentos de limpeza.

Procedimentos de limpeza, como a simples filtração (SCHULZ *et al.*, 1985) ou uso de centrifugação (OSSEYI *et al.*, 1998, RUGGERI, *et al.*, 1999, STOKES, WEBB, 1999) foram utilizados pelos pesquisadores na determinação de folatos em alimentos. O emprego do ácido tricloroacético, para a desproteíntização dos extratos, foi reportado por RUGGERI *et al.* (1999).

Métodos de extração em fase sólida utilizando colunas de troca iônica compostas por amina quaternária (SAX) foram largamente utilizados nos últimos anos, tanto para purificação como concentração de folatos (GREGORY *et al.* 1984, WITTHÖFT, BITSCH, 1993, WIGERTZ, JAGERSTAD, 1995, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, OSSEYI, 1998, KONINGS, 1999, STOKES, WEBB, 1999, CHO *et al.*, 2000). Cartuchos de Sep-pak C₁₈ foram utilizados com a mesma finalidade por STOKES, WEBB (1999). Normalmente, os cartuchos são condicionados com um solvente orgânico, ativados por uma solução tampão e carregados com amostra, segue-se uma etapa de lavagem e, finalmente, a eluição dos folatos (OSSEYI *et al.*, 1998, STOKES, WEBB, 1999).

RUGGERI *et al.* (1999) utilizaram colunas de bioafinidade, contendo proteína ligante de folatos (FBP), para purificação do extrato de salames, presunto, feijão e grão de bico.

8.5.1.3 Etapa Cromatográfica

a) Fase Móvel

Fases móveis (FM) tamponadas, com ou sem modificador orgânico, foram as mais utilizadas. Os modificadores orgânicos mais empregados foram metanol e acetonitrila (BRANFMAN, McCOMISH, 1978, DAY, GREGORY III, 1981, DUCH *et al.*, 1983, GREGORY *et al.*, 1984, WILSON, HORNE, 1984, GREGORY, 1985, SCHULZ *et al.*, 1985, HOLT *et al.*, 1988, FARRAR *et al.*, 1992, LUCOCK *et al.*, 1993, WITTHÖFT, BITSCH, 1993, BERG *et al.*, 1994, WIGERTZ, JAGERSTAD, 1995, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, VAHTERISTO *et al.*, 1997b, OSSEYI *et al.*, 1998, KONINGS, 1999, RUGGERI *et al.*, 1999, STOKES, WEBB 1999). O par iônico (PI) tetrabutilaminofosfatase (TBAP) foi utilizado em alguns trabalhos na composição da fase

móvel (DUCH *et al.*, 1983, SCHULZ *et al.* 1985, WITTHÖFT, BITSCH, 1993, OSSEYI *et al.*, 1998) resultando em picos bem mais simétricos e finos que os obtidos nos trabalhos sem a utilização do PI.

Na maioria dos trabalhos a eluição empregada foi do tipo isocrática (BRANFMAN, McCOMISH, 1978, DAY, GREGORY III, 1981, DUCH *et al.*, 1983, GREGORY, 1985, SCHULZ *et al.*, 1985, FARRAR *et al.*, 1992, LUCOCK *et al.*, 1993, WITTHÖFT, BITSCH, 1993, BERG *et al.*, 1994, WIGERTZ, JAGERSTAD 1995, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, OSSEYI *et al.*, 1998), enquanto que em menor escala a utilização de gradientes (GREGORY *et al.*, 1984, HOLT *et al.*, 1988, VAHTERISTO *et al.*, 1997a,b, KONINGS, 1999, RUGGERI *et al.*, 1999, STOKES, WEBB, 1999, CATHARINO, GODOY, 2000).

b) Fase Estacionária

Embora as colunas mais utilizadas para a separação de folatos foram as de fase reversa de octadecilsilano (C₁₈) (GREGORY *et al.*, 1984, SCHULZ *et al.*, 1985, FARRAR *et al.*, 1992, VAHTERISTO *et al.*, 1996, HURTADO *et al.*, 1997, KONINGS, 1999), DONG *et al.* (1988) utilizaram colunas de fase reversa C₈. LUCOCK *et al.* (1995) empregam coluna com fase ligada microporosa com grupamento fenil para a determinação de folatos em alimentos e fluidos biológicos. FINGLAS *et al.* (1999) utilizaram coluna com resina de poliácridamida estireno divinilbenzeno (PLRSP) na separação dos folatos em vegetais. Porém, dados de comparação entre os diferentes tipos de colunas utilizadas na separação de folatos, com relação a melhor eficiência, rapidez e resolução, não foram encontrados na literatura.

8.5.1.4 Sistema de Detecção

O detector mais empregado para métodos de determinação simultânea de folatos é o de fluorescência, em comprimentos de onda de excitação variando de 280 até 310nm, e de emissão de 352 até 372nm (FARRAR *et al.*, 1992, WITTHÖFT, BITSCH, 1993, JI *et al.*, 1995, WIGERTZ, JAGERSTAD, 1995, LUCOCK *et al.*, 1995). A tentativa de aumentar a fluorescência do ácido fólico, do tetraidrofolato e do diidrofolato fez com que DAY e GREGORY III (1981) e GREGORY *et al.*, (1984) desenvolvessem uma reação de oxidação

pós-coluna, com hipoclorito de sódio e cloridina, para quebrar o ácido fólico, o tetraidrofolato e o diidrofolato em produtos pteridínicos, que possuem números de hidrogênio diferentes nos anéis, resultando em substâncias que apresentam maior fluorescência.

A detecção por absorção na região do ultra-violeta (UV) já foi utilizada em maior escala para detecção de folatos, hoje continua sendo usada para a detecção de AF, sendo que os comprimentos de onda variam de 254 a 290nm (WILLS *et al.*, 1977, BRANFMAN, McCOMISH, 1978; DAY, GREGORY, 1981, SCHULZ *et al.*, 1985, HORNE, HOLLOWAY 1997, HOLT *et al.*, 1988, BERG *et al.*, 1994, OSSEYI *et al.*, 1998), com a evolução para o uso de detectores de arranjo de diodos (DAD), que permitem, além da detecção a obtenção de parâmetros para a identificação (KONINGS, 1999). GREGORY *et al.* (1984), VAHTERISTO *et al.* (1996) e RUGGERI *et al.* (1999) utilizaram detectores em série de fluorescência e UV para a determinação de folatos e ácido fólico, respectivamente.

Detectores eletroquímicos foram empregados para análise de folatos em fluidos biológicos e alimentos por LUCOCK *et al.* (1993) e BAGLEY, SELHUB (2000). LUCOCK *et al.* (1995) utilizaram três detectores em série, eletroquímico, de fluorescência e UV com arranjo de diodos, para a determinação de folatos e recomendaram que a detecção do sinal do AF fosse feita no UV e para os demais folatos qualquer um dos três detectores, dependendo do folato a ser determinado. STOKES, WEBB (1999) utilizaram detector de massas (MS) para determinação e confirmação de folatos em complexos vitamínicos, carnes, vegetais e cereais matinais.

8.5.1.5. Identificação

A identificação dos folatos, na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, foi feita por comparação do tempo de retenção do composto presente na amostra com o tempo de retenção do padrão e por co-cromatografia (WILLS *et al.*, 1977; BRANFMAN, McCOMISH, 1978, GREGORY *et al.*, 1984, SCHULZ *et al.*, 1985, FARRAR *et al.*, 1992, WITTHÖFT, BITSCH, 1993, WIGERTZ, JAGERSTAD, 1995, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, VAHTERISTO *et al.*, 1997a). Um dos problemas nesse tipo de identificação é que o tempo de retenção varia de uma matriz alimentícia para outra, podendo diferir dos compostos vitamínicos puros. O perfil do espectro de absorção obtido no DAD, além do tempo de

retenção e da co-cromatografia, foi utilizado por KONINGS (1999) para identificação dos folatos. Técnicas mais sofisticadas foram aplicadas por STOKES, WEBB (1999), onde os folatos foram confirmados através da espectrometria de massas acoplada ao cromatógrafo a líquido.

8.5.1.6. Quantificação

A quantificação, em todos os trabalhos revisados, foi feita através da construção de curvas analíticas por padronização externa, utilizando a área ou a altura dos picos (GREGORY *et al.*, 1984, SCHULZ *et al.*, 1985, FARRAR *et al.*, 1992, WITTHÖFT, BITSCH, 1993, WIGERTZ, JAGERSTAD, 1995, LUCOCK *et al.*, 1995, VAHTERISTO *et al.*, 1996, VAHTERISTO *et al.*, 1997a,b, OSSEYI *et al.*, 1998, KONINGS, 1999, RUGGERI *et al.*, 1999).

9. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

A validação de uma metodologia visa assegurar que o método utilizado seja adequado ao que se propõe identificar e/ou quantificar, podendo-se empregar diferentes procedimentos em função do objetivo da análise (ARAUJO, 1995, CHASIN *et al.*, 1998). A qualidade e a credibilidade de um trabalho analítico se fundamentam nos cuidados com os quais o analista se cerca para produzir dados que expressem o valor real da medida obtida (CHASIN *et al.*, 1998).

Existem diferentes formas de conduzir a validação (TANNER *et al.*, 1993, FINGLAS *et al.*, 1999) e vários procedimentos estatísticos são utilizados com essa finalidade (YOUNDEN, 1982, WERMINONT, 1985, TAYLOR, 1987, MILLER, MILLER, 1988, CAULCUTT, BODDY, 1993). Apenas poucos trabalhos foram encontrados com tal preocupação, entre eles destacam-se os desenvolvidos por FINGLAS *et al.* (1999) e KONINGS (1999) que foram os únicos a utilizarem materiais de referência certificados (misturas de vegetais (CRM 485), fígado de porco (CRM 487) e farinha de milho (CRM 121)).

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, T.S. **Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B1, B2, B6, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos.** Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 1996.
- ALVAREZ, M.A. **Bioquímica da nutrição vitaminas, fibras e minerais.** 1ed. Editora Plêiade, São Paulo, 1997.
- ANNOTATION, how do we get enough folic acid to prevent some neural tube Defects. **American Journal of Public Health, 84** (3): 348-350, 1994.
- ARAUJO, Y. **Apoio estatístico para qualidade analítica.** ILSI – ITAL, Campinas, 1995.
- BAGLEY, P.J., SELHUB J. Analysis of folate form distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrochemical detection. **Clinical Chemistry, 46** (3): 404-411, 2000.
- BERG, H.V., FINGLAS P.M., BATES, C. Flair intercomparisons on serum and red cell folate. **International Journal Vitamins Nutrition, 64:** 288-293, 1994.
- BRANFMAN, A. R., McCOMISH, M. Rapid separation of folic acid derivates by paired-ion high-performace liquid chromatography. **Journal of Chromatography, 151:** 87-89, 1978.
- BRODY, T. Folic Acid In: MACHLIN L.J. **Handbook of vitamins.** 2ed. rev. and Expanded. NewYork: Marcel Dekker, 1991.
- BRODY T. **Nutritional biochemistrtry.** United Kingdom. Honolulu, Hawaii: Academic Press Limited, 1994.
- BRUBACKER, G., MULLER-MULLOT, W., SOUTHGATE, D.A.T. **Methods for the Determination of Vitamins in Food, Recommended by COST 91,** Elsevier Applied Science Publishers, New York, 1985.
- BÜHLER, V. **Vademecum for Vitamin Formulations,** Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1988.
- CARVALHO, P.R.N. **Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos.** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1994.
- CARVALHO, P.R.N. **Segundo seminário sobre alimentos enriquecidos.** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996.
- CRANE, N.T., WILSON, D.B., COOK, D.A., LEWIS, C.J., YETLEY, E.A., RADER, J.I. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **American Journal of Public Health, 85** (5): 660-666, 1995.
- CUNNIFF, P. (Ed) **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 17ed AOAC International, Gaithersburg, Maryland, 1997.
- CZEIZE, A.E., DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by perioconceptional vitamin supplementetion. **New England Journal of Medicine, 327** (26): 1832-1835, 1992.
- DALY, S., MILLS, J.R., MOLLOY, A.M., CONLEY, M., LEE, Y.J., KIRKE P.N., WEIR, D.G., SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet, 350** (9092): 1666- 1669, 1997.
- FOLIC ACID fortification, **Nutrition- Reviews, 54** (3): p.94-95, 1996.

- FINGLAS, P.M., WIGERTZ, K., VAHTERISTO, L., WITTHÖFT, C., SOUTHON, S., FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**, **64**: 245-255, 1999.
- FOOD DRUG ADMINISTRATION – Portaria, 1996.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
- GOLI, D.M., VADERSLICE J.T. Microbiological assay of folacin using a CO₂ analyzer system. **Journal of Micronutrient Analysis**, **6** (1): 19-33, 1989.
- GOMIS, D.B., GONZALES, L.L., ÁLVAREZ, D.G. Micelar electrokinetic capillary chromatography analysis of water-soluble vitamins. **Analytica Chimica Acta**, **396** (1): 55-60, 1999.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1991.
- GREGORY III, J.F., SARTAIN, D.B., DAY, B.P. Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. **Journal Nutrition**, **114**: 341-353, 1984.
- GREGORY, J.F. Folacin II In: AUGUSTIN J.; KLEIN, B.P.; BECKER, D.; VENUGOPAL, P.B. **Methods of vitamin assay**. 4ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1985.
- HOLLMAN, P.C., SLANGE, J.H., WAGSTAFFE, J.P., FAURE, U., SOUTHGATE, D.A.T., FINGLAS, P.M. Intercomparison of methods for the determination of vitamins in food. **Analyst**, **118**: 481-488, 1993.
- HOLT, D.L., WEHLING, R.D., ZEECE, M.G. Determination of native folates in milk and other dairy products by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, **449**: 271-279, 1988.
- HORNE, D.W., HOLLOWAY R.S. Compartmentation of folate metabolism in rat pancreas: nitrous oxide inactivation of methionine synthase leads to accumulation of 5-methyltetrahydrofolate in cytosol. **Journal of Nutrition**, **127** (9): 1772-1775, 1997.
- HURTADO, S.A., NOGUES, M.T.V., PULIDO, M. I., FONT, A.M. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, **778** (2): 247-253, 1997.
- JACOBY, B.T., HENRY, F.T. Liquid chromatographic determination of folic acid in infant formula and adult medical nutritional supplements. **Journal of Association of Official Agricultural Chemists International**, **75** (5): 891-898, 1992.
- JL, A.J., SAVON, S.R., JACOBSEN, D.W. Determination of total serum sulfite by hplc with fluorescence detection. **Clinical Chemistry**, **41** (6): 897-903, 1995.
- KATZUNG B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- KEAGY, P.M. Folacin I In: AUGUSTIN J., KLEIN, B.P., BECKER, D., VENUGOPAL, P.B. **Methods of vitamin assay**. 4ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1985.
- KELLY, P., MCPARTLIN J., SCOTT J.A. combined high-performance-liquid chromatographic-microbiological assay for serum folic acid. **Analytical Biochemistry**, **238** (2): 179-183, 1996.
- KONINGS, E.J.M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. **Journal of Association of Official Agricultural Chemists International**, **82** (1): 119-127, 1999.
- LUCOCK, M.D., GREEN, M., HARTLEY, M., LEVENE, I. Physicochemical and biological factors influencing methylfolate stability: use of dithiothreitol for HPLC analysis with electrochemical detection. **Food Chemistry**, **47**: 79-86, 1993.

- LUCOCK, M.D., GREEN, M., PRIESTNALL, M., DASKALAKIS, I., LEVENE, H.M.I. Optimisation of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. **Food Chemistry**, **53**: 329-338, 1995.
- MARKS, J. **A guide to the vitamins their role in health and disease** 1ed. Great Britain. St Leonard's House Lancaster, England, 1975.
- MALINOW, M.R., DUELL, P.B., HESS, D.L., ANDERSON, P.H., KRUGER, W.D., PHILLIPSON, B.E., GLUCKMAN, R.A., BLOCK, P.C., UPSON, B.M. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with Folic acid in patients with coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, **338** (15): 1009-1015, 1998.
- McCORMACK, J.J., NEWMAN, R.A. Chromatographic studies of folic acid and Related Compounds In: De LEENHEER, A.P.; LAMBERT, W.E.; NELIS, H.J. **Modern chromatographic analysis of vitamins**. **30**. 1ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1992.
- MILLER, J.C., MILLER, J.M. **Statistic for analytical chemistry**. 2ed. Horwood. p 117, 1988.
- MOSHFEGH A.J., COOK A.J., HO J.W., FRIDAY, J.E. Folate intakes. **Food Surveys Research Group**. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.
- NAS-NCR. National Research Council, National Academy of Science (1989). **Recommended Dietary Allowances**. 10th Ed. National Academy Press, Washington, 283p.
- O'DELL, B.L., HOGAN, A.G. Additional observations on the chick anti-anemia vitamin. **Journal Biologic Chemistry**, **149**, 323, 1943.
- OAKLEY, G.P.Jr.; ERICKSON, J.D.; ADAMS, M.J. Urgent need to increase folic acid consumption. **Journal of the American Medical Association**, **274** (21): 1717-1718, 1995.
- OSSEYI, E.S., WEHLING, R.L., ALBRECHT, J.A. Liquid chromatographic method for determination added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, **826** (2): 235-240, 1998.
- PARRISH, D.B. Recent developments in chromatography of vitamins in foods And feeds In: LAWRENCE, J.F. **Food constituents and food residues Their chromatographic determination**. 2ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1984.
- RADER, J.I., WEAVER, C.M., AGYAL G. Use of microbiological assay with tri-enzyme extration for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. **Food Chemistry**, **62** (4): 451-465, 1998.
- RANG, H. P., RITTER, J. M., DALE, M. M **Farmacologia**. 3.ed Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.
- RAUCH, P., KAS, J., STREJCEK, F.; CERNA, J. Radioassay of folacin in foodstuffs. **Journal of Foods Biochemistry**, **13** (1): 21-29, 1989.
- REICHERT, N., RUBACH, K. Determination of biotin and folic acid in vitamin-enriched foods by competitive binding protein assay and ELISA. **Deutsche-Lebensmittel Rundschau**, **87** (11): 341-345, 1991.
- TAYLOR, J.K; **Quality assurance of chemical measure ments**. 2ed. Chelsea,1987.
- TUCKER, K.L., MAHNKEN, B., WILSON, P.W.F., JACQUES, P., SELHUB, J. Folic acid fortification of the food supply. Potential benefits and risks for the Elderly population. **Journal of the American Medical Association**, **276** (23): 1879-1885, 1996.
- ULENE A., ULENE V. **Vitaminas** . 1ed. Blumenau: EKO, 1995.
- VAHTERISTO, L.T., OLLILAINEN, V., KOIVISTOINEN, P.E., VARO P. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performace liquid chromatography. **Journal Agriculture Food Chemistry**, **44** : 477-482, 1996.

- VAHTERISTO, L.T., OLLILAINEN, V., VARO P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg, and dairy products consumed in Finland. **Journal of AOAC International**, **80** (2): 373-378, 1997 a.
- VAHTERISTO, L.T., OLLILAINEN, V., VARO P. Application of HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland, **Food Chemistry**, **59** (4.): 589-597; 1997 b.
- WERMINONT, G.T. **Use of statistic to develop and avaluate analytical methods**. AOAC, Virginia. p 183, 1985.
- WIGERTZ, K., JÄGERSTAD, K. Comparison of a HPLC and radioprotein-biding assay for the determination of folates in milk and blood samples, **Food Chemistry**, **54** (4): 429-436, 1995.
- WILLS, R.B.H., SHAW, C.G., DAY, W.R. Analysis of water soluble vitamins by high pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, **15**: 262-266, 1977.
- WILSON, S.D., HORNE, D.W. High-performance liquid chromatographic determination of the distribution of naturally occurring folic acid derivatives in rat liver, **Analytical Biochemistry**, **142**: 529-535, 1984.
- WITTHÖFT, C., BITSCH, I. HPLC, methods to analyse folate pattern in food and in human plasma as a precondition to evaluate availability of food folates by biokinetic methods. In: **Bioavailability '93, nitritional, chemical and food processing implications of nutrient availability (Part II)**.p. 426-439, 1993.
- YOUNDEN, W.J. – Statistical techniques for collaboratives test In: **Statistical Manual of the AOAC**. 3ed .Arlington. p 88, 1982.
- ZANINI, A.C., OGA, S. **Farmacologia aplicada**. 5ed. São Paulo: Atheneu, 1994.



CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS POR CLAE

Trabalho a ser submetido à revista **Química Nova**

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS POR CLAE

Catharino, Rodrigo Ramos ; Godoy, Helena Teixeira
Depto. Ciências de Alimentos–Fac. de Engenharia de Alimento–UNICAMP–SP–Brazil
CP – 6121 CEP – 13083-970
e-mail: robit@bol.com.br

Resumo

Pouca atenção se deu ao ácido fólico, especialmente em alimentos, isso devido às dificuldades de determinação, ocasionadas pelas baixas quantidades que o analito se encontra, e da presença de interferentes provenientes das matrizes complexas. No entanto, a importância que foi atribuída ao ácido fólico recentemente, em virtude de sua ação benéfica ao homem, tem aumentado o interesse dos pesquisadores por esta vitamina. Conseqüentemente, aumentou a preocupação dos analistas em desenvolver metodologias apropriadas para a determinação do ácido fólico em alimentos enriquecidos ou não com esta vitamina e o controle do mesmo em alimentos enriquecidos. Dentro desse panorama, o objetivo deste trabalho foi de avaliar algumas condições experimentais na determinação de ácido fólico, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em leites enriquecidos. Utilizando coluna de fase reversa (C₁₈), foram testados 35 diferentes sistemas de eluição isocrática e 11 por gradiente. Os perfis cromatográficos foram monitorados em quatro diferentes comprimentos de onda. Foram realizados estudos sobre a estabilidade das soluções-padrão de AF utilizadas na quantificação. Em relação às etapas pré-cromatográficas, foram avaliadas 15 soluções extratoras. Os procedimentos de extração com soluções alcalinas, pH acima de 7.0, forneceram os melhores resultados. As melhores condições de análise foram obtidas com eluição por gradiente, a vazão de 0,5 mL/min, utilizando 10% de acetonitrila e 90% de fase aquosa tamponada (ácido acético 0,166mol/L; hidróxido de potássio 0,01mol/L; pH 2,8) no início da corrida, fazendo um gradiente até oito minutos e meio (8,5min) chegando em 24% de acetonitrila e 76% de fase aquosa

tamponada, permanecendo esta concentração até nove minutos (9min) de corrida. A detecção do ácido fólico foi feita na região do ultra-violeta, a 290nm, em consequência da menor interferência dos constituintes da matriz. A quantificação foi feita por padronização externa, sendo que o padrão de ácido fólico, dissolvido em tampão fosfato (pH6,5) e mantido a 4°C, pode ser utilizado por até 30 dias.

Abstract

Not a close attention had been paid to folic acid, particularly in foods, and that is due to some difficulties of determination caused by low quantities in substance and by the presence of interferents proceeding from complex matrixes. However, the interest of researchers on this vitamin has increased because of the recent importance granted to folic acid, in view of its healthy action towards man, and consequently the concern of analysts to develop appropriate methodologies for folic acid determination in enriched or non-enriched foods and the control this vitamin in enriched foods. In this landscape, the objective of this research was to evaluate some experimental conditions in the determination of folic acid, by high performance liquid chromatography (HPLC), in enriched milks. Using a reverse-phase column (C₁₈), were evaluated 35 different isocratic and 11 gradient elution. Detection was at four different wavelengths. Studies were carried out about the stability of the AF standard solutions employed in the quantification. In relations a pre-chromatographic step, were available 15 solutions of extraction. The best results were obtained using an extraction procedure with alkaline solution, pH above of 7.0. The best conditions of analysis were obtained with gradient elution, flow rate of 0,5mL/min, using 10% acetronitrile plus 90% buffer aqueous phase (acetic acid 0,166mol/L; potassium hydroxide 0,01mol/L; pH 2,8) in the start, changing to 24% acetonitrile plus 76% buffer aqueous phase after 8,5minutes, remaining this conditions until mine minutes (9,0min) of run. Detection of folic acid was obtained in the ultraviolet region, at 290nm, due low presence of interfering substances. Quantification by means of an external standard curve. The folic acid standard dissolved in phosphate buffer (pH 6,5), under refrigeration (4°C), can to be used during 30 days.

INTRODUÇÃO

O enriquecimento de alimentos com ácido fólico (AF) tem sido incentivado na última década devido, principalmente, a trabalhos que demonstraram uma possível relação da vitamina com as doenças que acometem o tubo neural do feto, isto é as malformações congênitas, que podem ser ocasionadas pela carência de ácido fólico na alimentação de gestantes (CZEIZE e DUDAS, 1992; ANNOTATION, 1994; DUFF e COOPER, 1994; CRANE et al., 1995; SERBANESCU et al., 1996; DALY et al., 1997; LOCKSMITH e DUFF, 1998). Os produtos escolhidos para o enriquecimento com ácido fólico nos EUA são principalmente os cereais matinais, as farinhas e o macarrão, entre outros (ANNOTATION, 1996; TAMURA e MESSING, 1997). No Brasil, o processo de enriquecimento de alimentos com AF vem incluindo uma ampla variedade de produtos, em especial os lácteos.

A importância de métodos analíticos apropriados que garantam os níveis de enriquecimento nos produtos é uma preocupação, que deve ser encarada como fator essencial para oferecer a população as quantidades estipuladas nos rótulos dos produtos para benefício comum de todos. Entretanto, a determinação de ácido fólico apresenta muitos desafios, mesmo com a utilização de técnicas sofisticadas como é o caso da cromatografia líquida de alta eficiência, os quais incluem o melhoramento nos procedimentos de extração, limpeza e condições cromatográficas mais simples.

Há poucos trabalhos sobre o desenvolvimento de metodologias para análise de AF em produtos alimentícios (OSSEYI et al., 1998; RADER et al., 1998), a maioria das pesquisas foram conduzidas para a determinação de folatos (FARRAR et al., 1992; LUCOCK et al., 1993; BERG et al., 1994; WIGERTZ e JAGERSTAD, 1995; LUCOCK et al., 1995; VAHTERISTO et al., 1997). Geralmente no processo de extração é feita uma hidrólise alcalina, em virtude do aumento da estabilidade e solubilidade do ácido fólico, para romper os complexos proteicos, seguida de hidrólise enzimática para converter os folatos poliglutâmicos à forma monoglutâmica (BERG et al., 1994; WIGERTZ e JAGERSTAD 1995; OSSEYI et al., 1998; RADER et al., 1998). A extração, além de constituir uma das etapas mais importantes na determinação de ácido fólico em alimentos, é também a maior fonte de erro na determinação da vitamina (HOLLMAN et al. 1993; GREGORY e SARTAIN, 1991).

Precipitação com ácido tricloroacético e técnicas de extração em fase sólida, tem sido utilizados como procedimentos de limpeza dos extratos para a determinação de folatos (RUGGERI et al., 1999).

As colunas cromatográficas mais utilizadas para a separação analítica de folatos é a de fase reversa, embora colunas de PLRSP (poliacrilamida estireno divinilbenzeno) e com grupamento fenil também terem sido empregadas por FINGLAS et al. (1999) e LUCOCK et al. (1995), respectivamente. As fases móveis empregadas na determinação de folatos não possuem grandes variações, sendo compostas basicamente de um modificador orgânico, metanol ou acetonitrila, e uma solução aquosa tamponada (FARRAR et al., 1992; LUCOCK et al., 1993; BERG et al., 1994; WIGERTZ e JAGERSTAD, 1995; LUCOCK et al., 1995; VAHTERISTO et al., 1997). A adição de par iônico à fase móvel foi utilizada apenas por DONG, et al. (1988) e OSSEYI et al. (1998).

A detecção do ácido fólico é realizada por absorção na região do ultra-violeta (BRANFMAN e McCOMISH, 1978; OSSEYI et al., 1998), enquanto que para os folatos a preferência é utilizar a fluorescência (GREGORY et al., 1984; FARRAR et al., 1992; WIGERTZ e JAGERSTAD, 1995). Alguns autores utilizaram esses dois detectores em série para a determinação simultânea de AF e folatos (VAHTERISTO et al., 1996; VAHTERISTO et al., 1997; FINGLAS et al., 1999; KONINGS, 1999). CATHARINO e GODOY (2000) observaram que para concentrações baixas de ácido fólico ($\pm 20\mu\text{g}/100\text{g}$) é possível a detecção utilizando o detector de fluorescência, porém nenhum sinal foi registrado com concentrações maiores.

A identificação dos folatos, na maioria dos trabalhos publicados foi feita apenas por comparação com o tempo de retenção dos padrões e por co-cromatografia (FARRAR et al., 1992; LUCOCK et al., 1993; BERG, 1994; WIGERTZ e JAGERSTAD, 1995; LUCOCK et al., 1995; VAHTERISTO et al., 1997; OSSEYI et al., 1998). KONINGS. (1999) utilizou para a identificação os espectros de absorção fornecidos pelo detector de arranjo de diodos. A quantificação foi feita por padronização externa (FARRAR et al., 1992; LUCOCK et al., 1993; BERG et al., 1994; WIGERTZ e JAGERSTAD, 1995; LUCOCK et al., 1995; VAHTERISTO et al., 1997; OSSEYI et al., 1998; KONINGS, 1999).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo avaliar algumas etapas analíticas para a determinação de ácido fólico, por CLAE, em leites enriquecidos, visando conhecer melhor o efeito de alguns parâmetros nessa determinação.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

A amostra de leite em pó enriquecida com ácido fólico foi adquirida em supermercado da cidade de Campinas, SP.

O padrão de ácido fólico foi cedido pela M. CASSAB Comércio e Indústria LTDA, Santo Amaro, SP, Brasil. (SIGMA cód. F-7876, lote 40H321). Acetonitrila e metanol, ambos grau cromatográfico, ácido tricloroacético, fosfato de potássio monobásico, ácido acético glacial, ácido fosfórico, grau de pureza analítico, foram adquiridos da Merck, Brasil. Da Synty foram utilizados o acetato de sódio e sódio fosfato dibásico anidro, grau de pureza analítico, e da SIGMA Chemicals Co (USA) o fosfato de potássio dibásico. A água utilizada no preparo das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros fluoropore (FHLP 04700 MILLIPORE), com poros de 0,45µm de diâmetro. Foi utilizada uma coluna Microsorb ODS-2, 5µm, 150X4,6mm d.i.(Rainin Instrument Company), protegida por coluna de guarda Bondesil, 5µm, 10X4,6mm d.i. (Varian).

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a líquido HP (HEWELETT-PACKARD) modelo 1100, com degaseificador, bomba quaternária, sistema de injeção automática (0 a 100µL), detectores de UV-Visível com arranjo de diodos e de fluorescência. Todo o sistema é controlado pelo programa HP-Chemstation, que também gerencia o sistema de aquisição e tratamento de dados.

MÉTODOS

a) Avaliação da composição da fase móvel e sistema de eluição

A composição da fase móvel foi avaliada verificando-se a influência da presença de cada reagente, ou de variações nas concentrações dos mesmos, em sistemas de eluição

isocrática e por gradiente, sobre soluções padrão de AF e amostra de leite em pó enriquecido. Os modificadores orgânicos, metanol e acetonitrila, foram testados em diferentes concentrações, mantendo-se constantes os outros componentes da fase móvel. A influência dos tampões fosfato e acetato, como componentes da fase móvel, também foi avaliada, assim como a influência das concentrações hidrogeniônicas. Neste caso, os valores de pH foram ajustados com a adição de HCl (1mol/L) e KOH (1mol/L). A Tabela 1 resume todas as fases móveis e sistemas de eluição utilizadas neste trabalho.

b) Avaliação dos processos de limpeza do extrato e de extração

Para a avaliação dos procedimentos de clarificação do extrato, este foi preparado com 1,0g de leite em pó enriquecido e o AF extraído com 3mL de KOH (0,1mol/L) em banho ultra-sônico por 10 minutos e, imediatamente após, foi submetido aos procedimentos de clarificação, apresentados a seguir. Os mesmos procedimentos foram repetidos paralelamente com soluções padrão de ácido fólico.

(a) extrato + H_3PO_4 (0,1mol/L) qsp 10mL

(b) extrato + etanol qsp 10mL

(c) extrato + acetonitrila qsp 10mL

(d) extrato + 3mL de H_3PO_4 (0,1mol/L) + tampão fosfato Na_2HPO_4 (0,25M)/ KH_2PO_4 (0,37M) qsp 10mL

(e) extrato + 3mL de H_3PO_4 (0,1mol/L) + 350 μ L de ác. tricloroacético + tampão fosfato Na_2HPO_4 (0,25M)/ KH_2PO_4 (0,37M) qsp 10mL

Após os tratamentos, os extratos foram filtrados em membrana durapore (HVLP, 01300, MILLIPORE), com poros de 0,45 μ m, e injetados no cromatógrafo, utilizando as melhores condições obtidas no item a.

A extração foi realizada em duplicata, com 1,0g de leite em pó enriquecido. Todos os procedimentos foram conduzidos a temperatura ambiente (27°-30°C). Em todas as situações foram utilizados 3mL de solução extratora, que permaneceram em contato com a amostra sempre por 10 minutos, com ou sem a utilização de banho ultra-sônico.

Tabela 1. Composição das fases móveis nos sistemas de eluição utilizados para a determinação da ácido fólico em leite.

Sistema de Eluição Isocrático			
Fase móvel	(v/v)	tr (min)	tc (min)
Água		-	30
Metanol		-	30
Acetonitrila		-	30
Água/ Metanol	10:90	-	30
Água/ Metanol	15:85	-	30
Água/ Metanol	30:70	-	30
Água/ Acetonitrila	10:90	-	30
Água/ Acetonitrila	12:88	-	30
Água/ Acetonitrila	20:80	-	30
Tampão fosfato		-	30
Tampão acetato		-	30
Tampão fosfato/ Metanol	90:10	20	30
Tampão fosfato/ Metanol	85:15	15	20
Tampão fosfato/ Metanol	75:25	8	15
Tampão fosfato/ Metanol	70:30	6	10
Tampão fosfato/ Metanol	65:35	5	10
Tampão fosfato/ Acetonitrila	95:5	15	20
Tampão fosfato/ Acetonitrila	90:10	8,5	15
Tampão fosfato/ Acetonitrila	88:12	7,5	15
Tampão fosfato/ Acetonitrila	85:15	7,4	15
Tampão fosfato/ Acetonitrila	80:20	3,5	10
Tampão fosfato/ Acetonitrila	78:22	3,4	10
Tampão fosfato/ Acetonitrila	76:24	2,5	10
Tampão acetato/ Metanol	90:10	20,4	30
Tampão acetato / Metanol	85:15	14,9	20
Tampão acetato / Metanol	75:25	8,1	15
Tampão acetato / Metanol	70:30	6,2	10
Tampão acetato / Metanol	65:35	4,8	10
Tampão acetato / Acetonitrila	95:5	15	20
Tampão acetato / Acetonitrila	90:10	8,4	15
Tampão acetato / Acetonitrila	88:12	7,7	15
Tampão acetato / Acetonitrila	85:15	7,3	15
Tampão acetato / Acetonitrila	80:20	3,2	5
Tampão acetato / Acetonitrila	78:22	3,1	5
Tampão acetato / Acetonitrila	76:24	2,2	5
Sistema de Eluição por Gradiente			
Tampão acetato / Acetonitrila (v/v)		tr (min)	tc (min)
Início 90:10 chegando a 76:24 em 4,5		5,5	6
Início 90:10 chegando a 76:24 em 5,5		5,8	6,5
Início 90:10 chegando a 76:24 em 7,5		7,3	8
Início 90:10 chegando a 76:24 em 8,5		8,3	9
Início 90:10 chegando a 76:24 em 9,0		8,4	9
Início 90:10 chegando a 76:24 em 10,5		8,7	11
Início 90:10 chegando a 76:24 em 11,5		8,9	12
Início 90:10 chegando a 76:24 em 12,0		9	12,5
Início 90:10 chegando a 76:24 em 15,0		9,1	15,5
Início 90:10 chegando a 76:24 em 16,0		9,3	16,5
Início 90:10 chegando a 76:24 em 17,0		9,3	17,5

tr- tempo de retenção do ácido fólico; tc- tempo de corrida; - AF não eluiu durante a corrida.

Foram testados alguns solventes e várias soluções, desde água até soluções ácidas e tampões. A composição das soluções é descrita em anexo aos resultados apresentados (Tabela 2).

c) Detecção e identificação

Os picos foram detectados, através de detector de arranjo de diodos, em quatro diferentes comprimentos de onda, 280, 285, 290 e 295 nm, bem como no detector de fluorescência (excitação a 280nm e 360nm de emissão), ligado em série. A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros de absorção obtidos nos dois detectores. O grau de pureza do pico referente ao ácido fólico foi avaliado pelos espectros de pureza e pelo sistema de plotter, fornecidos pelo programa HP-Chemistation.

d) Avaliação da estabilidade do padrão

A curva analítica de padronização externa foi construída com 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7mL e uma solução padrão contendo 100µg/100mL de ácido fólico. As alíquotas foram diluídas para 10mL com tampão fosfato Na_2HPO_4 (0,25mol/L)/ KH_2PO_4 (0,37mol/L), as soluções foram filtradas em membrana durapore (HVLP 01300 MILLIPORE) e injetados no cromatógrafo, utilizando as melhores condições obtidas no item a.

A estabilidade do padrão de AF foi avaliada variando-se algumas condições como:

- substância escolhida para dissolução do padrão: água e tampão fosfato.
- exposição a luz fria do laboratório por 20, 30 e 60 minutos.
- exposição a diferentes temperaturas de 25° a 70°C.

Após os tratamentos as soluções foram imediatamente injetadas no cromatógrafo, nas mesmas condições utilizadas anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

a) Fase móvel e sistema de eluição

Fases móveis compostas apenas por água, tampão acetato (0,166mol/L) ou tampão fosfato (0,33mol/L) não foram suficientes para eluir o padrão de ácido fólico, surgindo a necessidade da adição de um modificador orgânico. A adição de acetonitrila (ACN) ou metanol (MEOH) em água pura não apresentou nenhum efeito. Já a adição desses modificadores, mesmo em concentrações baixas, nos dois tampões estudados resultaram na eluição do AF. Porém, para uma eluição mais rápida necessitou-se de concentrações maiores desses solventes orgânicos (**Figura 1**), sendo que a acetonitrila provocou maior influência na retenção da vitamina, por unidade de concentração na fase móvel, do que o metanol. A utilização de metanol, na fase móvel, aumentou significativamente o ruído da linha de base, portanto, foi dada preferência à utilização de ACN.

Em consequência da obtenção de resultados semelhantes com a utilização de acetato ou fosfato, deu-se preferência ao acetato em virtude da possibilidade de cristalização do fosfato e a degeneração de coluna causada por este tampão.

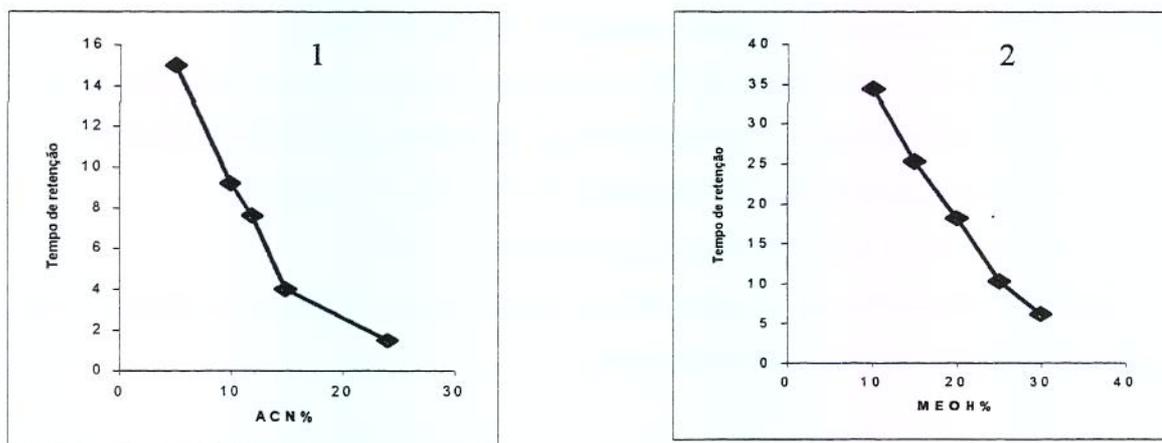


Figura 1. Efeito da concentração dos modificadores orgânicos na retenção do ácido fólico. Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m 150X4,6mm. (1)Fase móvel: acetonitrila, solução tampão acetato ou fosfato, pH 2,8, vazão de 0,5mL/min. (2)Fase móvel: metanol, solução tampão acetato ou fosfato, pH 2,8, vazão de 0,5mL/min.

Os mesmos testes foram feitos com amostras de leite em pó enriquecidos, e as melhores condições foram obtidas com 10% de ACN em tampão acetato, que permitiu a eluição do AF em aproximadamente 8,0 minutos, a uma vazão de 0,5mL/min, entretanto sempre havia a presença de um co-eluente, que só pode ser visto com o auxílio do sistema plotter da Chemistation-HP.

Foi observado o efeito da concentração hidrogeniônica na retenção do ácido fólico (Figura 2), nas melhores condições cromatográficas até então estabelecidas. Maior retenção foi obtida numa faixa de pH muito próxima ao valor do pK1 (3,1) do ácido fólico.

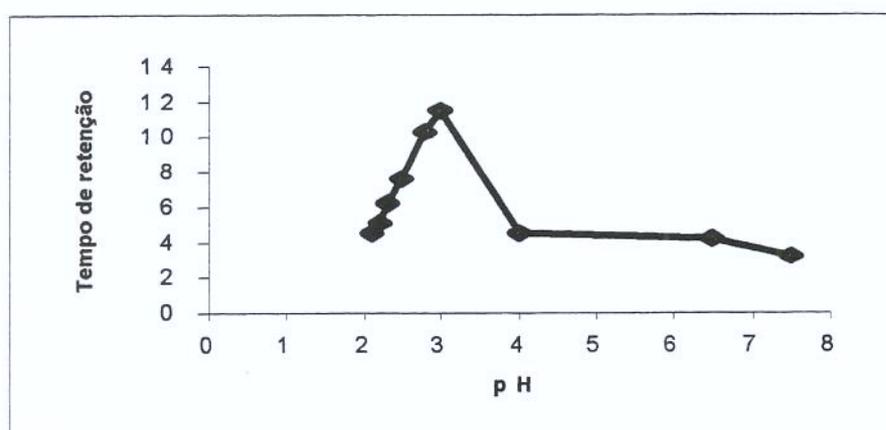


Figura 2. Efeito da concentração hidrogeniônica na retenção do ácido fólico. Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 150X4,6mm. Fase móvel: acetonitrila 10%, em solução tampão acetato, com vazão de 0,5mL/min.

O sistema de eluição isocrático, mesmo com todas as otimizações feitas em relação a fase móvel, nas amostras de leites enriquecidos com AF não se mostrou satisfatório, levando a estudos com sistemas de eluições por gradiente.

De todos os gradientes utilizados (Tabela 1), o melhor sistema foi formado com 10% de acetonitrila e 90% de fase aquosa tamponada (ácido acético 0,166mol/L; hidróxido de potássio 0,01mol/L; pH 2,8) no início da corrida, chegando a oito minutos e meio (8,5min) com 24% de acetonitrila e 76% de fase aquosa tamponada, permanecendo estas condições até nove minutos (9min) de corrida, quando as condições cromatográficas iniciais eram retomadas. A baixa concentração do modificador orgânico no início da corrida, programado

para um aumento linear na concentração de solventes, favoreceu a boa resolução da vitamina em relação a compostos interferentes da matriz alimentícia, além de possibilitar uma corrida mais rápida do que as existentes na literatura. Após vários ensaios, foi estabelecido o tempo de 5 minutos para o re-equilíbrio da coluna.

AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE LIMPEZA DO EXTRATO E DE EXTRAÇÃO

Em decorrência das características da matriz, os procedimentos de clarificação do extrato foram conduzidos com a finalidade da eliminação, principalmente, de proteínas.

O emprego de ácido fosfórico 0,1mol/L resultou num extrato demasiadamente sujo, ocasionando elevação da pressão e rápido entupimento da coluna. O mesmo ocorreu quando combinado o ácido fosfórico com uma solução concentrada de sais (0,25mol/L Na_2HPO_4 + 0,37mol/L KH_2PO_4). Etanol e acetonitrila, para a limpeza do extrato, também não foram satisfatórios.

A adição de ácido tricloroacético concentrado à mistura de ácido fosfórico e solução salina apresentou-se como uma medida prática e eficiente de clarificação do extrato.

Em virtude de se trabalhar com produtos enriquecidos, a hidrólise enzimática, empregada na grande maioria dos trabalhos da literatura, se mostrou desnecessária, já que nos produtos analisados neste trabalho a vitamina se encontra na forma monoglutâmica livre. Muitas vezes, como resultado da hidrólise da matriz alimentícia, há a liberação de mais interferentes que dificultam tanto a análise qualitativa como quantitativa (AGOSTINI e GODOY, 1997).

Avaliou-se a influência do banho ultra-sônico na extração do ácido fólico em leite em pó enriquecido em comparação à simples agitação mecânica (**Tabela 2**). As taxas de recuperação foram significativamente maiores com a utilização do banho ultra-sônico por 10 minutos, com todas as soluções extratoras. O prolongamento do tempo de extração, com o uso do ultra-som, promoveu a redução nos teores de ácido fólico.

As menores taxas de recuperação com o uso do ultra-som (45 a 65%) foram obtidas em meio ácido ou com a utilização de solventes puros. Tais condições promoveram a degradação do AF e/ou a extração parcial do mesmo. Em soluções com pH acima de 6,5, a

porcentagem de recuperação chegou a 98,5% e 98,7% com as soluções de K_2PO_4 (0,03mol/L) e KOH (0,1mol/L), respectivamente. A adição de acetonitrila ou metanol, na proporção 1:3, na solução de KOH (0,1 mol/L) também possibilitou as mesmas altas taxas de recuperação (98,5%).

Tabela 2: Comparação das taxas de recuperação do ácido fólico obtidas com diferentes soluções extratoras, sem e como o uso de ultra-som, em leite em pó enriquecido (250 μ g/100g).

Soluções extratoras*	recuperação (%)**	
	sem ultra-som	com ultra-som
Água	26 \pm 1 a	55 \pm 2 b
Metanol	21 \pm 2 a	52 \pm 1 b
Acetonitrila	23 \pm 2 a	52 \pm 1 b
Tampão fosfato (0,03 mol/L) pH2,5	15 \pm 2 a	45 \pm 2 b
Tampão fosfato (0,03 mol/L) pH5	35 \pm 1 a	60 \pm 1 b
Tampão fosfato (0,03mol/L) pH6,5	43 \pm 1 a	85,1 \pm 0,8 b
Tampão fosfato (0,03mol/L) pH7	51 \pm 1 a	87,5 \pm 0,7 b
K_2HPO_4 (0,03mol/L) pH8	88,8 \pm 0,8 a	98,5 \pm 0,1 b
KOH (0,1mol/L)	88,3 \pm 0,7 a	99 \pm 0,5 b
Tampão acetato (0,1mol/L) pH2,5	20 \pm 1 a	50 \pm 1 b
Tampão acetato (0,1mol/L) pH5	25 \pm 1 a	65 \pm 1 b
Tampão acetato (0,1mol/L) pH6,5	47 \pm 1 a	87,6 \pm 0,7 b
Tampão acetato (0,1mol/L) pH7	52 \pm 2 a	90,6 \pm 0,6 b
KOH (0,1mol/L)+ Acetonitrila (3:1)	85,3 \pm 0,7 a	98,5 \pm 0,6 b
KOH (0,1mol/L)+ Metanol (3:1)	85,2 \pm 0,8 a	98,4 \pm 0,6b

*Todas soluções ficaram em contato com a amostra por 10 minutos, sem e com banho ultra-sônico; **média e estimativa de desvio padrão de determinações em duplicata; Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ao nível de 95%

AValiação dos procedimentos de detecção e identificação

Embora na literatura exista um consenso em utilizar 280nm (λ máx) para a detecção do ácido fólico (REED, 1976; WILLS, 1977; BRANFMAN e McCOMISH, 1978; SCHULZ et al., 1985; OSSEYI et al., 1998), foram avaliados neste trabalho, quatro diferentes comprimentos de onda, 280, 285, 290 e 295 nm.

Utilizando o comprimento de onda de 280nm, observou-se que o pico referente ao ácido fólico, nas amostras de leite em pó, se posiciona exatamente na cauda de um interferente (**Figura 3A**). Porém, em comprimentos de onda acima de 280nm há uma menor absorção dos compostos do extrato, com o desaparecimento da cauda desse interferente, sem contudo prejudicar a quantificação do AF (**Figuras 3B, 3C e 3D**). Obteve-se cromatogramas mais limpos, e como não houve diferença significativa nas áreas do pico

do AF a 285, 290 e 295nm, foi estabelecida a detecção a 290nm, já que a 295nm a área do pico foi menor.

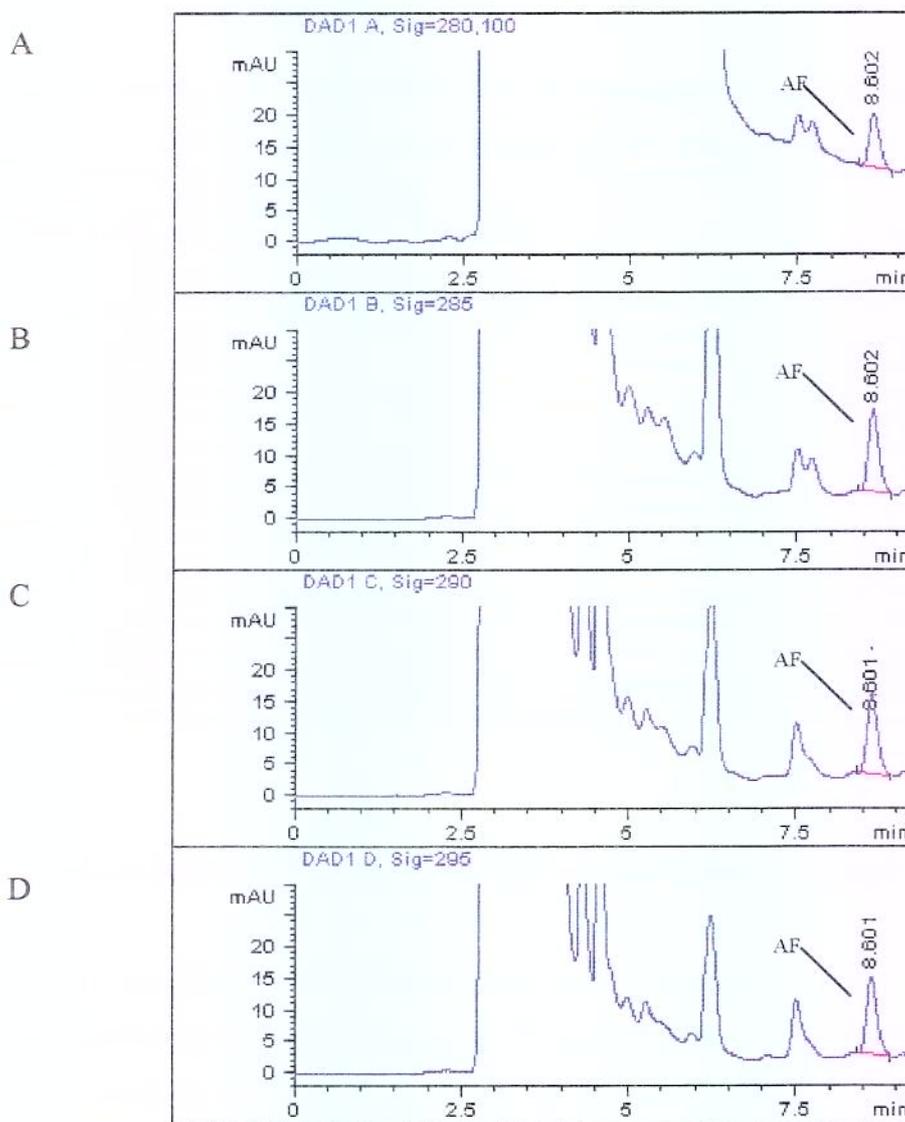


Figura 3: Perfis cromatográficos de extrato de leite em pó enriquecido com ácido fólico (AF), monitorados a diferentes comprimentos de onda: (A) 280nm; (B) 285nm; (C) 290nm; (D) 295nm. Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0166mol/L) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de tampão acetato (0166mol/L) e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto.

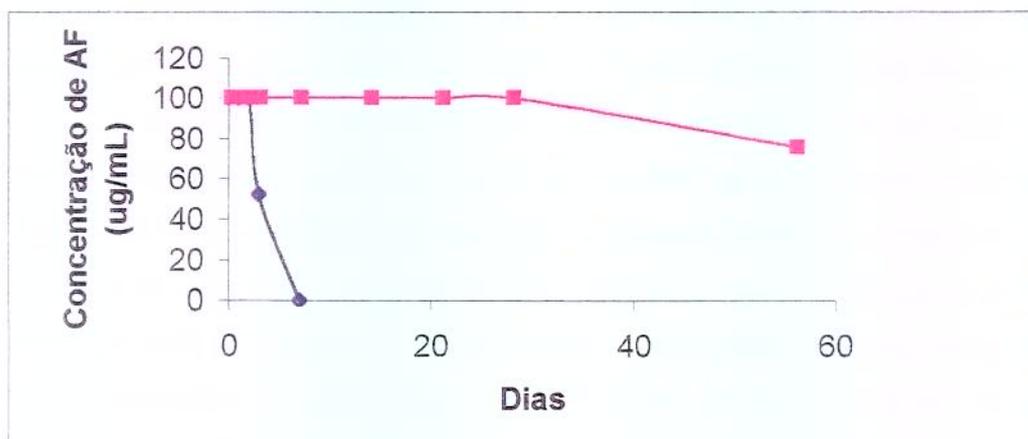
RUGGERI et al. (1999) e VATHERISTO et al. (1996) também estabeleceram o comprimento de onda para leitura de folatos a 290nm para amostras de cereais, salame, grão de bico e feijão, provavelmente pela forte interferência de matriz alimentícia.

Nos trabalhos encontrados na literatura os autores só apresentam a detecção por fluorescência para folatos, no entanto, quando se preparou uma solução de AF (100µg/mL) obteve-se através de um fluorímetro o espectro de fluorescência, e portanto foi utilizada também essa propriedade para confirmação da identidade do AF (**Anexo 2**), além do tempo de retenção e do espectro obtido no DAD. Foram estabelecidos os comprimentos de excitação e emissão à 280nm e 360nm, respectivamente, no detector de fluorescência (FLD). Entretanto, quando no extrato da amostra a concentração de AF era superior a 20µg/mL, perdia-se o sinal do FLD.

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PADRÃO

Depois de estabelecida a faixa de linearidade entre a área do pico e a concentração, através de padronização externa (**Anexo 3**), o cálculo da concentração do AF presente nas amostras foi feito injetando-se todos os dias um dos pontos da curva. Portanto, para esse procedimento tornou-se indispensável a avaliação da estabilidade da solução padrão de AF. Foram realizados testes de estabilidade frente as condições de temperatura, luz e solvente ao qual o padrão foi dissolvido.

As duas variáveis temperatura e luz não tiveram nenhum efeito negativo sobre a concentração do ácido fólico. O fator que mais influenciou na estabilidade do padrão foi o solvente. Mantidas a temperatura de geladeira (4°C), soluções padrão de AF em tampão fosfato (pH 6,5) apresentaram uma estabilidade de 30 dias, enquanto que em água (pH 7,0) foi de apenas 1 dia (**Figura 4**).



Linha Azul: Padrão de AF em água; Linha Rosa: Padrão de AF em tampão fosfato.

Figura 4. Estabilidade do padrão de AF em diferentes soluções.

CONCLUSÕES

A extração com solução alcalina (KOH 0,1 mol/L), com vibração ultra-sônica por 10 minutos, apresentou-se como uma alternativa adequada na determinação de ácido fólico em leite em pó enriquecido, assim como o ácido tricloroacético se mostrou eficiente na etapa de limpeza do extrato.

A eluição por sistema gradiente foi necessária para separar o ácido fólico de um co-eluyente presente no leite em pó, e assim tornou mais rápida a análise.

O sistema de detecção recomendado é através do detector de ultra-violeta a 290nm, para leites enriquecidos, devido a diminuição da interferência de outros constituintes da amostra.

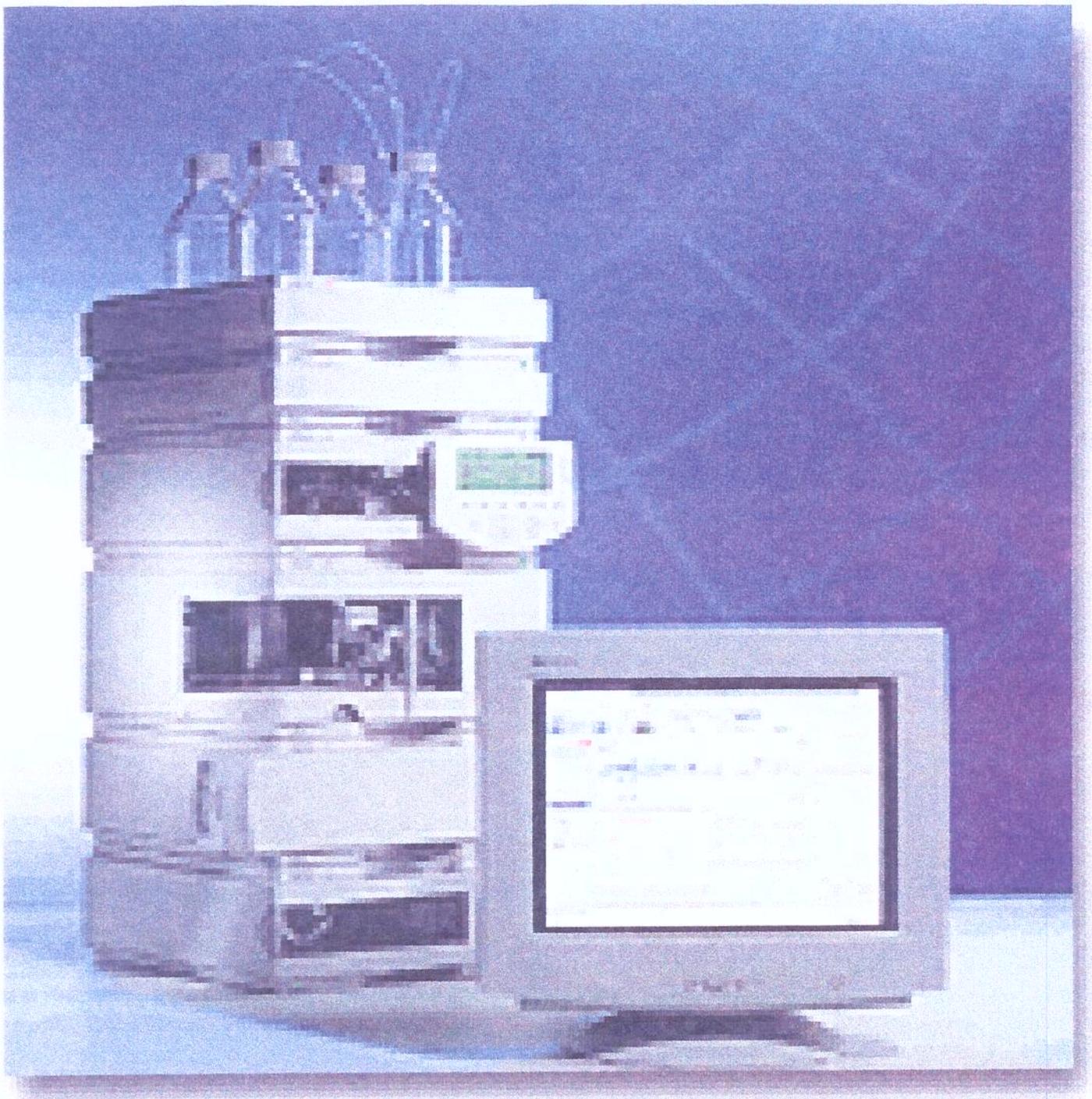
O padrão de ácido fólico se manteve estável por 30 dias em solução de tampão fosfato (pH 6,5) a temperatura de refrigeração (4°C). No entanto sugere-se um estudo multivariado mais abrangente sobre a estabilidade do padrão de ácido fólico.

Alterações no pH e nas concentrações de acetonitrila ou metanol constituem as variações de primeira escolha na composição da fase móvel, para determinação do AF em outros produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, T.S.; GODOY, H.T. Simultaneous determination of nicotinic acid, nicotinamide, riboflavin, thiamin and pyridoxine in enriched Brazilian foods, by HPLC. *Jornal High resolution Chromatography*, 20 (4): 3081-3086, 1997.
- ANNOTATION, how do we get enough folic acid to prevent some neural tube defects. **American Journal of Public Health**. Vol. 84/3. p. 348-350, 1994.
- ANNOTATION, United States of America. **Intenational Diges of Health Legislation**. v 47 (3), USA 96.39 e 96.40, 1996.
- BRANFMAN A R.; MCCOMISH, M. Rapid separation of folic acid derivates by paired-ion high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**. vol. 151. p 87-89, 1978.
- BERG, H. V.; FINGLAS P. M. ; BATES, C. Flair intercomparisons on serum and red cell folate. **Iternational Journal Vitamins Nutrition**. vol 64. p 288-293, 1994.
- CATHARINO RR; GODOY HT; **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos** (dados não publicados), 2000.
- CRANE, N.T. ; WILSON, D.B. ; COOK, D.A. ; LEWIS, C.J. ; YETLEY, E.A. RADER, J.I. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **American Journal of Public Health**. vol. 85/5, p. 660-666, 1995.
- CZEIZE, A.E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementetion. **New England Journal of Medicine**. vol 327 (26). p 1832-1835, 1992.
- DALY S, MILLS JR, MOLLOY AM, CONLEY M, LEE YJ, KIRKE PN, WEIR DG, SCOTT JM, Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**. v.350 /9092, p.1666- 1669, 1997.
- DONG, M.W; LEPORE, J; TARUMOTO T. Factors affecting the ion-pair chromatography of water-soluble vitamins. **Journal of Chromatography**. 442. p 81-95, 1988.
- DUFF, E.M.W; COOPER, E.; Neural tube defects in jamaica following hurricane gilbert. **American Journal of Public Health**. v. 84 (3). p 473-475, 1994.
- FARRAR, G.; BUSS, D.H.; LOUGHRIDGE, J.; LEEMING, R. J.; HUGHES, K.; BLAIR, J. A. Food folates and the British total diet study. **Journal Hum. Nutr.Diabetics**, vol. 5, p. 237-249, 1992.
- FINGLAS, P.M.; WIGERTZ, K.; VAHTERISTO, L.; WITTHÖFT, C.; SOUTHON, S.; FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**. 64: 245-255, 1999.
- GREGORY , J.F.; SARTAIN, D.B. Inproved chromatographic determination of free and glycosylated forms of vitamins B6 in foods. **Journal Agricututral Food Chemistry**, 39 (1): 899-905, 1991.
- GREGORY III, J.F.; SARTAIN, D.B.; DAY, B.P. Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performace liquid chromatography. **Journal Nutrition**, 114: 341-353, 1984.
- HOLLMAN, P. C.; SLANGE, J. H.; WAGSTAFFE, J. P.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D. A. T.; FINGLAS, P. M. Intercomparation of methods for the determination of vitamins in food. **Analyst**, 118: 481-488, 1993.
- KONINGS, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. **Jounal of Association of Official Agricultural Chemists International**. 82 (1): 119-127, 1999.
- LOCKSMITH, G.J; DUFF, P. Preventing neral tube defects: The importance of periconceptional folic acid supplements. **Obstrics & Gynecology**. 91 (6). p 1027-1034, 1998.
- LUCOCK, M.D. ; GREEN, M. ; HARTLEY & MALCOLM ; LEVENE, I. Physicochemical and biological factors influencing methylfolate stability: use of dithiothreitol for HPLC analysis with electrochemical detection. **Food Chemistry**. 47: 79-86, 1993.
- LUCOCK, M.D. ; GREEN, M. ; PRIESTNALL, M. ; DASKALAKIS, I. ; LEVENE &HARTLEY M.I. Optimisation of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. **Food Chemistry**.53: 329-338, 1995.
- OSSEYI, E. S. ; WEHLING, R.L.; ALBRECHT, J. A. Liquid chromatographic method for determination added folic acid in fortified cereal products. *Journal of Chromatography A*. 826 (2): 235-240, 1998.
- RADER, J.I. ; WEAVER, C.M. ; AGYAL G.; Use of microbiological assay with tri-enzyme extration for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. *Food Chemistry*. 62 (4): 451-465, 1998.

- RUGGERI, S.; VATHERISTO, L.T.; AGGUZZI, A.; FINGLAS, P.; CARNOVALE, E. Determination of folate vitamers in food and italian reference diet by high performace liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. **855** (1):237-245, 1999.
- SCHULZ, A.; WEIDEMANN, K.; BITSCH, I. Stabilisation of 5-CH₃H₄-Pglu and subsequent analysis by reverse phase high performace liquid chromatography. **Journal of Chromatography** .**328**: 417-421, 1985.
- SERBANESCU, F; ROCHAT, R; FLOYD, V; TOOMEY, K.E. Knowledge about folic acid and use of multivitamins containing folic acid among reproductive-age women – Georgia 1995. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v 45 (37). p 793-795, 1996.
- TAMURA, T. ; MESSING, B. Bioavailability of folic acid in fortified food. **AmaricanJournal of Clinical Nutrition**. vol. 66/6 p. 1299-1300, 1997.
- VAHTERISTO L. T, OLLILAINEN V, KOIVISTOINEN, P. E; VARO P. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. **Journal Agriculture Food Chemistry**. **44** : 477-482, 1996.
- VAHTERISTO, L.T.; OLLILAINEN V, VARO P. Application of HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland, **Food Chemistry**, **59** (4.): 589-597, 1997.
- WIGERTZ, K.; JÄGERSTAD, K. Comparison of a HPLC and radioprotein-biding assay for the determination of folates in milk and blood samples, **Food Chemistry**, **54** (4): 429-436, 1995.
- WILLS, R.B.H.; SHAW, C.G.; DAY, W.R. Analysis of water soluble vitamins by high pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, **15**: 262-266, 1977.



CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Trabalho a ser submetido à revista **Journal Chromatography A**

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

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

RESUMO

O ácido fólico (AF) é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, que apresenta várias funções importantes para o corpo humano e portanto vem sendo utilizado no processo de enriquecimento dos alimentos, entre estes os leites, uma importante fonte de alimentação. Seu fácil acesso e preços mais compatíveis são os principais motivos para o favorecimento do seu consumo. Entretanto, a falta de metodologias analíticas apropriadas tem dificultado o controle dos níveis desses enriquecimentos. Visando, então, garantir os teores de AF em leites enriquecidos e sabendo que a determinação dessa vitamina em alimentos envolve alguns desafios, em função da sua baixa concentração e da presença de interferentes na matriz, o presente trabalho propõe e valida uma metodologia para determinação de AF em leites enriquecidos, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O ácido fólico foi extraído com uma solução de hidróxido de potássio (0,1mol/L) e a limpeza do extrato foi feita com adição de ácido tricloroacético concentrado. No processo cromatográfico utilizou-se coluna C₁₈ e a fase móvel tampão acetato (0,166mol/L)/acetonitrila (90:10 v/v) no instante zero, chegando a (76:24 v/v) após 8,5 minutos, mantendo-a até 9 minutos. O tempo de condicionamento da coluna, antes de cada injeção, foi de 5 minutos. A detecção foi feita com o detector de ultravioleta a 290nm e a quantificação através de padronização externa. Os limites de detecção e quantificação, e as taxas de recuperação determinados foram, respectivamente, 1,3ng/mL, 2,6ng/mL e 99%. Testes de repetibilidade, nos níveis de enriquecimento (11,7 e 316µg/100mL), apresentam coeficientes de variação inferiores 7,3%. A metodologia aqui proposta e validada,

apresentou eficiência, versatilidade, rapidez e simplicidade, quando aplicada a leites enriquecidos.

Abstract

Folic acid (FA) is a water-soluble complex B vitamin, which has many important functions for the human body and therefore it has been used in the process of aliment enrichment and among them remains the milk as an important source of nourishment. The facility to access it as well as the prices which are more compatible are the main reasons for its consumption. Nevertheless, the lack of appropriate analytical methodology had diffculted the control of enrichment levels. So, the aim is to guarantee the contents of FA in enriched milk and as it is known, the determination of this vitamin in aliment involves some challenges, because of its low concentration and the presence of intervenings in the matrix, the present research developed and evaluated a new methodology for the determination of folic acid in enriched milks and milks products, by high performace liquid chromatography (HPLC). The folic acid was extracted by potassium hydroxide (0,1mol/L) with ultrasonic vibration and the clean up of the extract was carried out by the addition of tricloroacetic acid. In chromatographic process a C₁₈ column was used with mobile-phase using gradient elution starting at buffer acetate (0,166mol/L) and acetonitrile (90:10 v/v), changing to buffer acetate and acetonitrile (76:24 v/v) after 8,5minutes, remaining this conditions until 9 minutes. Column re-equilibration time before each new injection was 5 minutes. Detection was obtained with ultraviolet detector (290nm) and quantified using external standards. The limits of detection, quantification and recuperation being respectively 1,3ng/mL; 2,6ng/mL; and 99%. Repeatability test at the average enrichment levels of the products analyzed (11,7 e 316µg/100mL) presented coefficients of variation below 7,3%. The proposed methodology, validated here, was shown to be efficient, highly versatile, quick and simple when applied to enriched milk.

INTRODUÇÃO

O ácido fólico (AF) está sendo considerado “a vitamina do futuro”, por diversos fatores que colaboram para a saúde humana. Acredita-se que um dos possíveis efeitos diretamente ligado com a carência do AF, e que tem surtido maior repercussão mundial, são as malformações congênitas. Recentemente, inúmeros trabalhos tem sido publicados mostrando, também, que a carência de ácido fólico pode causar doenças cardiovasculares (NIGARD et al., 1997; TSAI et al., 1999), câncer (GIOVANNUCCI et al, 1995; GLYNN et al., 1996) e desordens mentais como o mal de Alzheimer’s (CLARKE et al., 1998). Em consequência de todas as ações benéficas, o ácido fólico, nos EUA, vem sendo adicionado principalmente nos cereais matinais, em macarrão e em farinhas, desde 1996 (TUCKER et al, 1996). A preocupação com a carência de ácido fólico na alimentação de gestantes é tão grande que em 1998 uma campanha nacional do ácido fólico foi conduzida nos EUA, cuja missão foi a de reduzir as malformações congênitas, incentivando e promovendo a ingestão do AF.

A indústria de alimentos no Brasil promoveu um expressivo aumento do emprego de vitaminas, entre essas o ácido fólico, para o enriquecimento de muitos produtos. Em alguns casos, esse processo de enriquecimento faz parte de uma estratégia promocional de marketing, visando, principalmente, o aumento da comercialização dos produtos (AGOSTINI, 1996, CARVALHO, 1996).

A fonte alimentar a ser enriquecida deve apresentar consumo significativo e homogêneo pelas diversas camadas da população, sendo que os nutrientes adicionados devem apresentar estabilidade e biodisponibilidade após o processamento e durante o período de estocagem, sem, contudo, criar desbalanços nutricionais ou alterar, em aparência e aroma, o produto acabado.

O leite é um alimento tradicionalmente utilizado no processo de enriquecimento com vitaminas lipossolúveis, especialmente A, D e E. Contudo, pela sua participação na dieta, hoje é escolhido também como veículo para vitaminas do complexo B, entre elas o ácido fólico.

Para assegurar a qualidade de produtos enriquecidos e para confirmar ou descobrir novas fontes é que são desenvolvidas as metodologias de identificação e quantificação de AF e folatos.

A principal vantagem dos métodos biológicos e microbiológicos é a avaliarem a biodisponibilidade da vitamina baseados nos requerimentos nutricionais de animais de laboratório ou de um microrganismo. Entretanto, apresentam algumas limitações e principalmente quantificações pouco precisas. Os métodos químicos apresentam muitos problemas em decorrência da presença de muitos interferentes na análise de matrizes alimentícias, além de apresentarem muitos inconvenientes como baixa confiabilidade e quantificação pouco exata. Recentemente, a literatura vem apresentando avanços nos métodos para a determinação de AF, através de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão e com a possibilidade de determinação das diferentes formas de folatos em uma única análise.

Um fator importante para o conhecimento do potencial nutricional dos alimentos, garantindo a segurança alimentar e o sucesso no desenvolvimento de novos produtos, é qualidade dos dados analíticos. Planejamentos e análises estatísticas variadas, programas de comparação de métodos analíticos e o emprego de materiais de referência são as ferramentas utilizadas hoje pelos pesquisadores no controle de qualidade analítica (FINGLAS et al., 1993; HOLLMAN et al., 1993; KONINGS, 1999; FINGLAS et al., 1999). O objetivo deste trabalho foi, portanto, a otimização e a validação de metodologia, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, na determinação de AF em leites enriquecidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

Três diferentes marcas de leite esterilizado e leite em pó, todas enriquecidas com ácido fólico foram adquiridas em supermercados na cidade de Campinas-SP, no período de janeiro a abril/2000. Foram analisados três lotes, diferenciados pelas datas de fabricação, para cada produto. Todas as amostras estavam dentro dos prazos de validade e sem danos aparentes. As determinações foram realizadas em duplicatas.

Reagentes

O padrão de ácido fólico foi cedido pela M. CASSAB Comércio e Indústria LTDA, Santo Amaro, SP, Brasil. (SIGMA cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila grau cromatográfico, os ácidos acético, tricloroacético, fosfórico e o hidróxido de potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. A água utilizada no preparo das amostras e das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros MILLIPORE, com poros de 0,45 μ m de diâmetro.

Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100 μ L e detetor de arranjo de diodos (UV-Visível). Todo o sistema foi controlado pelo programa Chemstation-HP, que também gerencia o sistema de aquisição e tratamento de dados.

Para separação do ácido fólico foi utilizada uma coluna cromatográfica Microsorb ODS-2, 5 μ m, 150mmX4,6mm d.i. (Raimin Instrument Company) protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5 μ m, 10X4,6 mm d.i. (VARIAN).

MÉTODOS

Metodologia Analítica

Para a extração foram tomadas 1,0mL e 1,0g de leite esterilizado e leite em pó enriquecido, respectivamente, previamente homogeneizados. O ácido fólico foi extraído com 3mL de solução de hidróxido de potássio (0,1mol/L) em banho ultra-sônico por dez (10) minutos. A mistura foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 10mL, adicionando-se mais 3mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 2mL de tampão fosfato, composto por Na_2HPO_4 (0,25mol/L)/ KH_2PO_4 (0,37mol/L), 350 μL de ácido tricloroacético (TCA) e, por fim, o volume aferido com tampão fosfato. Após homogeneização, o sobrenadante passou por duas etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a segunda em membrana durapore (HVLP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45 μm , e a seguir foi injetado no cromatógrafo (100 μL).

O AF foi eluído através de um sistema de eluição por gradiente com 90% de tampão acetato (0,166mol/L de ácido acético; 0,01mol/L de hidróxido de sódio; pH2,8) e 10% de acetonitrila no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de tampão e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 9,0 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada por 5 minutos, antes do próxima injeção. A vitamina foi detectada a 290nm.

A identificação foi feita por comparação entre o tempo de retenção, obtido com padrão analisado nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros de absorção obtidos com a utilização do detector de arranjo de diodos. O grau de pureza do AF foi avaliado pelo sistema disponível no software Chemstation-HP. A quantificação do ácido fólico foi realizada por padronização externa, construída a curva analítica com 7 níveis de concentração; 2,6; 5,2; 10,5; 105; 525; 1050 ng/mL, sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

O fluxograma da metodologia empregada para a determinação de ácido fólico em leites enriquecidos está apresentado na **Figura 1**.

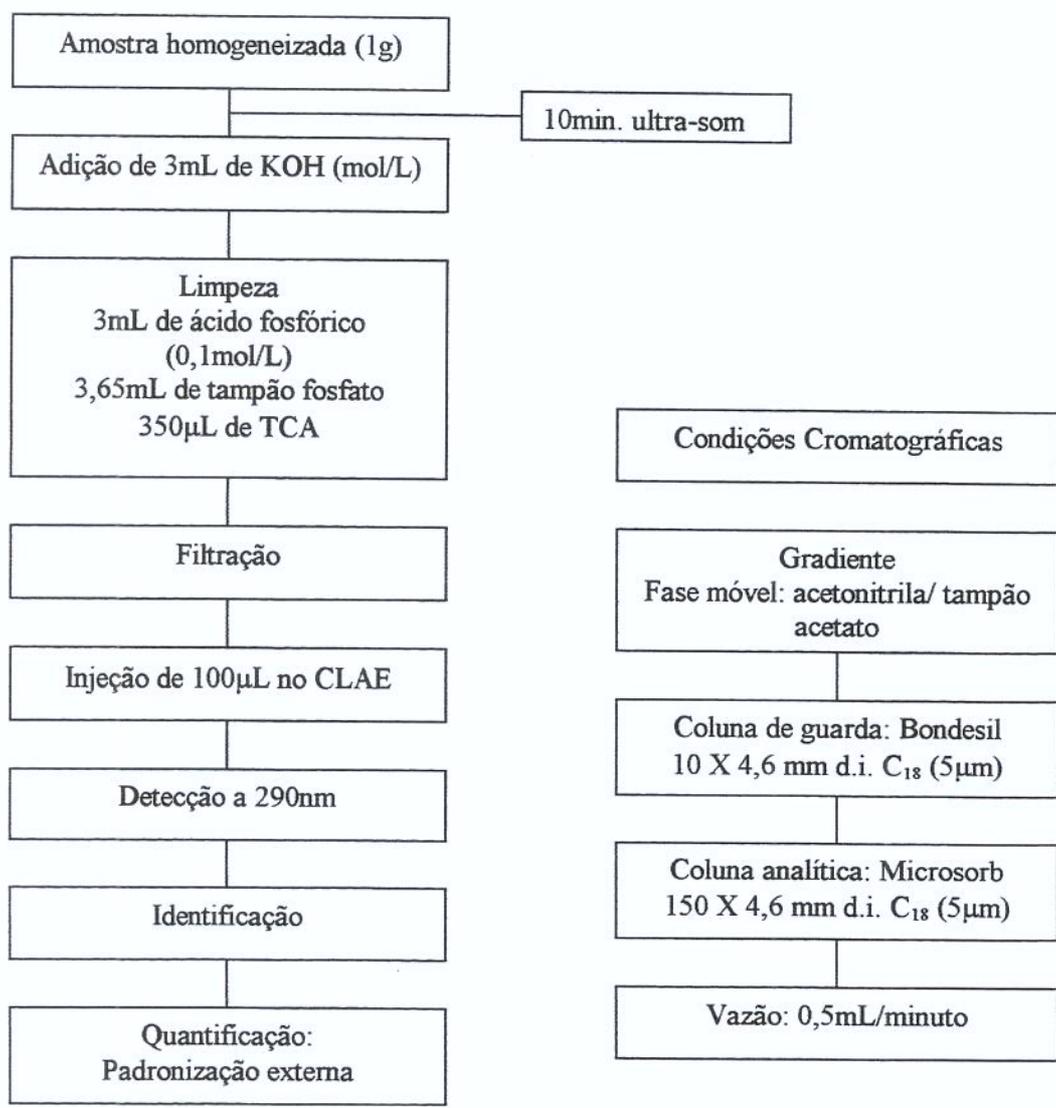


Figura 1. Fluxograma da metodologia utilizada na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos.

VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Limites de Detecção e Quantificação

Uma avaliação prévia do limite de detecção (LD) foi feita por diluições sucessivas do padrão do AF, sendo determinada a menor quantidade detectável, aproximadamente duas a três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento. Com essa concentração estimada, tomou-se amostras de leite não enriquecido, e após confirmação da não presença de AF nessas amostras, quantidades do padrão, igual e maiores ao limite de detecção estabelecido com o padrão puro, foram adicionadas à matriz alimentícia. Foi considerado o LD a menor quantidade detectável na matriz. O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o LD (CAULCUTT e BODDY, 1983).

Recuperação de Padrões

Para uma avaliação da exatidão do método foram realizados testes de recuperação de padrões adicionados a leites não enriquecidos, em dois diferentes níveis de concentração, 15,4 e 385 µg/100g. Para as análises foram utilizados 1,0g de amostra. As determinações foram feitas em duplicata.

Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada através de cinco determinações, em duplicatas, em dois níveis de concentrações de ácido fólico, em soluções padrões e em amostras de leites. A repetibilidade foi calculada segundo CAULCUTT e BODDY (1983) através da fórmula:

$$r = t\sqrt{2.sr}$$

r – repetibilidade, com significância de (90, 95 e 99%)
sr – estimativa do desvio padrão.
t – t de Student

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapas Analíticas

O processo cromatográfico desenvolvido neste trabalho, permitiu obter o método mais rápido de análise de ácido fólico disponível na literatura. O emprego de coluna C₁₈ e a utilização do sistema de eluição por gradiente possibilitou a eluição da vitamina , aproximadamente, em 8,3 minutos, com um tempo de análise total de 9,0 minutos. O tempo de re-equilíbrio da coluna (5 minutos), após o final da corrida, foi fundamental para reprodutibilidade do método. Além da rapidez, outra vantagem foi a não utilização de par iônico na FM, empregados por BRAMAFAN et al. (1978) e OSSEYI et al. (1998), que apresentaram o inconveniente de longos períodos de condicionamento de sistema. A escolha do comprimento de onda de leitura a 290nm permitiu atingir limites de detecção mais baixos, em consequência da diminuição da absorção dos outros componentes da amostra (**Figura 2**). Os cromatogramas referentes as amostras de leite esterilizado e leite em pó enriquecidos estão dispostos nas **Figuras 3 e 4**. O **Anexo 1** mostra os perfis dos espectros de absorção do ácido fólico, presente em solução padrão e nos alimentos enriquecidos, obtidos através do detector de arranjo de diodos. A pureza do pico correspondente ao AF foi verificada através dos parâmetros de pureza fornecidos pelo software HP-Chemstation (**Anexos 4**) confirmando a eficiência do sistema.

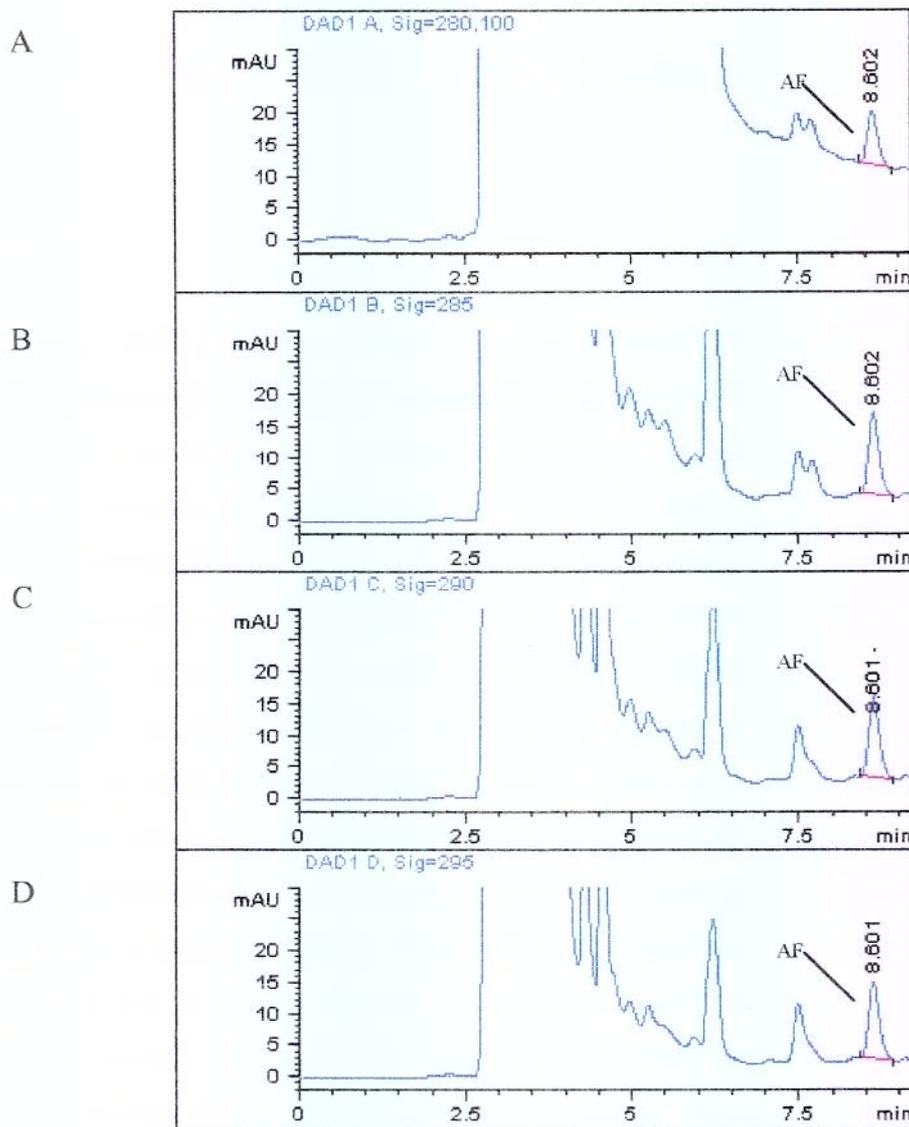


Figura 2: Perfis cromatográficos de extrato de leite em pó enriquecido com ácido fólico (AF), monitoradas a diferentes comprimentos de onda: (A) 280nm; (B) 285nm; (C) 290nm; (D) 295nm. Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0166mol/L) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de tampão acetato (0166mol/L) e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto.

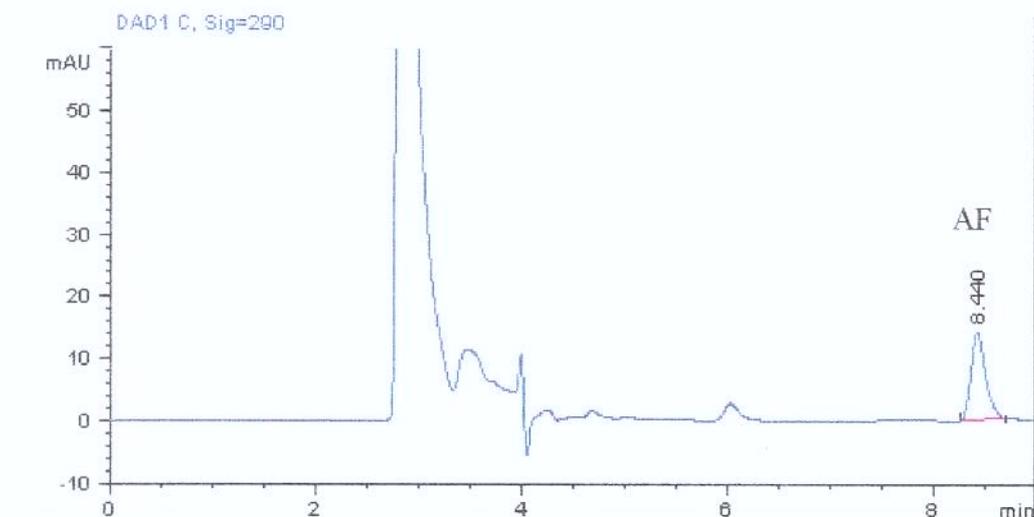


Figura 3) Perfil cromatográfico do extrato de leite esterilizado enriquecido com ácido fólico (AF). Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0166mol/L) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de tampão acetato (0166mol/L) e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto.

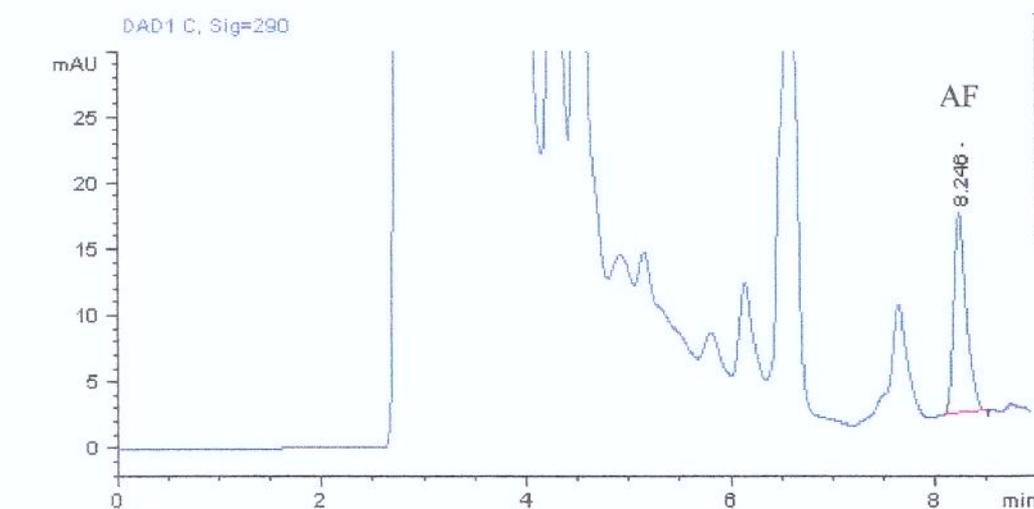


Figura 4) Perfil cromatográfico do extrato de de leite em pó enriquecido com ácido fólico. Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0166mol/L) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de tampão acetato (0166mol/L) e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto.

A curva de analítica para o ácido fólico, traçada por padronização externa, apresentou boa linearidade, nas faixas de concentração pré-estabelecidas de 2,6ng/mL à 1,0µg/mL. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,99964 (**Anexo 3**).

Os teores de ácido fólico determinados nas amostras aqui analisadas são apresentados nas **Tabelas 2 e 3**. Das três marcas analisadas de leite esterilizado, os da marca LLC apresentaram teores de AF ligeiramente superiores aos declarados na embalagem, enquanto que os leites LLB apresentaram quantidades em média de 20 a 30% a menos do declarado. Entretanto, na marca LLA os teores de ácido fólico encontrados representaram apenas 13% do valor declarado no rótulo. Nas amostras de leite em pó enriquecido analisadas, em todas, o teor de ácido fólico encontrado foi ligeiramente superior a quantidade prescrita na embalagem.

Tabela 2. Concentrações de ácido fólico em leite esterilizado enriquecido.

Marca/Lote	PV (meses)	*Rótulo (µg/100mL)	AF (µg/100mL) M ± D P	CV (%)
LLA1	9	300	38,89±0,03	1,6
LLA2	9		38,0±0,3	1,3
LLA3	9		37±1	1,7
Média dos lotes			37,9±0,8	2,0
LLB1	10	20	16,2±0,9	1,68
LLB2	9		16±1	1,4
LLB3	8		12,9±0,8	1,1
Média dos lotes			15±1	10,0
LLC1	10	32,5	39±1	1,7
LLC2	10		38±1	1,9
LLC3	9		38±1	1,7
Média dos lotes			38,0±0,5	1,2

PV – prazo de validade, tempo em meses em que o produto ainda pode ser consumido.

*Concentração de AF descrita na embalagem do produto; M ± D P média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata. CV coeficiente de variação.

Tabela 3. Concentrações de ácido fólico em leites em pó enriquecido.

Marca/Lote	PV (meses)	*Rótulo ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	AF ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) M \pm D P	CV (%)
LPA1	10	320	342,5 \pm 0,1	1,4
LPA2	7		335,4 \pm 0,5	1,2
LPA3	5		351,6 \pm 0,2	1,5
Média dos lotes			343 \pm 6	1,9
LPK1	9	58	64,8 \pm 0,2	1,4
LPK2	8		59,3 \pm 0,1	1,5
LPK3	8		59,1 \pm 0,6	1,2
Média dos lotes			61 \pm 2	4,3
LPO1	9	250	276,4 \pm 0,8	1,2
LPO2	8		257,0 \pm 0,8	1,5
LPO3	7		254,1 \pm 0,3	1,4
Média dos lotes			266 \pm 9	3,6

PV – prazo de validade, tempo em meses em que o produto ainda pode ser consumido.

*Concentração de AF descrita na embalagem do produto; M \pm D P média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação.

Validação de Metodologia

O limite de detecção (LD) encontrado para o ácido fólico em solução padrão e em leites enriquecidos foi igual, correspondendo a 1,31ng/mL (**Tabela 4**). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção (2,62 ng/mL). O LD encontrado neste trabalho coincide com o determinado por KONINGS (1999), que utilizou a CLAE para determinação do AF também em leites enriquecidos. OSSEYI et al. (1998) obtiveram um LD 100 vezes maior analisando cereais matinais. Uma explicação para um LD tão alto, provavelmente, seja a detecção feita a 280nm, pois quando utilizou-se esse comprimento de onda em amostras de leite, o limite de detecção foi comparado ao obtido por OSSEYI et al. (1998), em virtude da interferência dos constituintes da amostra.

Tabela 4. Limites de detecção e quantificação para o ácido fólico.

Autores	Limite de Detecção (ng/mL)	Limite de Quantificação (ng/mL)
KONINGS, 1999	1	-
OSSEYI et al. 1998	100	-
Presente trabalho	1,31*	2,62
	100**	200

Detector operando a 290nm* e a 280nm**.

As taxas de recuperação obtidas neste estudo foram superiores às relatadas na literatura. Variaram entre 97-99%, nos dois níveis de enriquecimento em leite em pó (**Tabela 5**). Estes valores indicam uma boa taxa de recuperação para os níveis vitamínicos presentes nos alimentos enriquecidos.

Tabela 5. Comparação das taxas de recuperação do padrão de ácido fólico adicionado em dois diferentes níveis de concentração em leite em pó.

Autores	Nível I (µg/100g)	Recuperação (%)	Nível II (µg/100g)	Recuperação (%)
KONINGS, 1999	147	90±12	-	-
OSSEYI et al. 1998	308	93±5	2000	96±3
Presente trabalho	15,4	97±3	385	99±1

*Os resultados são média de 10 determinações em duplicata.

A **Tabela 6** apresenta as faixas de repetibilidade esperadas entre cinco determinações de ácido fólico em solução padrão e em leites em pó enriquecidos, com 90, 95 e 99% de confiança. Desta forma, espera-se que os valores obtidos por cinco determinações em duplicata, difiram dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada.

Tabela 6. Repetibilidade do ácido fólico em leite e em solução padrão, em dois diferentes níveis de concentração, com diferentes níveis de confiança.

Limite de confiança	Ácido Fólico*							
	Nível I (µg/100mL)		Repetibilidade		Nível II (µg/100mL)		Repetibilidade	
	Pad.	Leite	Pad.	Leite	Pad.	Leite	Pad.	Leite
90% t=2,13	10,6	11,7	0,73	2.79	253	316	1,13	2.40
95% t=2,78			0,96	3.64			1,47	3.14
99% t=4,60			1,59	6.00			2,43	5.20

*Valores são média de cinco determinações em duplicata.
t – t de Student

CONCLUSÕES

O tempo de 5 minutos, após o término de cada corrida, para o re-equilíbrio da coluna, foi necessário para melhorar a reprodutibilidade do método de análise.

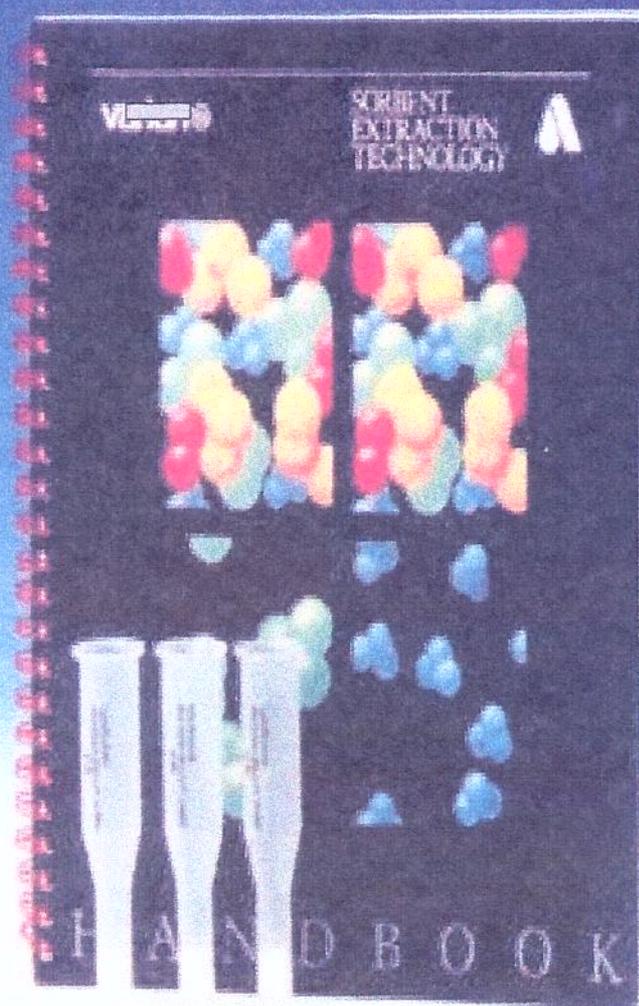
O detector operando a 290nm permitiu a determinação de AF em leites em pó enriquecidos, melhorando sensivelmente a resolução do cromatograma, o que possibilitou também limites de detecção e quantificação menores.

A simplicidade e rapidez, aliadas aos dados de recuperação e repetibilidade, recomendam a aplicação da metodologia na determinação de ácido fólico em alimentos enriquecidos.

Recomenda-se que a metodologia aqui otimizada e validada seja comparada com a metodologia oficial da AOAC (microbiológico), o que não pode ser realizado em nosso laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, T.S. **Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B1, B2, B6, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos**, Campinas, 1996.
- BRANFMAN A R.; McCOMISH, M. Rapid separation of folic acid derivates by paired-ion high-performace liquid chromatography. **Journal of Chromatography**. **151**: 87-89, 1978.
- CARVALHO, P.R.N. **Segundo seminário sobre alimentos enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996.
- CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistic for analytical chemists**. 1ed. Londres, 1983.
- CLARKE, R; SMITH A.D; JOBST K.A; REFSUM, H; SUTTON, L; UELAND, P.M. Folate, vitamin B12 and serum homocysteine levels in confirmed Alzheimer's disease. **Arch Nerurol**. vol 11. p 1449-1455, 1998
- FINGLAS, P.M.; FAURE, U.; WAGSTAFFE, P.J. Improvements in the determination of vitamins in food through intercomparisons of RMs for vitamin analysis within the BCR programme. **Journal Analytical Chemistry**. **345**: 180-184, 1993.
- FINGLAS, P.M.; WIGERTZ, K.; VAHTERISTO, L.; WITTHÖFT, C.; SOUTHON, S.; FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**. **64**: 245-255, 1999.
- GIOVANNUCCI, E; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; HUNTER, D.J.; FUCHS C.; ROSNER B.A. Multivitamin use, folate and colon cancer in women in the nurses health study. **Ann International Medicin**. **129**. p 517-524, 1995
- GLYNN, S.A; ALBANES, D; PIETINEN, P; BROWN C.C; RAUTALAHTIM; TANGREA, J.A. Colorectal cancer and folate status: a nested case-control study among male smokers. **Cancer Epidemiol Biomarkers**. vol 5. p 487-494, 1996
- HOLLMAN, P. C.; SLANGE, J. H.; WAGSTAFFE, J. P.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D. A. T.; FINGLAS, P. M. Intercomparison of methods for the determination of vitamins in food. **Analyst**. **118**: 481-488, 1993.
- KONINGS, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. **Journal of Association of Official Agricultural Chemists International**. **82** (1): 119-127, 1999.
- NIGARD, O; NORDREHAUG J.E; REFSUM H; UELAND P.M; FARSTAD M; VOLLSET, S.E. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. **New England Journal of Medicine** . vol 337. p 230-236, 1997.
- OSSEYI, E. S.; WEHLING, R.L.; ALBRECHT, J. A. Liquid chromatographic method for determination added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**. vol 826 (2). p 235-240, 1998.
- TUCKER, K.L. ; MAHNKEN, B ; WILSON, P.W.F. ; JACQUES, P. ; SELHUB, J. Folic acid fortification of the food supply. Potential benefits and risks for the Elderly population. **Jounal of the American Medical Association**. vol. 276/23. p. 1879-1885, 1996
- TSAL, M.Y; WELGE, B.G; HANSON, N.Q; BIGNELL, M.K; VESSEY, J; SHWICHTENBERG, K; YANG, F; BULLEMER, F.E; RASMUSSEN, R; GRAHAM, K.J; Genetic cause of mild hiperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery disease. **Atherosclerosis** . vol 143. p 163-170, 1999



CAPÍTULO 4

APLICAÇÃO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES E PRODUTOS LÁCTEOS

Trabalho a ser submetido à revista **Sociedade Brasileira de Ciência e
Tecnologia**

APLICAÇÃO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES E PRODUTOS LÁCTEOS

Ramos, Rodrigo Catharino; Godoy, Helena Teixeira
Depto. Ciências de Alimentos – Fac. de Engenharia de Alimentos – UNICAMP – SP – Brazil
CP – 6121 CEP – 13083-970
e-mail: helena@fea.unicamp.br

RESUMO

O mercado brasileiro, recentemente, vem oferecendo uma grande variedade de leite e alguns produtos lácteos enriquecidos com ácido fólico (AF). No entanto, poucos métodos para a análise de AF estão disponíveis na literatura. Alguns sugerem a utilização de extração em fase sólida (SPE) que solucionariam, em parte, alguns problemas na determinação dessa vitamina. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da extração em fase sólida na limpeza da amostra e pré-concentração de vitamina utilizando vários tipos de cartuchos (C_{18} , Si, NH_2 , CN, e diferentes trocadores aniônicos), para posterior análise por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). A extração em fase sólida foi feita de acordo com OSSEYI et al. (1998), com pequenas modificações nos volumes de solventes para o condicionamento e eluição dos cartuchos. De todos os cartuchos comerciais utilizados e os empacotados no próprio laboratório, as colunas de SAX (BaKer 7091-3) foram as únicas que apresentaram resultados satisfatórios com taxas de recuperação acima de 96% para as amostras. Entretanto, comparando os teores de AF obtidos utilizando a extração líquido-líquido, proposta por CATHARINO e GODOY (2000), a SPE apresentou sempre valores inferiores. Para amostras de queijo tipo *petit suisse* a SPE não pode ser aplicada, necessitando de um maior preparo da amostra antes do seu uso. As condições cromatográficas empregadas para análise de AF foram coluna C_{18} , com gradiente de eluição. A detecção foi feita a 290nm e a quantificação por padronização externa. A CLAE mostrou que os extratos obtidos de SPE foram ligeiramente mais limpos, no entanto a eficiência do sistema

cromatográfico não foi influenciada por esse fator. Os dados desse estudo apontam a não necessidade do uso de SPE em leites e produtos lácteos enriquecidos.

ABSTRACT

Brazilian market has been recently offering a great variety of milk and some milk products enriched with folic (FA). Nevertheless, few methods for FA analysis are available in literature. Some suggest the use of solid phase extraction (SPE) which would partly solve few problems to determine this vitamin. The objective of this work was to evaluate the efficiency of solid phase extraction in the clean-up of the sample and pre-concentration of vitamin by using several types of cartridge (C₁₈, Si, NH₂, CN, and different anionic changers) to farther analysis by high performance liquid chromatography (HPLC). The solid phase extraction was made in accordance with OSSEYI et al. (1998), with some tiny modifications in the volume of solvent for conditioning and elution of the cartridges. From all the commercial cartridges used and the ones packed in the laboratory, the columns of SAX (Baker 7091-3) were the only ones presenting satisfactory results, with recovering taxes over 96% for the samples. However, comparing the obtaining data, and by using the extraction liquid-liquid proposed by CATHARINO e GODOY (2000), SPE has always resulted in inferior to the extraction liquid-liquid, a meanful difference in some milks. For *peti suisse* type cheese the SPE cannot applied, necessity more preparation of the sample before its use. In chromatographic process a C18 column was used with mobile-phase using gradient elution. Detection was obtained with ultraviolet detector, at 290nm, and quantified using external standards. The chromatograms obtained showed the SPE extract was a little more clean than liquid-liquid extract, but it is not influence in the performance of the analysis. The data of this study point out the needless of using SPE milks and enriched milky products.

INTRODUÇÃO

Novas descobertas sobre a ação do AF e da sua importância nos alimentos e no organismo foram feitas nesta última década. Hoje, os pesquisadores estão convencidos que o ácido fólico é indispensável a dieta humana e animal, exatamente por estar diretamente ligado a processos bioquímicos importantes.

O ácido fólico e os folatos são encontradas em diversas fontes alimentares, principalmente, nas verduras frescas, fígado, leite, leveduras e algumas frutas. Contudo, nos dias atuais, a ingestão de uma dieta insuficiente em folatos tem levado a deficiência dessa vitamina. O processo de enriquecimento aumenta a qualidade dos alimentos e pode vir a ser uma das soluções empregadas para resolver o problema da ingestão insuficiente de AF. Entre os alimentos escolhidos para o enriquecimento, leites e cereais, de uma maneira geral, são os produtos mais comumente adicionados de AF. O leite em pó enriquecido é uma das principais fontes de alimentação para crianças de 0 a 2 anos. Seu acesso fácil e preparo, preços mais compatíveis e, principalmente, por colaborar com um melhor desenvolvimento da criança são os principais motivos para o favorecimento do seu consumo.

Os métodos empregados no momento para a determinação de ácido fólico e folatos em alimentos apresentam muitos inconvenientes como, a baixa confiabilidade, precisão e sensibilidade, lentidão na análise e exatidão questionável (BRUBACKER et al., 1985). A CLAE tem sido desenvolvida nos últimos anos em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão (PARRISH, 1984; GREGORY, 1985; JACOBY e HENRY, 1992; MULLIN e DUCH, 1992; TANNER et al., 1993; VAHTERISTO et al., 1997; CATHARINO e GODOY, 2000). Mesmo com essas qualidades a boa resolução de um sistema cromatográfico é influenciado pelas características do extrato. Extratos mais limpos e concentrações mais altas dos compostos de interesse, além de promoverem o aumento da vida útil da coluna e facilitar a identificação e quantificação, são sempre desejáveis.

VATHERISTO et al. (1996), OSSEYI, et al. (1998) e STOKES e WEBB (1999) foram os pioneiros na utilização da extração em fase sólida (SPE) para limpeza e pré-concentração dos folatos. Os cartuchos mais comumente utilizados para a extração são os trocadores aniônicos fortes, como as colunas SAX (amina quaternária, Baker 7091-3).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o procedimento de extração em fase sólida para limpeza e concentração do AF em leites e produtos lácteos enriquecidos, utilizando uma metodologia por CLAE, em comparação com a extração líquido/líquido, proposto por CATHARINO e GODOY (2000).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

As amostras analisadas foram constituídas de duas (2) marcas diferentes de leite em pó enriquecidos com ácido fólico, destinados ao consumo infantil, um complemento alimentar, um leite fluído, dois (2) tipos de leites especiais e duas (2) marcas de queijo tipo *petit suisse*. Todos os produtos foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Campinas/S.P., constituindo-se de pelo menos três lotes diferentes (diferentes datas de fabricação) para cada produto, para cada marca. Todos os produtos estavam dentro dos prazos de validade regular e sem danos aparentes.

Padrão

Padrão de ácido fólico foi doado pela M Cassab do Brasil S.A., obtido da Sigma (St. Louis, MO, USA) código 7876. Uma solução estoque foi preparada dissolvendo-se o ácido fólico em tampão de fosfato dibásico de potássio 0,1mol/L, a um pH de 8,5 a 9,0, com uma concentração correspondente a 20µg/mL. A solução trabalho foi preparada a partir da diluição da solução estoque, em concentrações numa faixa de 0,1 a 1,0µg/mL, com solução tampão de fosfato dibásico de potássio.

Equipamentos

Para análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100µL, detector de arranjo de diodos (DAD) da HP série

1100. O software HP-Chemstation, além de controlar todos os parâmetros nos diversos componentes do equipamento, permitiu também o tratamento de dados.

Extração (líquido/líquido)

Todas as amostras foram previamente homogeneizadas. Tomou-se cerca de 1,0g ou 1,0mL de amostra e adicionaram 3mL de KOH (0,1mol/L). Após 10 minutos em ultra-som, 3mL de ácido fosfórico (0,1mol/L) e 350µL de ácido tricloroacético foram colocados e o volume completado a 10mL com tampão fosfato (pH 6,5). Seguiu-se a filtração em membrana durapore (HVLP 01300 MILLIPORE), 0,45µm, antes da injeção no cromatógrafo (100µL) (CATHARINO & GODOY, 2000).

Extração em fase sólida (SPE)

Foram tomadas 1,0g (mL) de amostra aos quais foram adicionados 3mL de KOH (0,1mol/L). A solução foi mantida no ultra-som (10 minutos) antes da aplicação nos cartuchos de SPE. Para extração em fase sólida, foram utilizados cartuchos (400 mg) comerciais de Absorbex (Merck) de C₁₈, Si, NH₂ e CN e trocadores aniônicos fortes como as colunas SAX (amina quartenária, Baker 7091-3). Alguns cartuchos (400mg) foram preparados no próprio laboratório empregando amberlite (Carlo Erba), ion-x-AS (solid core anion exchanger- Perkin Elmer), MP 5080 (trocador de ânions fortemente alcalino-Merck), grau I e III. Cetrimida e poliacrilamida, também foram testadas. Para todos os cartuchos seguiu-se o procedimento esquematizado abaixo, uma modificação do método desenvolvido por OSSEYI et al. (1998).

1. Condicionar: 3mL de metanol seguido de 3mL de tampão KH₂PO₄ 0,1mol/L;
2. Carregar: 3mL de amostra ou de padrão de AF;
3. Limpar: 3mL de tampão KH₂PO₄ 0,02 mol/L;
4. Eluir: 3mL de acetato de sódio, contendo 5% Na₂HPO₄, pH 4,5.

Soluções padrão de ácido fólico, em dois níveis diferentes de concentração, 0,1 e 1,0µg/mL, foram aplicados aos cartuchos para teste de recuperação.

Método cromatográfico

A etapa cromatográfica foi conduzida segundo parâmetros cromatográficos já estabelecidos por CATHARINO e GODOY (2000). Foi utilizada coluna de fase reversa Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 150 x 4,6 mm d.i (Raimin Instrument Company), protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5 μ m, 10X4,6 mm d.i. (VARIAN). O sistema de eluição foi por gradiente, iniciando com 10% de acetonitrila e 90% de fase aquosa tamponada (0,166 mol/L de ácido acético e 0,01 mol/L de KOH), chegando em 8,5 min. com 24% de acetonitrila e 76% de fase aquosa tamponada. A vazão foi mantida a 0,5 mL/min e detector operando a 290 nm. A identificação do ácido fólico foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrão, co-cromatografia e espectros de absorção obtidos pelo DAD. A quantificação foi realizada através de calibração externa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na extração em fase sólida, no emprego de cartuchos comerciais C₁₈, quando da passagem do primeiro eluente, obteve-se uma solução esbranquiçada, em consequência do arraste da fase estacionária ocasionada pelo tampão. Com os cartuchos de Absorbex-NH₂, Si e CN o problema foi a não passagem da amostra, e portanto, essas quatro primeiras tentativas foram frustradas.

Foram empacotadas no próprio laboratório colunas de 400mg de poliacrilamida, cetrimida e dos diferentes trocadores aniônicos, citados anteriormente. Na coluna de poliacrilamida o ácido fólico não sofreu nenhuma retenção e na empacotada com cetrimida foi encontrado ácido fólico em todos os eluatos, demonstrando parcial retenção. Com os cartuchos de amberlite e ion-x-AS observou-se sempre a presença de um precipitado branco ao fundo, em virtude da parcial solubilidade dos sorbentes nos diferentes solventes de eluição.

Nos fortes trocadores aniônicos básicos, o ácido fólico foi eluído com o tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, contendo hidrogênio fosfato de sódio (5%), a pH 4,5, mas os valores de recuperação obtidos foram baixos, ficando na faixa de 47 a 72%. Os cartuchos comerciais SAX foram os que produziram os melhores resultados. A vazão foi mantida a 20 gotas por minuto com auxílio de uma bomba de vácuo. As taxas de recuperação obtida com padrões, em dois níveis de concentração (0,1 μ g/mL e 1,0 μ g/mL), e com amostras fortificadas (0,025 μ g/mL a 0,6 μ g/mL)

ficaram em torno de 98 a 99% para os padrões e 96 á 98% para as amostras. Estes valores estão de acordo com os apresentados por OSSEYI et al. (1998) e VATHERISTO et al. (1996), que trabalhando com cereais matinais e com vegetais, respectivamente, tiveram uma recuperação em torno de 97 a 99% para as amostras.

Devido ao preço elevado dos cartuchos SAX foram feitos testes para o seu reaproveitamento. Mesmo após várias tentativas de limpeza e recondicionamento com diferentes solventes, principalmente, água, acetonitrila, metanol e K_2HPO_4 , a reutilização do cartucho para amostras de leite não foi possível.

A extração em fase sólida foi comparada com a extração líquido/líquido. A **Figura 1** apresenta os cromatogramas de dois extratos de leite esterilizado enriquecido, utilizando os dois tipos de extração. Como pode ser observado a utilização de SPE é totalmente dispensável neste tipo de amostra com o sistema cromatográfico utilizando, embora o extrato se apresente, ligeiramente, mais limpo. O mesmo ocorreu para as amostras de leite em pó. A **Tabela 1** apresenta os teores de ácido fólico nos produtos analisados, utilizando as duas técnicas de extração. Para as amostras de queijo tipo *petit suisse* não foi possível a utilização da SPE, porque tais amostras não passaram pelos cartuchos, mesmo após diluições maiores em KOH. O sobrenadante, resultante da centrifugação (4000 rpm por 10 minutos) dessa amostra, também não passou pelo cartucho. Os resultados da SPE mostraram-se sempre inferiores, quando comparados a extração líquido/líquido, provavelmente em virtude da maior manipulação da amostra.

Os níveis de ácido fólico determinados, no geral, estavam de acordo com os teores apresentados nos rótulos dos produtos. Em algumas das amostras analisadas, próximas das datas de fabricação, foi observada uma tendência a valores maiores em relação aos rótulos, fato esperado já que as indústrias sempre adicionam quantidades um pouco superiores para garantir os níveis da vitamina nos produtos até o fim da vida de prateleira dos mesmos. Em uma amostra de queijo tipo *petit suisse* (marca B), não foi encontrado AF, e no leite especial F o teor de vitamina foi de apenas 60% em relação ao valor declarado.

Tabela 1. Comparação dos teores de ácido fólico em leites e produtos lácteos fortificados, utilizando extração líquido/líquido e em fase sólida.

Amostras/Marcas	*Ácido Fólico ($\mu\text{g}/100\text{g}$ ou 100 mL)		
	liq/liq	SPE	**Rótulo
Queijo tipo petit suisse A	$30,0 \pm 0,1$	NA	22,5
Queijo tipo petit suisse B	ND	NA	22,5
Leite em pó-fórmula infantil C	$64,9 \pm 0,2\text{a}$	$62,3 \pm 0,8\text{b}$	58
Leite em pó-fórmula infantil D	$78,7 \pm 0,7\text{a}$	$75,9 \pm 0,9\text{b}$	78
Leite especial E	$128,9 \pm 0,8\text{a}$	$109 \pm 2\text{b}$	110
Leite especial F	$90,9 \pm 0,2\text{a}$	$85,4 \pm 0,7\text{a}$	150
Leite fluído G	$39 \pm 1\text{a}$	$37,4 \pm 0,8\text{b}$	32,5
Leite complemento alimentar	$335,5 \pm 0,5$	$326 \pm 1\text{b}$	320

* Média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; liq/liq – extração líquido/ líquido; SPE- extração em fase sólida; NA- amostra não passou pelo cartucho de SPE; ND – não detectado; **valor de AF declarado no rótulo do produto. Letras diferentes na mesma linha significam haver diferença significativa ao nível de 90%.

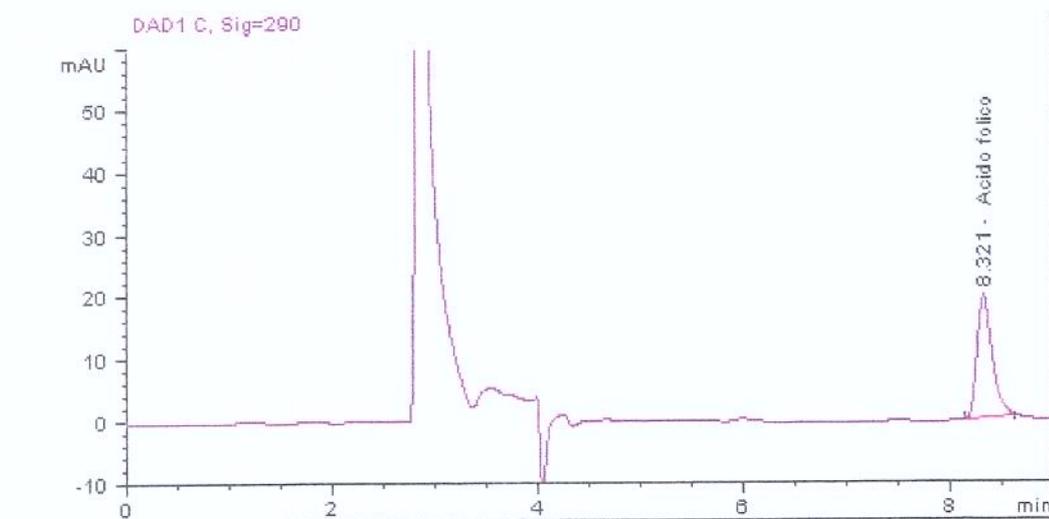
CONCLUSÕES

Das colunas comerciais de extração em fase sólida testadas, somente a SAX (amina quaternária, Baker 7091-3) mostrou-se efetiva para a determinação de ácido fólico em leites.

Nas amostras de leites enriquecidos, quando comparadas com a extração líquido/líquido, a extração em fase sólida resultou sempre em valores menores de ácido fólico.

Devido ao seu alto custo agregado (US\$10/cartucho), somando com a impossibilidade de reutilização dos cartuchos de SPE e uma pequena melhora na limpeza do extrato, faz com que o analista opte por outros métodos de extração e limpeza para a análise de ácido fólico em produtos lácteos enriquecidos.

A)



B)

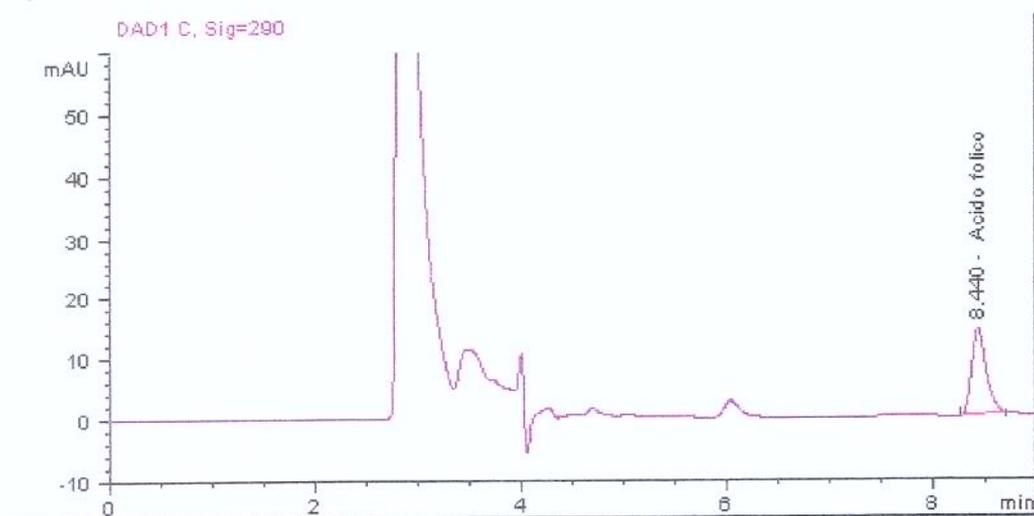
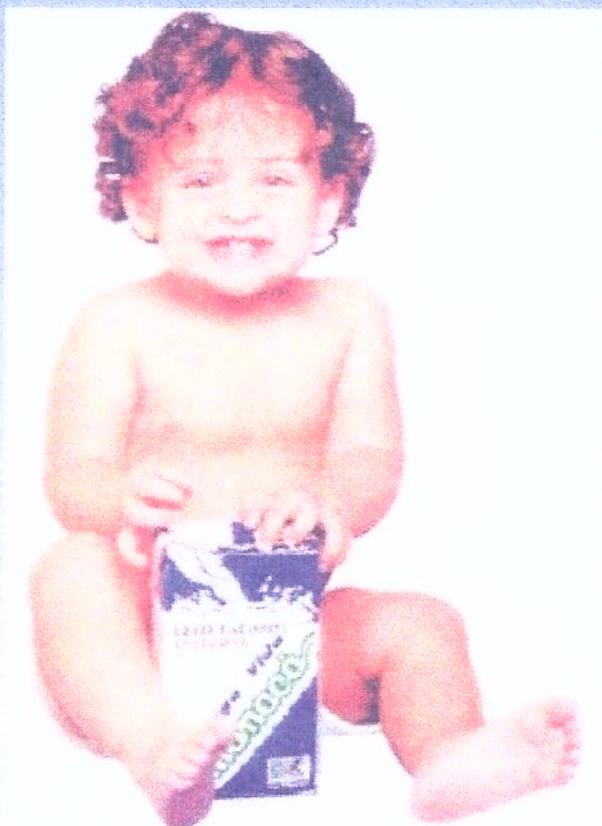


Figura 1. Cromatograma do extrato (A) obtido na extração em fase sólida e (B) na extração líquido/líquido.. Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0166mol/L) (v/v), no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de tampão acetato (0166mol/L) e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUBACKER G.; MULLER – MULLOT, W; SOUTHGATE, D.A.T, **Methods for the Determination of Vitamins in Food, Recommended by COST 91**, Elsevier Applied Science Publishers, New York, 1985.
- CATHARINO R.R.; GODOY H. T. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Capítulo 3, 2000.
- GREGORY, J.F. Folic acid In: AUGUSTIN J.; KLEIN, B.P.; BECKER, D; VENUGOPAL, P.B. **Methods of vitamin assay**. 4ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1985.
- JACOBY, B.T. ; HENRY, F.T. Liquid chromatographic determination of folic acid in infant formula and adult medical nutritionals. **Journal of AOAC International**, **75**(5): 891-898, 1992.
- MULLIN, R.J. ; DUCH, D.S. Folic acid In: De LEENHEER, A.P.; LAMBERT, W.E.; NELIS, H.J. **Modern chromatographic analysis of vitamins**. Vol. 4ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1992.
- OSSEYI, E. S.; WEHLING, R.L.; ALBRECHT, J. A. Liquid chromatographic method for determination added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, **826** (2): 235-240, 1998.
- PARRISH, D.B. Recent developments in chromatography of vitamins in foods And feeds In: LAWRENCE, J.F. **Food constituents and food residues Their chromatographic determination**. 2ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1984.
- STOKES, P; WEBB, K. Analysis of some folate monoglutamates by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. I **Journal of Chromatography A**, **864** (1): 59-67, 1999.
- TANNER, J.T. ; BARNETT, S.A. ; MOUNTFORD, M.K. ; Analysis of milk-based infant formula. Phase v. vitamins a and e, folic acid, and pantothenic acid : food and drug administration-infant formula council: collaborativa study. **Journal of AOAC International**, **76**(2): 399-413, 1993.
- VAHTERISTO L. T, OLLILAINEN V, KOIVISTOINEN, P. E; VARO P. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. **Journal Agriculture Food Chemistry**, **44** : 477-482, 1996.
- VAHTERISTO L. T, OLLILAINEN V, VARO P, Application of HPLC assay for The determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland **Food Chemistry**, **59**(4): 589-597, 1997.



CAPÍTULO 5

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM PRODUTOS LÁCTEOS ENRIQUECIDOS

Trabalho a ser submetido à revista **Food Science**

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM PRODUTOS LÁCTEOS ENRIQUECIDOS

Catharino, R.R. e Godoy, H.T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos
C.P. 6121 CEP 13083-970
robit@bol.com.br

RESUMO

Folatos são encontrados em diversas fontes alimentares, principalmente nas verduras frescas, fígados, leveduras e algumas frutas. Contudo, nos dias atuais, a ingestão de uma dieta insuficiente em folatos tem levado a deficiência dessa vitamina. O processo de enriquecimento aumenta a qualidade dos alimentos e pode vir a ser uma das soluções empregadas para resolver o problema da ingestão insuficiente de folatos. Os produtos lácteos no Brasil vem sendo enriquecido com ácido fólico (AF), sendo uma excelente fonte de alimentação para crianças e adultos. Seu fácil acesso e preços mais compatíveis são os principais motivos para o favorecimento do seu consumo. Visando garantir a confiabilidade dos produtos enriquecidos, o objetivo deste trabalho foi determinar os teores de AF em amostras de leite em pó, leite esterelizado, bebidas lácteas e queijo tipo *petit suisse* enriquecidos com ácido fólico. A metodologia empregada utilizou solução de KOH (0,1mol/L) para a extração através de vibração ultra-sônica e limpeza do extrato com ácido tricloroacético. A separação foi feita em coluna C₁₈, protegida por coluna de guarda, com eluição por gradiente, utilizando tampão acetato e acetonitrila (90:10 v/v) no início da corrida, atingindo em 8,5 minutos a proporção de (76:24 v/v), mantendo-a até o final da corrida (9 minutos). O tempo de re-equilíbrio da coluna foi de 5 minutos. A detecção foi feita na região do do ultra-violeta (290nm) e a quantificação por padronização externa. Dos vinte e cinco produtos analisados, dezesseis apresentaram teores de ácido fólico bem próximos aos declarados nos rótulos, outros sete apresentaram teores abaixo do declarado, principalmente os leites esterilizados e as bebidas lácteas, e em duas das três amostras de queijo tipo *petit suisse* não foi detectado a presença da vitamina.

ABSTRACT

Folates are found in several nutritional sources, mainly in greens, liver and some fruits. Nevertheless, at present, the ingestion of an insufficient diet in folates has led to the lack of this vitamin. The process of enrichment increases the quality of foods and can mean one of the solutions used to solve the problem of insufficient ingestion of folates. The milky products in Brazil have been enriched with folic acid (FA), and it is an excellent source of nutrition for children as well as for adults. As it is easy to be accessed and the prices are more compatible, these are the main reasons for its consumption. The goal is to guarantee the confidence on products bound for consumption, the objective of this research was to evaluate the levels of folic acid in enriched products powdered whole milk, sterilized milk, flavoured lactic beverage and *petit suisse* type cheese. The methodology employed extraction of the vitamin with KOH (0,1mol/L) and ultrasonic vibration and the clean-up of the extract with trichloroacetic acid. The separation of the vitamin was carried out on a C₁₈ column, protected with guard-column, with gradient elution, starting at buffer acetate and acetonitrile (90:10 v/v), increasing to buffer acetate and acetonitrile (76:24 v/v) after 8,5 minutes, remaining this conditions until the end of the run (9 min), requiring a further 5 minutes to re-equilibrate the column. Detection was obtained in the ultraviolet region (290nm) and the quantification by external standard curve. Of the 25 enriched products analysed, 16 showed folic acid levels equal than those declared on the label, whilst in 7 products the values were below those declared, these being mainly sterilized milk samples and milk based beverages, and in two of the three sample of *petit suisse* type cheese the vitamin was not detected.

INTRODUÇÃO:

Estudos recentes em muitos países têm mostrado que o ácido fólico está sendo ingerido em quantidades inadequadas. O nível de ácido fólico é insuficiente em certos grupos de pessoas de países desenvolvidos, entretanto a extensão dessa deficiência é

mínima, comparados com problemas nutricionais existentes em países em desenvolvimento (SGARBIERI, 1996).

O FDA (Food Drug Administration) nos USA, desde 1996, determinou que o ácido fólico deveria ser adicionado (140µg/100g) em produtos como cereais, incluindo a farinha, pão, cereais de refeição, arroz, e macarrão, normativa com efeito a partir de Janeiro de 1998 (CARVALHO, 1996 ; MOSHFEGH et al., 1998).

Os alimentos enriquecidos, juntamente com uma orientação nutricional, podem vir a solucionar o problema ocasionado pela dieta insuficiente de folatos, pois, é uma vitamina extremamente importante, porém, pouco conhecida e estudada (CARVALHO, 1996 ; TAMURA e MESSING, 1997; DANG et al., 2000).

Além da presença de alguns folatos naturais, como o tetraidrofolato e do metiltetraidrofolato (HOLT et al., 1988; VAHTERISTO et al., 1997; KONINGS, 1999), o leite e os derivados lácteos tem sido adicionados de ácido fólico, através da fortificação. Entretanto, durante os processos de fabricação e estocagem dos produtos lácteos podem ocorrer perdas até mesmo da vitamina adicionada.

Poucos são os métodos que determinam com confiança os teores de AF, muitas vezes os problemas estão relacionados às baixas quantidades da vitamina, mesmo em produtos enriquecidos (FRANCO, 1992).

Os métodos microbiológicos foram os mais empregados para a determinação de AF (GOLI e VANDERSLICE, 1989; KELLY et al., 1996; HORNE e HOLLOWAY, 1997; RADER et al., 1998). Porém, hoje a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), está sendo cada vez mais aplicada, por vários pesquisadores, na determinação dessa vitamina, em consequência de sua rapidez, automação e precisão (VATHARISTO et al., 1996; KONINGS, 1999; RUGGERI et al., 1999; CATHARINO e GODOY, 2000)

O objetivo deste trabalho foi de avaliar os teores de ácido fólico em leites e derivados lácteos enriquecidos, utilizando uma metodologia por CLAE, desenvolvida por CATHARINO e GODOY (2000).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

As amostras analisadas foram constituídas de quatro (4) diferentes produtos alimentícios enriquecidos com ácido fólico, sendo: leites esterilizados, leites em pó, bebidas lácteas prontas para o consumo e queijos tipo *petit suisse*. Os leites aqui analisados, na sua maioria, são produtos especiais destinados, principalmente, para crianças em desenvolvimento e gestantes. Todas as amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas/ SP. As determinações foram feitas em três diferentes lotes, diferenciados pelas datas de fabricação, recolhidos aleatoriamente nos estabelecimentos comerciais. Todos os produtos estavam dentro dos prazos de validade regular e sem danos aparentes. As análises foram realizadas, no mínimo, em duplicatas para cada amostra, totalizando 75 amostras analisadas.

REAGENTES

O padrão de ácido fólico foi doado pela M Cassab do Brasil S.A. (SIGMA cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila grau cromatográfico, o ácido acético, o ácido fosfórico e o hidróxido de potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. A água utilizada no preparo das amostras e das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros fluopore (FHLP 04700 MILLIPORE), com poros de 0,45 μ m de diâmetro.

EQUIPAMENTOS

Para análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com alça de amostragem de 1 a 100 μ L de capacidade. Para separação do ácido fólico foi utilizada uma coluna cromatográfica Microsorb ODS-2 5 μ m, 150mmX4,6mm d.i. (Rainin Instrument Company), protegida por

uma coluna de guarda Bondesil, C₁₈, 5µm, 10X4,6mm d.i. (VARIAN), e para a detecção, um detector de arranjo de diodos (DAD) da HP série 1100. Acoplado ao sistema um software HP-Chemstation, que além de monitorar todos os componentes, permitiu um melhor tratamento dos dados.

MÉTODOS

Para análise foram tomados 1,0mL para os produtos líquidos e 1,0g para o leite em pó e queijo tipo *petit suisse*, previamente homogeneizados. No caso deste último, foram homogeneizados pelo menos 3 embalagens de 45g. O ácido fólico foi extraído com 3mL de solução de hidróxido de potássio (0,1mol/L) em banho ultra-sônico por 10 minutos, a mistura foi transferida quantitativamente para balões volumétricos de 10 mL, onde posteriormente foram adicionados 3 mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 3mL de tampão fosfato composto por Na₂HPO₄ (0,25mol/L)/ KH₂PO₄ (0,37mol/L), 350µL de ácido tricloroacético e o volume completado com tampão fosfato. Após agitação seguiram-se duas etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a segunda em membrana durapore (HVLP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45 µm. O filtrado foi imediatamente injetado no cromatógrafo. O volume de injeção foi de 100µL.

Para a separação do AF foi utilizado eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min. A fase móvel utilizada no início da corrida foi composta de 90% de tampão acetato (TPAC), contendo 0,166mol/L de ácido acético e 0,01mol/L hidróxido de potássio, em pH 2,8) e 10% de acetonitrila(ACN), chegando em 8,5 minutos à 76%TPAC e 24% ACN (v/v), mantendo-se essa proporção até 9,0 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 5 minutos, antes da próxima injeção. O AF foi detectado a 290nm. A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com o padrão nas mesmas condições, co-cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção obtidos com a utilização do detector de arranjo de diodos (**Anexo 1**). Pelo sistema ploter, disponível no software HP-Chemstation, foi observada a pureza do pico. A quantificação foi feita por padronização externa (**Anexo 3**), sendo que a curva analítica foi construída com 6 níveis de concentração (2,6; 5,2; 10,5; 105; 525; 1050ng/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os perfis cromatográficos dos extratos de leite em pó, leite esterilizado, bebida láctea sabor chocolate e queijo tipo *petit suisse*.

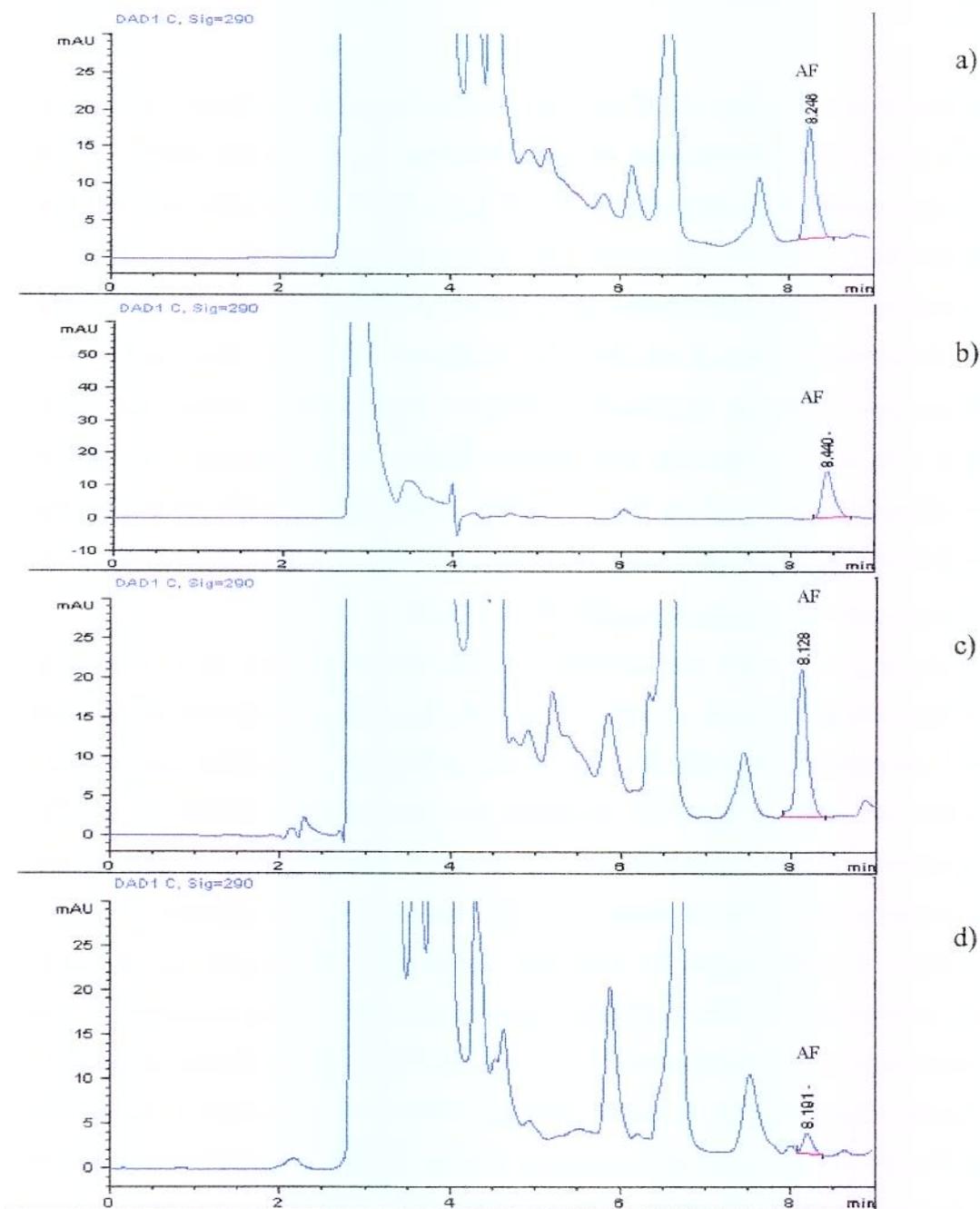


Figura 1. Cromatogramas de (a) leite em pó LPO; (b) leite esterilizado LLD; (c) bebida láctea AA; e (d) queijo tipo *petit suisse* YA enriquecidos com ácido fólico (AF). Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0166mol/L) (v/v) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de tampão acetato (0166mol/L) e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto.

As **Tabelas 1 a 4** apresentam os teores de AF nos produtos analisados neste trabalho. Para as 14 amostras lácteas em pó (**Tabela 1**), apenas as amostras LPL e LPS apresentaram concentrações de AF abaixo das especificadas em rótulo. A amostra LPL apresentou apenas 18,4µg/100g de vitamina, contra 73µg/100g declarados. Na amostra LPS o valor encontrado representou apenas 62% das 150µg/100g descrito na embalagem. As demais amostras apresentaram concentrações de acordo com os valores declarados, ou com pequenas variações em relação a este.

Para os leites esterilizados (**Tabela 2**), apenas as amostras LLC tinham concentração de AF ligeiramente superior à declarada no rótulo. As amostras LLB apresentaram apenas 75% de AF em relação ao especificado no rótulo. Já as amostras LLA e LLD, embora indicassem a presença de 300µg/100mL de ácido fólico, continham apenas 37,9 e 55 µg/100mL, respectivamente. O mesmo ocorreu com as bebidas lácteas enriquecidas (**Tabela 3**). Apenas as amostras AD apresentaram níveis de AF compatíveis com o declarado na embalagem, as amostras AA níveis 30% mais baixos e as demais apresentavam apenas 25% do declarado.

Somente 3 amostras de queijo tipo *petit suisse* enriquecidas com AF foram encontradas no mercado. A amostra YA continha AF de acordo com o especificado, mas nas amostras YPA e YPB, produzidas pelo mesmo fabricante, não foi detectada a vitamina.

Os produtos lácteos são matrizes bastante complexas e mesmo com a etapa de limpeza realizada com o ácido tricloroacético, observou-se que em média a cada 60 injeções ocorria elevação de pressão no sistema cromatográfico, em decorrência do entupimento da coluna de guarda. Após a troca da mesma o sistema retornava as condições normais de trabalho.

Estudo de Prateleira com Queijo tipo Petit Suisse

Entre as amostras aqui analisadas, a de queijo tipo *petit suisse* é a que apresentava a menor vida de prateleira (30 dias) e portanto foi utilizada para uma avaliação da estabilidade do AF presente nesse produto. Apenas duas marcas de queijo tipo *petit suisse* enriquecidos com ácido fólico foram encontradas no mercado. A marca YP comercializa dois tipos, sabor leite e frutas com cereais, entretanto em nenhum deles foi encontrada a

vitamina. A marca YA comercializa apenas 1 produto (queijo tipo *petit suisse* multi-cereais) e neste foi encontrado, cinco dias após a fabricação, $30,02 \pm 0,05$ ($\mu\text{g}/100\text{g}$) de ácido fólico, o que corresponde a 40% das necessidades diárias, quantidade que supera a declarada na embalagem do produto (30%) Ao final do prazo de validade (30 dias) foi detectado apenas $10,1 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/100\text{g}$ de ácido fólico, quantidade três vezes menor ao valor encontrado inicialmente, fornecendo apenas 15% das necessidades diárias. A **Figura 2** mostra a variação do teor de ácido fólico durante a validade da amostra.

CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida se mostrou bastante eficaz para a quantificação do ácido fólico em produtos lácteos enriquecidos, no entanto os resultados apontam problemas em relação aos produtos líquidos enriquecidos, provavelmente pela maior instabilidade da vitamina.

Produtos como o queijo tipo *petit suisse* não são recomendados para o enriquecimento com ácido fólico ou devem ser consumidos nos primeiros quinze dias após a fabricação, o que representa metade da vida de prateleira do produto.

Concluí-se que o enriquecimento em produtos lácteos realmente é feito, entretanto, é necessário um melhor estudo de prateleira e das características do produto em relação ao AF, para um melhor planejamento da adição⁸⁵ desta vitamina nesses produtos.

Tabela 1. Concentração de ácido fólico em leite em pó enriquecido.

Amostra/Lote	PV (meses)	*Rótulo ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	AF ($\mu\text{g}/100\text{g}$) M \pm DP	CV (%)
LPA1	10	320	342,5 \pm 0,06	0,0
LPA2	7		335,4 \pm 0,5	0,2
LPA3	5		351,7 \pm 0,2	0,1
Média entre lotes			343 \pm 7	2,0
LPK1	9	58	64,9 \pm 0,2	0,3
LPK2	8		59,3 \pm 0,1	0,2
LPK3	8		59,0 \pm 0,7	0,2
Média entre lotes			61 \pm 3	4,9
LPO1	9	250	276,5 \pm 0,9	0,3
LPO2	8		257,0 \pm 0,9	0,4
LPO3	7		254,1 \pm 0,4	0,2
Média entre lotes			262 \pm 10	3,8
LPB1	5	45	40,9 \pm 0,8	2,0
LPB2	7		39,5 \pm 0,1	0,3
LPB3	8		40,9 \pm 0,1	0,2
Média entre lotes			40,5 \pm 0,7	1,7
LPC1	9	140	142,3 \pm 0,5	0,4
LPC2	10		143,7 \pm 0,5	0,4
LPC3	11		145,4 \pm 0,4	0,3
Média entre lotes			144 \pm 1	0,7
LPD1	9	43	47,3 \pm 0,3	0,6
LPD2	10		48,1 \pm 0,4	0,8
LPD3	11		51,3 \pm 0,3	0,6
Média entre lotes			49 \pm 2	4,1
LPF1	10	46	51,7 \pm 0,6	1,2
LPF2	11		53,4 \pm 0,5	0,9
LPF3	12		54,1 \pm 0,6	1,1
Média entre lotes			53 \pm 1	1,9
LPG1	9	140	132,4 \pm 0,7	0,5
LPG2	10		133,4 \pm 0,9	0,7
LPG3	12		146 \pm 1	0,7
Média entre lotes			137 \pm 6	4,4
LPI1	10	44	47,5 \pm 0,2	0,4
LPI2	11		51,2 \pm 0,1	0,2
LPI3	12		51,7 \pm 0,2	0,4
Média entre lotes			50 \pm 2	4,0
LPL1	8	73	17,9 \pm 0,5	2,8
LPL2	9		18,1 \pm 0,8	4,4
LPL3	10		19,2 \pm 0,6	3,1
Média entre lotes			18,4 \pm 0,6	3,3
LPP1	7	250	276,47 \pm 0,9	0,3
LPP2	8		257,0 \pm 0,9	0,4
LPP3	10		254,1 \pm 0,4	0,2
Média entre lotes			263 \pm 10	3,8
LPM1	9	110	134,6 \pm 0,5	0,4
LPM2	10		137,9 \pm 0,4	0,3
LPM3	11		140,6 \pm 0,3	0,2
Média entre lotes			139 \pm 1	0,7
LPS1	5	150	87,8 \pm 0,2	0,2
LPS2	5		88,4 \pm 0,3	0,3
LPS3	6		103,1 \pm 0,3	0,3
Média entre lotes			93 \pm 7	7,5
LPU1	6	246	203,5 \pm 1,2	0,5
LPU2	7		212,7 \pm 0,8	0,4
LPU3	9		278,6 \pm 0,7	0,3
Média entre lotes			231 \pm 33	14,3

PV – prazo de validade, tempo em meses em que o produto ainda pode ser consumido.

*Concentração de AF descrita na embalagem do produto; M \pm D P média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação.

Tabela 2. Concentração de ácido fólico em leites esterilizados enriquecidos.

Amostra/Lote	PV (meses)	*Rótulo ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	AF ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) M \pm DP	CV (%)
LLA1	9	300	38,9 \pm 0,1	0,3
LLA2	9		37,9 \pm 0,3	0,8
LLA3	9		37 \pm 1	3,5
Média entre lotes			37,9 \pm 0,8	2,1
LLB1	10	20	16,2 \pm 0,9	5,6
LLB2	9		16 \pm 1	6,3
LLB3	8		12,9 \pm 0,8	6,2
Média entre lotes			15 \pm 1	6,7
LLC1	10	32,5	39 \pm 1	3,1
LLC2	10		38 \pm 1	3,4
LLC3	9		38 \pm 1	3,7
Média entre lotes			38,1 \pm 0,5	1,3
LLD1	10	300	49,0 \pm 0,5	1,0
LLD2	11		56,0 \pm 0,6	1,1
LLD3	12		58,9 \pm 0,3	0,5
Média entre lotes			54 \pm 4	7,4

PV – prazo de validade, tempo em meses em que o produto ainda pode ser consumido.

*Concentração de AF descrita na embalagem do produto; M \pm D P média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação.

Tabela 3. Concentração de ácido fólico em bebidas lácteas enriquecidas.

Amostra/Lote	PV (meses)	*Rótulo ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	AF ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) M \pm DP	CV (%)
AA1	3	333	171,8 \pm 0,8	0,5
AA2	4		262,5 \pm 0,7	0,3
AA3	4		278,6 \pm 0,6	0,2
Média entre lotes			237 \pm 46	19,4
AB1	2	300	60,1 \pm 0,2	0,3
AB2	3		78,1 \pm 0,5	0,6
AB3	4		80,1 \pm 0,5	0,6
Média entre lotes			72 \pm 9	12,5
AC1	3	300	43,1 \pm 0,5	1,2
AC2	3		48,7 \pm 0,7	1,4
AC3	4		104,6 \pm 0,8	0,8
Média entre lotes			65 \pm 27	41,5
AD1	4	32,5	38,3 \pm 0,5	1,3
AD2	4		38,6 \pm 0,4	1,0
AD3	4		39,0 \pm 0,5	1,3
Média entre lotes			38,6 \pm 0,3	0,78

PV – prazo de validade, tempo em meses em que o produto ainda pode ser consumido.

*Concentração de AF descrita na embalagem do produto; M \pm D P média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação.

Tabela 4. Concentração de ácido fólico em queijo tipo petit suisse enriquecido.

Amostra/Lote	PV (dias)	*Rótulo (µg/100g)	AF (µg/100g) M ± DP	CV (%)
YA1	25	25,5	30,0±0,1	0,3
YA2	24		26,7±0,4	1,5
YA3	25		27,9±0,3	1,1
Média entre lotes			28±1	3,6
YPA1	27	25,5	ND	
YPA2	27		ND	
YPA3	24		ND	
Média entre lotes				
YPB1	26	25,50	ND	
YPB2	25		ND	
YPB3	24		ND	
Média entre lotes				

PV – prazo de validade, tempo em dias em que o produto ainda pode ser consumido.

*Concentração de AF descrita na embalagem do produto; M ± D P média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação.

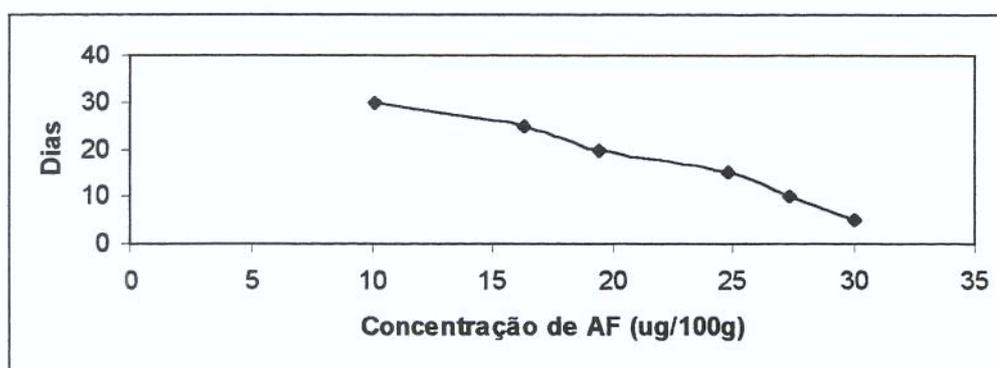


Figura 2. Variação da concentração do ácido fólico em queijo tipo *petit suisse*, durante a vida de prateleira do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, P.R.N. **Segundo seminário sobre alimentos enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996.
- CATHARINO R.R.; GODOY H. T. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Capítulo 3, 2000.
- DANG, J.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A. Folate retention in selected processed legumes. **Food Chemistry**. **68** (3): 295-298, 2000.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
- Food Drug Administration – Portaria, 1996.**
- GOLI, D.M.; VADERSLICE J.T. Microbiological assay of folacin using a CO2 analyzer system. **Journal of Micronutrient Analysis**. **6** (1): 19-33, 1989.
- HOLT, D. L.; WEHLING, R.D.; ZEECE, M. G.; Determination of native folates in milk and other dairy products by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, **449**: 271-279, 1988.
- HORNE, D.W.; HOLLOWAY R.S. Compartmentation of folate metabolism in rat pancreas: nitrous oxide inactivation of methionine synthase leads to accumulation of 5-methyltetrahydrofolate in cytosol. **Journal of Nutrition**. **127** (9): 1772-1775, 1997.
- KELLY, P. ; MCPARTLIN J. ; SCOTT J. A combined high-performance-liquid chromatographic-microbiological assay for serum folic acid. **Analytical Biochemistry**. **238** (2): 179-183, 1996.
- KONINGS, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. **Journal of AOAC International**. **82** (1): 119-127, 1999.
- MOSHFEGH A.J. ; COOK A.J. ; HO J.W. ; FRIDAY J.E. Folate intakes. **Food Surveys Research Group**. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.
- RADER, J.I. ; WEAVER, C.M. ; AGYAL G.; Use of microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. **Food Chemistry**. **62** (4): 451-465, 1998.
- RUGGERI, S.; VATHERISTO, L.T.; AGGUZZI, A.; FINGLAS, P.; CARNOVALE, E. Determination of folate vitamers in food and italian reference diet by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. **855** (1):237-245, 1999.
- SGARBIERI, V.C. Nutrição e tecnologia de alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **20** (3/4), 115-139, 1996.
- TAMURA, T. ; MESSING, B. Bioavailability of folic acid in fortified food. **American Journal of Clinical Nutrition**. **66** (6): 1299-1300, 1997.
- VAHTERISTO L. T, OLLILAINEN V, KOIVISTOINEN, P. E; VARO P. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. **Journal Agriculture Food Chemistry**. **44** : 477-482, 1996.
- VAHTERISTO L. T, OLLILAINEN V, VARO P. Application of HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland, **Food Chemistry**. **59** (4.): 589-597, 1997.



CAPÍTULO 6

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO, POR CLAE, EM CEREAIS MATINAIS E FARINHAS LÁCTEAS

Trabalho a ser submetido à revista **Journal of AOAC International**

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO, POR CLAE, EM CEREAIS MATINAIS E FARINHAS LÁCTEAS

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

RESUMO

A popularização do ácido fólico (AF) aumentou muito nos últimos dez anos devido aos inúmeros estudos que apontam a deficiência dessa vitamina como possível causa de doenças graves que assolam a humanidade como é o caso das malformações congênitas, doenças cardíacas e o câncer. Todas essas descobertas têm levado alguns governos a implantar programas de enriquecimento de alimentos e uma política elucidativa sobre a importância do ácido fólico. Porém trabalhos para garantir a qualidade dos produtos enriquecidos com o AF são escassos e as metodologias desenvolvidas com esse propósito muitas vezes são impossíveis de serem reproduzidas nos laboratórios nacionais de análise de alimentos. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar os níveis de enriquecimento de AF entre os diferentes tipos e marcas de cereais matinais e farinhas lácteas aplicando uma metodologia simples e rápida utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. Foram analisados 3 diferentes lotes de 9 amostras de cereais matinais e 2 amostras de farinhas lácteas enriquecidas com AF. O ácido fólico foi extraído com KOH (0,1mol/L) e acetonitrila (3:1) v/v, através de vibração ultra-sônica, e a limpeza feita com ácido tricloroacético. A vitamina foi separada em coluna de C₁₈, protegida com coluna de guarda, com eluição por gradiente formado por 90% tampão acetato e 10% acetonitrila (ACN) no início da corrida, chegando a 76% de fase tamponada e 24% ACN em 10,5 minutos, mantendo-se essas condições até 11 minutos de corrida. A detecção foi feita a 290nm e a quantificação por padronização externa. As duas farinhas lácteas analisadas apresentaram os teores especificados nos rótulos, entretanto, das nove amostras de cereais matinais, seis

continham teores de AF bem inferiores aos do rótulo. Embora os produtos estejam sendo enriquecidos há necessidade de maior controle.

Abstract

The folic acid (AF) popularization has grown quite a lot in the last ten years due to countless studies which register the lack of this vitamin as a possible cause of serious diseases which have humanity like the bad congenital formation, cardiac diseases and cancer. All these exposures led some government to introduce enrichment programs of nutrition and an elucidatory policy about the importance of folic acid. But researches to guarantee the quality of the enriched products with folic acid are little and the methodologies development with this proposed sometimes are impossible to use in the national laboratories of food analysis. The objective of this research was to evaluate the levels of the enrichment with folic acid between different types brands of breakfast cereals and milk based mixes using a simple and speed methodology, using high performance liquid chromatography. Three different lots of 9 breakfast cereal sample and 2 milk based mixes enrichment with folic acid was analyzed. The vitamin was extracted by KOH (0,1mol/L) and acetonitrile (3:1 v/v) with ultrasonic vibration and the clean-up of the extract was carried out by the addition of trichloroacetic acid. The vitamin was separated on a C18 column, protected with guard-column, using gradient elution at 90% buffer acetate plus 10% acetonitrile, in start of the run, changing to 76% buffer acetate plus 24% acetonitrile after 10,5 minutes, remaining this conditions until 11 minutes. Detection was affected at 290nm and quantified using external standards. The both milk based mixes analyzed presented concentrations equal than those specified on the label, nevertheless, of the 9 sample of breakfast cereal, 6 presented concentrations of folic acid below those declared. The results of this study showed the need for greater control of the enrichment levels of these foods.

INTRODUÇÃO

Principalmente, a possível relação do ácido fólico com as malformações congênitas, levou o FDA (Food Drug Administration) nos USA, desde 1996, a determinar que o AF deve ser adicionado ($140\mu\text{g}/100\text{g}$) em produtos como cereais, incluindo a farinha, pão, cereais matinais, arroz, e macarrão (CARVALHO, 1994 ; MOSHFEGH et al., 1998).

Acredita-se que a importância do ácido fólico é tão grande, principalmente para mulheres em fase de gestação, que hoje existe a “Campanha Nacional do Ácido Fólico”, patrocinada pelo governo americano, com o objetivo de diminuir as doenças ocasionadas pela carência desta vitamina na dieta. No Chile, está sendo desenvolvido um estudo para verificação dos verdadeiros efeitos do ácido fólico sobre as malformações congênitas, sendo que toda a população do país está ingerindo a vitamina através do enriquecimento da farinha de trigo ($220\mu\text{g}/100\text{g}$) destinada à fabricação de pães, tendo uma estimativa de consumo de 250g de pão/dia/pessoa. O estudo deve ser concluído no final de 2002 (CASTILHO, 2000).

Nos USA a normativa de enriquecimento de cereais com ácido fólico segundo BOSTOM et al. (1999) e MALINOW et al. (1998), também está ajudando a diminuir os níveis de homocisteína em pacientes com doenças coronárias.

Segundo RADER et al. (1998), o ácido fólico é a forma mais estável dentre os folatos, sendo a mesma escolhida para o enriquecimento. Porém muito pouco se conhece a respeito da estabilidade do ácido fólico frente as condições normais de processamento. Apenas FRANCO (1992) relatou ter encontrado uma perda de 90% de AF adicionado em leites em pó quando não houve a adição simultânea de ácido ascórbico. Já efeitos do cozimento em vegetais podem levar a perda em torno de 10% de folatos, entre eles o ácido fólico, segundo KATSUNG (1994). TAMURA e MESSING (1997) já afirmam que o AF presente em cereais enriquecidos apresentou boa estabilidade frente ao processo.

Para assegurar a qualidade de produtos enriquecidos com AF estão sendo desenvolvidas e validadas novas metodologias, principalmente utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (OSSEYI et al., 1998; STOKES e WEBB, 1999; CATHARINO e GODOY, 2000).

O objetivo deste trabalho foi de determinar em cereais matinais e farinhas lácteas enriquecidas os teores de ácido fólico, utilizando CLAE.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL

As amostras analisadas foram constituídas de nove tipos de cereais matinais e duas farinhas lácteas enriquecidas. As amostras foram recolhidas em supermercados da cidade de Campinas SP, constituindo-se de pelo menos três lotes diferentes para cada produto, recolhidos aleatoriamente. Todos os produtos estavam dentro dos prazos de validade regular e sem danos aparentes. Todas as determinações foram realizadas, em duplicata.

REAGENTES

O padrão de ácido fólico foi doado pela M Cassab do Brasil S.A. (SIGMA cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila, grau cromatográfico, e o ácido acético, o ácido fosfórico, o hidróxido de potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. A água utilizada no preparo das amostras e das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros MILLIPORE, com poros de 0,45 μ m de diâmetro.

EQUIPAMENTOS

Para análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático de 1 a 100 μ L de capacidade. Para separação do ácido fólico foi utilizada uma coluna cromatográfica Microsorb ODS-2, 5 μ m, 150mmX4,6mm d.i. (Rainin Instrument Company), protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5 μ m, 10X4,6 mm d.i. (VARIAN) e para detecção, um detector de arranjo de

diodos (DAD) da HP série 1100. Acoplado ao sistema, um software HP-Chemstation, que além de monitorar todos os componentes, permitiu um melhor tratamento dos dados.

MÉTODOS

EXTRAÇÃO

Para a extração em cereais matinais pequenas modificações na metodologia desenvolvida por CATHARINO e GODOY, (2000) foram feitas. Foram tomados 1,0g de cereais matinais, previamente homogeneizados. O ácido fólico foi extraído com, aproximadamente, 3mL de solução de hidróxido de potássio (0,1mol/L) e 1mL de acetonitrila, colocado em banho ultra-sônico por dez (10) minutos. A limpeza do extrato foi feita transferindo-se quantitativamente a mistura para balões volumétricos de 10mL, adicionado mais 3mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 2mL de tampão fosfato, composto por Na_2HPO_4 (0,25mol/L)/ KH_2PO_4 (0,37mol/L) e 350 μL de ácido tricloroacético, sendo o volume aferido com tampão fosfato. Após a agitação, seguiram-se duas etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a segunda em membrana durapore (HVLP 01300 MILLIPORE), com poros 0,45 μm , antes de ser injetado (100 μL) no cromatógrafo.

CROMATOGRAFIA

O AF foi separado através de eluição por gradiente, a vazão de 0,5mL/min com 90% de tampão acetato (TPAC), contendo 0,166mol/L de ácido acético e 0,01mol/L hidróxido de potássio, a pH 2,8 e 10% de acetonitrila (ACN) no início, chegando em 10,5 minutos à 76% de TPAC e 24% ACN, mantendo essa proporção até 11,0 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 5 minutos, antes da próxima injeção. A vitamina foi detectada a 290nm. A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, co-cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção obtidos com a

utilização do detector de arranjo de diodos (**Anexo 1**). A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação do AF foi feita por padronização externa, sendo a curva analítica construída com 6 níveis de concentração (2,6; 5,2; 10,5; 105; 525; 1050ng/mL), cada ponto representado pela média de três determinações (**Anexo 3**).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do ácido fólico, recomendada por CATHARINO e GODOY (2000), apenas com solução de KOH (0,1mol/L) produziu uma solução altamente viscosa, o que dificultava e até impossibilitava as etapas seguintes. A adição de metanol ou acetonitrila na etapa de extração diminuiu consideravelmente a viscosidade, provavelmente a ação desses solventes orgânicos impediu a gelatinização do amido. Como qualquer modificação feita em um método deve ser validada, amostras de leite enriquecido com amido foram fortificadas com o ácido fólico e seguiu-se a metodologia aqui aplicada para os cereais e as farinhas. A taxa de recuperação foi de 98%.

Em consequência das características das matrizes analisadas neste estudo, uma pequena modificação no gradiente de eluição em relação ao utilizado por CATHARINO e GODOY (2000), necessitou ser feita. A mudança de 8,5 minutos para 10,5 minutos para a chegada de composição de fase móvel em (76:24) v/v de TPAC/ACN foi suficiente para separar um co-eluento, tanto nas amostras de cereais quanto de farinhas lácteas. A **Figura 1** mostra os perfis cromatográficos do extrato de uma amostra de cereal matinal e de farinha láctea enriquecidos. O **Anexo 1** mostra o perfil do espectro de absorção fornecido pelo detector de arranjo de diodos e o **Anexo 4** o grau de pureza observado para o pico correspondente ao AF. As **Tabelas 1 e 2** apresentam os teores da vitamina determinados nas amostras aqui analisadas.

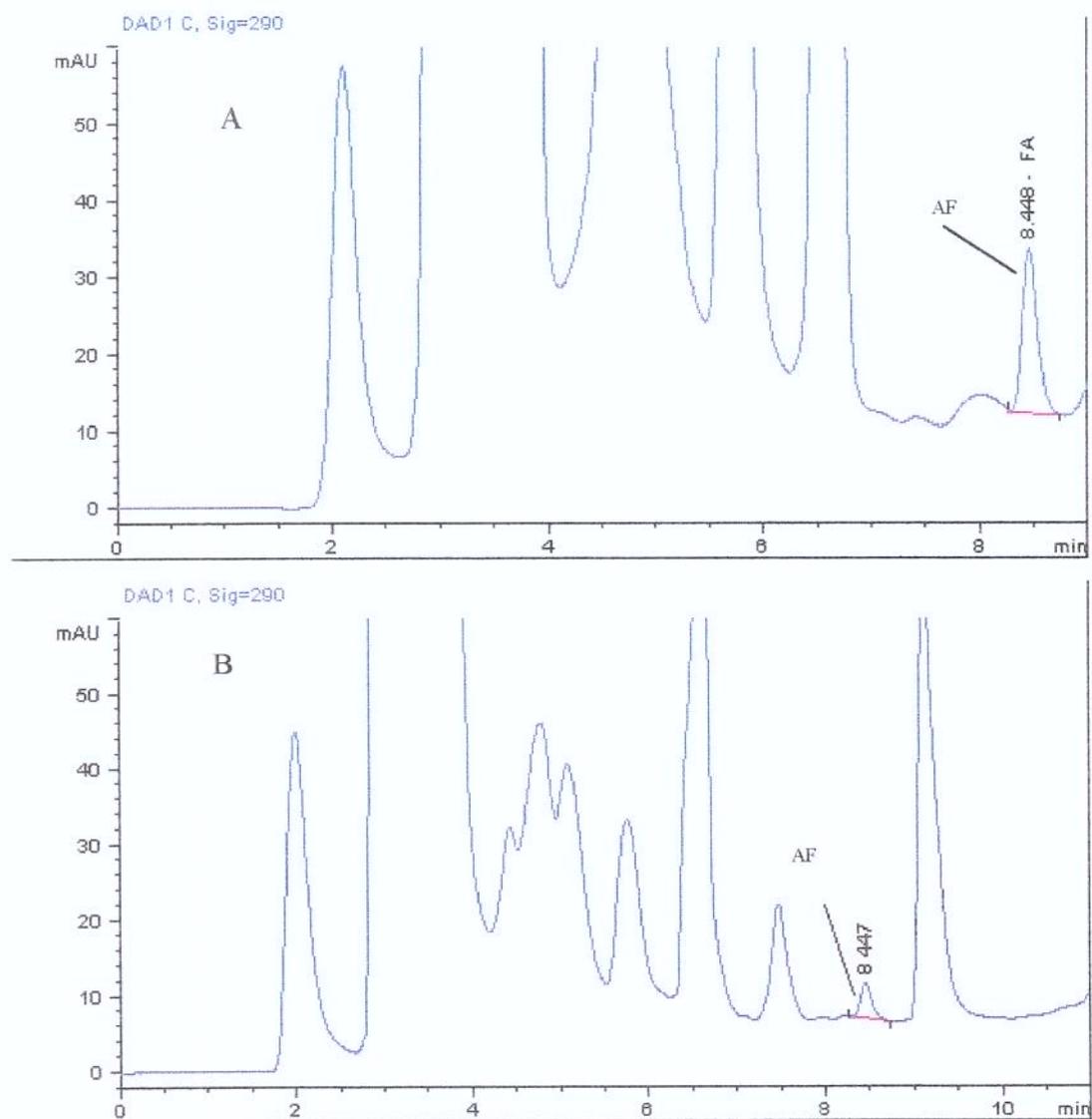


Figura 1: Cromatogramas: (A) cereal matinal KA e (B) farinha láctea FA enriquecidas com ácido fólico (AF). Coluna Microsorb, ODS-2, 5 μ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0166mol/L) (v/v), no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de tampão acetato (0166mol/L) e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto

Tabela 1: Teores de ácido fólico em cereais matinais enriquecidos.

Amostra/Lote	PV (meses)	*Rótulo ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	AF ($\mu\text{g}/100\text{g}$) M \pm D P	CV (%)
KA1	8	667	664 \pm 2	0,3
KA2	9		672 \pm 2	0,3
KA3	11		687 \pm 2	0,3
Média entre lotes			674 \pm 10	1,5
KB1	10	167	118 \pm 2	1,7
KB2	11		121 \pm 1	0,8
KB3	12		124 \pm 1	0,8
Média entre lotes			121 \pm 2	1,6
KC1	10	167	61 \pm 1	1,6
KC2	11		63 \pm 2	3,2
KC3	12		71 \pm 2	2,8
Média entre lotes			65 \pm 4	6,1
KD1	10	167	112 \pm 2	1,8
KD2	11		137 \pm 2	1,4
KD3	12		148 \pm 2	1,3
Média entre lotes			132 \pm 15	11,3
KE1	7	100	102 \pm 2	2,0
KE2	9		110 \pm 1	0,9
KE3	12		113 \pm 1	0,9
Média entre lotes			108 \pm 5	4,6
KF1	6	100	51 \pm 2	3,9
KF2	7		62 \pm 2	3,2
KF3	11		79 \pm 2	2,5
Média entre lotes			64 \pm 11	17,2
KG1	7	600	150 \pm 1	0,7
KG2	10		170 \pm 2	1,2
KG3	12		230 \pm 2	0,9
Média entre lotes			184 \pm 34	18,5
KH1	10	600	246 \pm 1	0,4
KH2	11		247 \pm 2	0,8
KH3	12		250 \pm 2	0,8
Média entre lotes			248 \pm 2	0,8
KJ1	10	125	151 \pm 3	1,3
KJ2	11		187 \pm 2	1,1
KJ3	12		202 \pm 2	1,0
Média entre lotes			180 \pm 21	11,7

PV – prazo de validade, tempo em meses em que o produto ainda pode ser consumido.

*Concentração de AF descrita na embalagem do produto; M \pm D P média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação.

As amostras KA e KE (Tabela 1) apresentam níveis muito próximos aos especificados nos rótulos dos produtos. Só as amostras KJ apresentam níveis superiores aos declarados, cerca de 43%. Observa-se pela Tabela 1 que os lotes das amostras KJ foram analisados com tempos muito próximos à data de fabricação (a validade do produto é de 12

meses), o que talvez explicasse as concentrações encontradas. O mesmo não se aplica as amostras KB, KC, KD e KH, que mesmo sendo analisadas muito próximas as datas de fabricação, apresentam teores correspondentes a 73%, 42%, 79% e 41%, respectivamente, dos declarados nos rótulos dos produtos. A amostra KG apresentou apenas 30% da vitamina. A amostra KF foi a que teve os lotes analisados com maior tempo decorrido desde a fabricação e apresentou, em média, um teor de AF 36% abaixo do declarado.

Os dados aqui obtidos sugerem uma decréscimo da quantidade de AF durante a estocagem, o que, com certeza, torna o quadro ainda mais preocupante.

Em especial, os cereais matinais mostraram ser matrizes muito complexas. A etapa de limpeza utilizando ácido tricloroacético não se mostrou muito eficiente, já que a coluna de guarda teve que ser trocada a cada 30 injeções.

Os valores referentes a concentração de ácido fólico nas farinhas lácteas enriquecidas analisadas mostraram que esses produtos continham as quantidades prescritas, embora apenas duas amostras tenham sido encontradas no mercado (**Tabela 2**).

Tabela 2: Teores de ácido fólico em farinhas lácteas enriquecidas.

Amostra/Lote	PV (meses)	*Rótulo (µg/100g)	AF (µg/100g) M ± D P	CV (%)
FA1	9	115	117±1	1,0
FA2	10		118,0±0,9	0,8
FA3	10		120,1±0,2	0,2
Média entre lotes			118±1	1,2
FB1	10	115,7	159±1	0,8
FB2	12		159,6±0,8	0,5
FB3	12		164,2±0,8	0,5
Média entre lotes			160±2	1,3

PV – prazo de validade, tempo em meses em que o produto ainda pode ser consumido.

*Concentração de AF descrita na embalagem do produto; M ± D P média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação.

CONCLUSÕES

A metodologia aplicada, com as modificações em virtude das características das matrizes aqui analisadas, se mostrou bastante eficaz para a quantificação do ácido fólico em cereais matinais e farinhas.

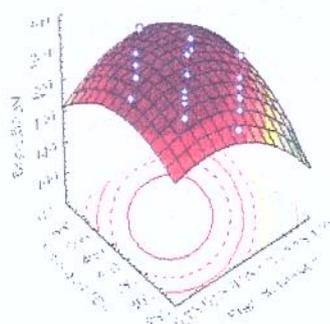
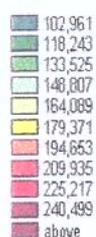
Novos métodos de limpeza devem ser estudados para matrizes como os cereais, já que o ácido tricloroacético não se mostrou tão eficiente.

Os resultados mostraram a não existência de um bom controle no enriquecimento de cereais matinais com ácido fólico pelas empresas alimentícias, enquanto que, as farinhas lácteas estão dentro das faixas especificadas em rótulo, porém, estudos de prateleira com estes produtos devem ser realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOSTOM A.G.; GOHH, R.Y.; LIAUGAUDAS G.; BEAULIEU A.J.; HAN, H.; JACQUES, P.F.; DWORKIN L.; ROSENBERG, I. H.; SELHUB, J. Prevalence of mild fasting hyperhomocysteinemia in renal transplant versus coronary artery disease patients after fortification of cereal grain flour with folic acid. **Atherosclerosis**, **145** (1): 221-224, 1999.
- CARVALHO, P.R.N. **Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1994.
- CASTILHA, E. Comunicação pessoal, 2000.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
- KATZUNG B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- MALINOW M.R.; DUELL P.B.; HESS D.L.; ANDERSON P.H.; KRUGER W.D.; PHILLIPSON B.E.; GLUCMAN R.A.; BLOCK P.C.; UPSON B.M.; Reduction of plasma homocysteine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, **338** (15): 1009-1015, 1998.
- MOSHFEGH A.J. ; COOK A.J. ; HO J.W. ; FRIDAY J.E. Folate intakes. **Food Surveys Research Group**. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.
- OSSEYI, E. S.; WEHLING, R.L.; ALBRECHT, J. A. Liquid chromatographic method for determination added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, **826** (2): 235-240, 1998.
- RADER, J.I. ; WEAVER, C.M. ; AGYAL G.; Use of microbiological assay with tri-enzyme extration for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. **Food Chemistry**, **62** (4): 451-465, 1998.
- STOKES, P; WEBB, K. Analysis of some folate monoglutamates by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. I **Journal of Chromatography A**, **864** (1): 59-67, 1999.
- TAMURA, T. ; MESSING, B. Bioavailability of folic acid in fortified food. **American Journal of Clinical Nutrition**, **66** (6): 1299-1300, 1997.

Superfície de Resposta
4 fatores, 1 Bloco, 30 ensaios; Pure Error=,57575
Concentração de AF



CAPÍTULO 7

OTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Trabalho a ser submetido à revista **Journal Liquid Chromatography**

OTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Catharino, R.R. e Godoy, H.T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos
C.P. 6121 CEP 13083-970
robit@bol.com.br

RESUMO

A etapa de extração é uma das maiores fontes de erros na determinação de vitaminas, já que estas, são compostos freqüentemente lábeis e estão presentes em concentrações muito pequenas numa matriz orgânica complexa que são os alimentos. A extração desenvolvida por CATHARINO e GODOY (2000) para análise de ácido fólico em leites enriquecidos consiste em uma técnica rápida e bastante simples, sendo por esses motivos escolhida neste estudo para ser avaliada. A análise de superfície de resposta foi aplicada para investigar as alterações na concentração de ácido fólico em leites enriquecidos frente a algumas modificações, especialmente, na etapa de extração. Foram avaliados quatro parâmetros: quantidade de amostra, tempo de extração, volume de ácido tricloroacético (TCA) e tempo de espera para injeção no equipamento. As condições pré-estabelecidas para análise de 1,0g amostra, 10 minutos no ultra-som, 350 μ L de ácido tricloroacético e injeção imediata são parâmetros que estão dentro da faixa teórica ótima, segundo os resultados obtidos pela análise da superfície de resposta, embora quantidades um pouco inferiores de amostra (0,9g) e maior volume de TCA (425 μ L) proporcionam quantidades de ácido fólico ligeiramente superiores.

ABSTRACT

The extracting stage is one of the biggest origin of mistakes in determining vitamins, once those are frequently sensitive compounds and are found in small concentrations in a complex organic matrix, or in other words, foods. The extraction step developed by CATHARINO e GODOY (2000) to folic analysis in enriched milk consists of a very simple and quick technique, that is why it was chosen in this study to be evaluated. Response surface analysis was applied to investigation modification in concentration of folic acid in enriched milks with some changes, specially, in extraction step. Four parameters have been evaluated: sample quantity, time for extraction, volume of trichloroacetic acid (TCA) and waiting time for injection in the equipment. The pre-establish conditions for analysis of 1,0g sample, 10 minutes in ultrasound, 350 μ L of trichloroacetic acid and immediate injection are parameters in an theoretical optimum average, according to the results obtained by response surface analysis, although inferior quantities of sample and larger volume of TCA (425 μ L) give a slightly superior quantity of folic acid.

INTRODUÇÃO

O ácido fólico(AF) é uma vitamina do complexo B, muito importante para a manutenção do organismo humano. Acredita-se que a deficiência de AF possa acarretar desde malformações congênitas no feto (espina bífida, encefalocele, fenda palatina e hidrocefalia) até doenças cardíacas (BRODY,1991; CZEIZEL e DUDAS, 1992; KATZUNG, 1994; ULENE e ULENE, 1995; OAKLEI et al., 1995; CRANE et al., 1995; DALY et al., 1997; RANG et al., 1997; MALINOW et al., 1998; MOSHFEGH et al., 1998).

Hoje a maioria dos países que sofrem com doenças acometidas pela falta de ácido fólico estão suplementando os alimentos com esta importante vitamina. Vários produtos enriquecidos com AF começam a ser lançados no mercado, visando auxiliar na prevenção e no controle das doenças causadas pela deficiência dessa vitamina.

Nos últimos anos várias metodologias analíticas foram desenvolvidas para a determinação e quantificação de folatos em alimentos, principalmente utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (DAY e GREGORY III, 1981; GREGORY III et al. 1984; SCHULZ et al. 1985; LUCOCK et al. 1995; VAHTERISTO et al. 1996; VAHTERISTO et al. 1997; KONINGS, 1999; CATHARINO e GODOY, 2000).

Apenas DONG et al. (1988) realizaram um extensivo trabalho observando as respostas de tempos de retenção frente a diferentes parâmetros independentes analisados, como pH de fase móvel, modificador orgânico e tipos de coluna para a análise de vitaminas do complexo B, incluindo o ácido fólico. Porém, nenhum trabalho analisou, mesmo em análise univariada, a concentração do ácido fólico frente a outros parâmetros. Não existe na literatura trabalhos que possibilitem a constatação de interações de efeitos frente a parâmetros de determinação de ácido fólico utilizando uma metodologia multivariada de superfície de resposta.

O objetivo deste estudo foi encontrar melhores condições de extração do AF em amostras de leite enriquecido a partir do método desenvolvido por CATHARINO e GODOY (2000), utilizando uma metodologia de superfície de resposta para a otimização do processo.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAS

A amostra analisada foi constituída apenas de uma marca de leite em pó enriquecida com ácido fólico (250µg/100g), destinado ao consumo. O produto estava dentro do prazo de validade regular e sem danos aparentes.

REAGENTES

O padrão de ácido fólico foi cedido pela M. CASSAB Comércio e Indústria LTDA, Santo Amaro, SP, Brasil. (SIGMA cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila, grau cromatográfico, o ácido acético, o ácido tricloroacético, o ácido fosfórico e o hidróxido de

potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. A água utilizada na preparo das amostras e das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros MILLIPORE, com poros de 0,45µm de diâmetro.

EQUIPAMENTOS

Para análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático de 1 a 100µL de capacidade. Um detector de arranjo de diodos (DAD) da HP série 1100, todos acoplado ao software HP-Chemstation.

MÉTODO

A metodologia desenvolvida por CATHARINO e GODOY, (2000) consiste em tomar cerca de 1,0g de amostra, previamente homogeneizada e adicionar 3mL de KOH 0,1mol/L. Após 10 minutos em ultra-som adicionam-se 3mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 350 µL de ácido tricloroacético e completa-se o volume com tampão fosfato (pH 6,5) para 10mL em balão volumétrico. Segue-se a filtração em membranas durapore (HVLP 01300 MILLIPORE), 0,45 µm de poro, antes da injeção no cromatógrafo. A vitamina é separada em coluna Microsorb ODS-2, 5µm, 150mmX4,6mm d.i (VARIAN) protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5µm, 10X4,6 mm d.i. (VARIAN).

DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Neste estudo foram observados alguns pontos considerados críticos na determinação do ácido fólico. Os dados experimentais obtidos a partir desses pontos, foram analisados pelo programa STATISTICA para Windows versão 5.0.

Para estudar os efeitos da quantidade de amostra, tempo de extração, volume de ácido tricloroacético (TCA) e tempo de espera para injeção no equipamento, na determinação do ácido fólico em leites enriquecidos, foi utilizado um delineamento estatístico fatorial completo 2⁴ com 4 variáveis independentes (**Tabela 1**). Para estimativa

do erro experimental foram feitas 6 replicatas do experimento correspondendo aos pontos centrais. Para medir a possibilidade da não linearidade nos valores de concentração de ácido fólico em função dos quatro fatores traçados neste experimento, oito (8) pontos axiais (alfa) foram adicionados ao planejamento no centro do experimento completo (BOX et al., 1978). Os pontos axiais consistem em uma ampliação para fora do modelo experimental, sendo que todos os pontos ficam equidistantes. O modelo experimental com os valores reais e codificados são apresentados na (Tabela 2). A resposta (Y) ou variável dependente foi a concentração de ácido fólico na amostra de leite enriquecido. As primeiras 16 linhas da Tabela 2 são suficientes para a determinação do modelo linear e são referentes ao experimento completo 2^4 a linha 17 até a linha 24 do planejamento são os pontos axiais e as 6 replicatas do experimento, que são os pontos centrais, estão da linha 25 até a linha 30.

Tabela 1. Condições pré-estabelecidas das variáveis independentes como nível superior (+), nível inferior (-), intermediário (0) e pontos axiais (α).

Variáveis	α (-)	(-)	(0)	(+)	α (+)
X ₁ Peso da Amostra (g)	0,8	0,9	1	1,1	1,2
X ₂ Tempo de Injeção (minutos)	0	15	30	45	60
X ₃ Tempo no ultra-som (minutos)	5	10	15	20	25
X ₄ Volume de TCA ^a (μ L)	275	350	425	500	575

^a TCA=ácido tricloroacético

Tabela 2: Modelo experimental com os valores reais e codificados.

Ensaio	Valores experimentais								Y ^c µg/100g
	Real ^a				Codificado ^b				
	Peso (g)	ti (min)	tu (min)	Tca (µL)	X1	X2	X3	X4	
1	0,9	15	10	350	-	-	-	-	249,51
2	1,1	15	10	350	+	-	-	-	225,81
3	0,9	45	10	350	-	+	-	-	232,90
4	1,1	45	10	350	+	+	-	-	210,42
5	0,9	15	20	350	-	-	+	-	240,70
6	1,1	15	20	350	+	-	+	-	193,81
7	0,9	45	20	350	-	+	+	-	210,60
8	1,1	45	20	350	+	+	+	-	175,57
9	0,9	15	10	500	-	-	-	+	213,99
10	1,1	15	10	500	+	-	-	+	228,41
11	0,9	45	10	500	-	+	-	+	231,50
12	1,1	45	10	500	+	+	-	+	212,44
13	0,9	15	20	500	-	-	+	+	231,62
14	1,1	15	20	500	+	-	+	+	226,94
15	0,9	45	20	500	-	+	+	+	248,58
16	1,1	45	20	500	+	+	+	+	209,77
17	0,8	30	15	425	-2	0	0	0	232,75
18	1,2	30	15	425	+2	0	0	0	206,86
19	1	0	15	425	0	-2	0	0	224,13
20	1	60	15	425	0	+2	0	0	225,76
21	1	30	5	425	0	0	-2	0	221,56
22	1	30	25	425	0	0	+2	0	222,93
23	1	30	15	275	0	0	0	-2	199,54
24	1	30	15	575	0	0	0	+2	237,60
25	1	30	15	425	0	0	0	0	253,64
26	1	30	15	425	0	0	0	0	252,52
27	1	30	15	425	0	0	0	0	252,76
28	1	30	15	425	0	0	0	0	252,60
29	1	30	15	425	0	0	0	0	254,33
30	1	30	15	425	0	0	0	0	252,48

^a Peso – peso da amostra; ti – tempo de injeção; tu – tempo de extração no ultra-som e TCA – volume de ácido tricloroacético. ^b De acordo com a Tabela 1. ^c Y concentração de ácido fólico no leite.

MÉTODO de SUPERFÍCIE de RESPOSTA

A determinação do ácido fólico foi otimizada, pois a concentração da vitamina realmente esteve ligada a todos os fatores propostos (quantidade de amostra, tempo de extração, volume de ácido tricloroacético (TCA) e tempo de espera para injeção no equipamento) para modelo experimental e o resultados formaram uma superfície que mostra as interações que ocorreram no modelo. Esta superfície é atualmente conhecida

como superfície de resposta e sua representação se dá em 3 dimensões. Sua obtenção é feita por regressão multilinear dos valores de concentração de ácido fólico no leite, traçados e realizados conforme experimento completo (**Tabela 2**). A superfície de resposta pode ser representada pela (**Equação 1**)

$$y = b_0 + b_1 + b_2 + b_3 + b_4 + b_{11} + b_{22} + b_{33} + b_{44} + b_{12} + b_{13} + b_{14} + b_{23} + b_{24} + b_{34} \quad (\text{Equação 1})$$

onde y representa a concentração de ácido fólico em $\mu\text{g}/100\text{g}$ de amostra, b_0 a média de todos os efeitos do modelo de superfície de resposta e 1, 2, 3 e 4 são as representações codificadas das variáveis peso da amostra, tempo de injeção, tempo no banho ultra-sônico e volume de ácido tricloroacético, respectivamente.

A concentração do ácido fólico no leite pode ser determinada pela (**Equação 2**) de forma real, onde o valor 253,0550 é média de efeitos do modelo e x_1 , x_2 , x_3 e x_4 são as representações reais das variáveis peso da amostra, tempo de injeção, tempo no banho ultra-sônico e volume de ácido tricloroacético, respectivamente. As aproximações quadráticas das (**Equações 1 e 2**) foram suficientes para representar a concentração de AF no leite enriquecido. Essas equações deram origem a um modelo experimental limitado pelos pontos axiais (α). A estimativa dos efeitos, o erro puro, bem como, a significância dos efeitos mostrada por (p) e t de student, para o modelo, estão na **Tabela 3**. O gráfico de pareto mostra por representação gráfica a significância dos efeitos para o modelo (**Figura 1**). A **Tabela 4** de análise de variância (ANOVA) mostra a validade do modelo pelo teste F e o resíduo que mostra a magnitude do erro experimental.

$$y = 253,0550 - 9,4587x_1 - 8,3197x_2 - 3,1146x_3 - 7,0347x_4 - 2,7354x_1^2 - 7,7097x_2^2 + 5,7937x_3^2 - 8,6284x_4^2 - 3,4706x_1x_2 - 4,5994x_1x_3 + 5,06606x_1x_4 - 1,0681x_2x_3 + 5,1669x_2x_4 + 7,9706x_3x_4 \quad (\text{Equação 2})$$

RESULTADOS

A **Tabela 2** mostra que os ensaios no ponto central (0) foram os ótimos de resposta ou seja 1,0g de amostra de leite em pó, 15 minutos no ultra-som depois da adição de 3mL de KOH (0,1mol/L), adição de 425 μ L de ácido tricloroacético com injeção após 30 minutos.

Com 95% de confiança (**Tabela 3**) verificamos que todos os efeitos estipulados são críticos para a extração, embora os fatores de maior significância para o modelo foram o efeito linear do peso da amostra e o efeito quadrático de cada fator. A medida que esses valores foram aumentados a concentração de ácido fólico diminui, ou seja, estes fatores contribuíram negativamente para a resposta (Y) do modelo.

Os fatores que apresentaram um efeito positivo sobre a resposta (Y) do modelo foram os que estão ligados ao volume de ácido tricloroacético ou ele apenas, provavelmente, porque o ácido auxilia na limpeza da amostra. Por último, observou-se que os efeitos negativos que contribuem em menor escala de forma absoluta, para a diminuição da variável de resposta no modelo, foram provenientes das variáveis tempo de injeção e tempo no banho ultra sônico.

Então, destacaram-se neste estudo as variáveis peso da amostra e o volume de ácido tricloroacético no processo de determinação de AF, sendo as mesmas fixadas nos gráficos de superfície para observação das melhores respostas (**Figura 2 e 3**).

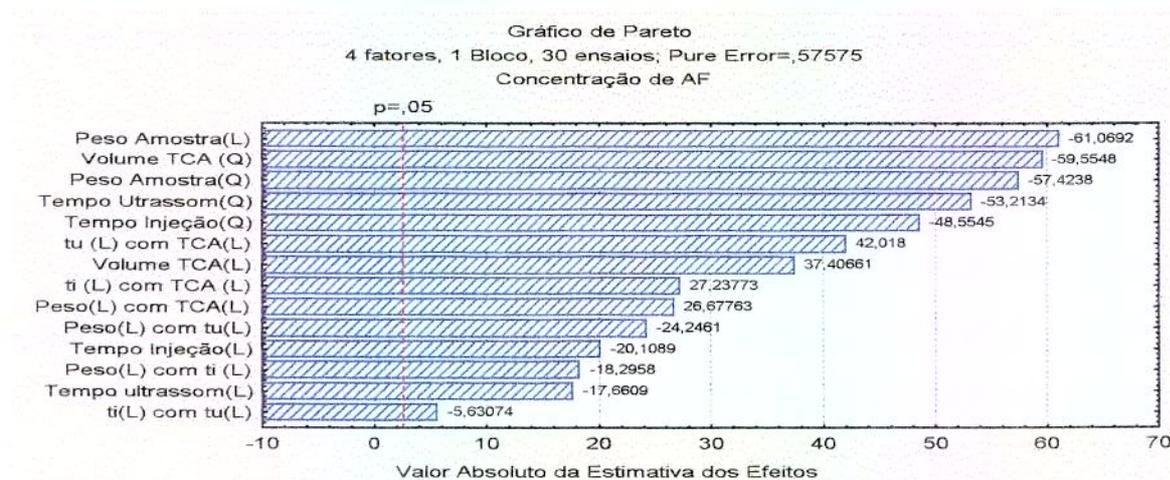


Figura 1. Representação gráfica da significância do modelo para determinação de AF em leite em pó.

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

*Estimativa dos efeitos				
Fator	Estimativa dos Efeitos	Erro puro	t (5)	p
Média	253,055	0,3097714	816,9088	5,217E-14
Var1 (L)	-18,9175	0,3097714	-61,069223	2,228E-08
Var1 (Q)	-16,639375	0,2897646	-57,423761	3,03E-08
Var2 (L)	-6,2291667	0,3097714	-20,108913	5,622E-06
Var2 (Q)	-14,069375	0,2897646	-48,554494	7,001E-08
Var3 (L)	-5,4708333	0,3097714	-17,660872	1,068E-05
Var3 (Q)	-15,419375	0,2897646	-53,213447	4,432E-08
Var4 (L)	11,5875	0,3097714	37,406614	2,572E-07
Var4 (Q)	-17,256875	0,2897646	-59,554801	2,526E-08
1 com 2	-6,94125	0,379391	-18,295771	8,969E-06
1 com 3	-9,19875	0,379391	-24,246097	2,224E-06
1 com 4	10,12125	0,379391	26,677626	1,384E-06
2 com 3	-2,13625	0,379391	-5,6307351	0,0024484
2 com 4	10,33375	0,379391	27,237734	1,248E-06
3 com 4	15,94125	0,379391	42,018002	1,44E-07

* Confiança de 95%. t de student; p – significância.

O estudo da determinação de AF com superfície de resposta mostrou uma faixa ótima de trabalho que pode ser observar com a (Figura 2). Um dos problemas enfrentados neste trabalho foi a impossibilidade de realização de forma integral do procedimento de determinação do ácido fólico em leite proposto por CATHARINO e GODOY (2000), devido ao cálculo dos pontos axiais (α), com (n) representando o número de variáveis independentes (Equação 3), estarem próximos da inviabilidade do processo prático. Contudo, a análise das representações gráficas do planejamento mostraram que o procedimento proposto por CATHARINO e GODOY (2000) está dentro da faixa teórica ótima.

$$\alpha = (2^n)^{1/4} = (2^4)^{1/4} = 2 \quad \text{(Equação 3)}$$

O F tabelado ($F_{14,15} 2,5$) foi menor que o F calculado (11,56), mostrando a validade do modelo experimental. O valor do resíduo 985,66 foi baixo quando comparado com a regressão, mostrando que o erro experimental foi pequeno.

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	10636,94	14	759,78	11,56	2,46
Resíduo	985,66	15	65,71		
Falta de ajuste	982,78	10	98,28		
Erro puro	2,88	5	0,576		
Total	11622,60	29			

Limite de confiança de 95%.

CONCLUSÃO

Constatou-se com a análise através de superfície de resposta que as faixas de trabalho para as variáveis escolhidas estavam teoricamente dentro da faixa ótima, 1,0g de amostra de leite em pó, 10 minutos no ultra-som depois da adição de 3mL de KOH (0,1mol/L), adição de 350 μ L de ácido tricloroacético com injeção imediata, foram considerados como ótimos de resposta, com aproveitamento excelente.

O fator de maior interferência negativa foi o peso da amostra que mostrou ser a variável mais crítica no processo de determinação do ácido fólico em leite, sendo o método pouco rústico para esta variável. O fator com maior influência positiva sobre o modelo foi o volume de ácido tricloroacético, porém, até o limite quadrático, quando este passa a ter influência negativa sobre o modelo.

Pode-se também concluir que todos os efeitos estipulados como crítico na determinação foram realmente significativos, mesmo com dois efeitos, peso da amostra e volume de TCA, se destacando um pouco mais.

Sugere-se que sejam feitos mais estudos de planejamentos experimentais com faixas menores de trabalho, mantendo as mesmas variáveis independentes, para verificação dos máximos obtidos experimentalmente neste estudo.

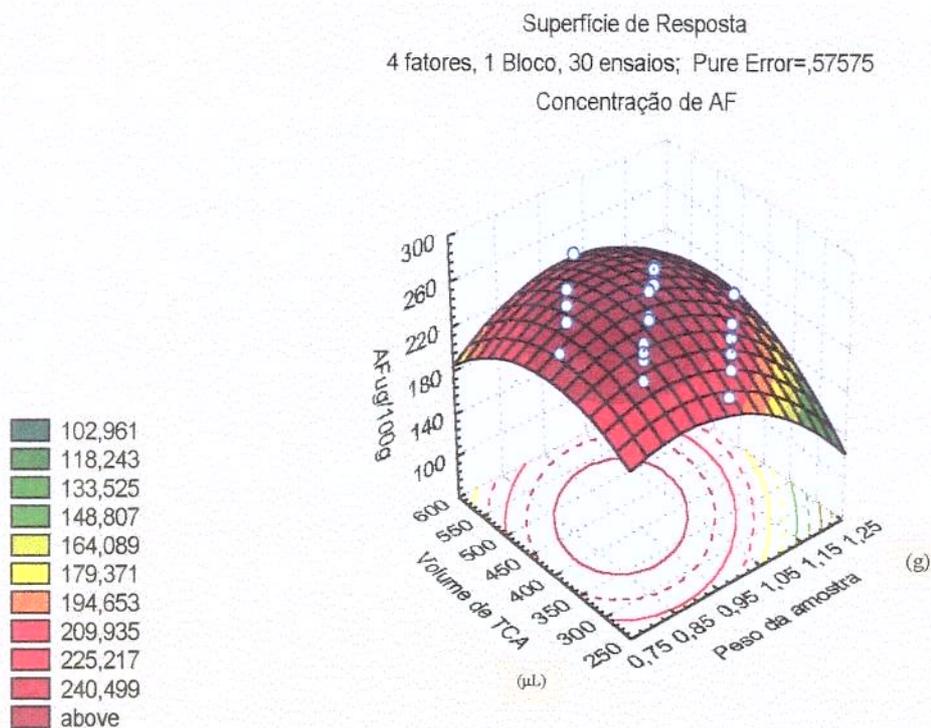


Figura 2. Superfície de resposta obtida a partir de determinação do AF de leite em pó.

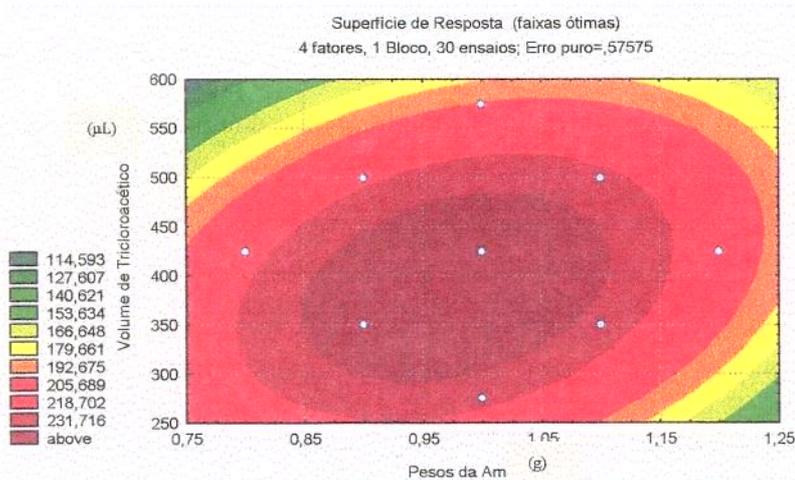


Figura 3. Faixas ótimas de trabalho a partir de determinação do AF de leite em pó.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOX, G. E. P.; HUNTER, W.G; HUNTER, J. S. **Statistic for experimenters**. An introduction to design, data analysis and model building. Nova York; Wiley, 1978.
- BRODY, T. Folic Acid In: MACHLIN L.J. **Handbook of vitamins**. 2ed. rev. and Expanded. NewYork: Marcel Dekker, 1991.
- CATHARINO R.R.; GODOY H. T. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Capítulo 3, 2000.
- CRANE, N.T. ; WILSON, D.B. ; COOK, D.A. ; LEWIS, C.J. ; YETLEY, E.A. RADER, J.I. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **American Journal of Public Health**, **85** (5): 660-666, 1995.
- CZEIZE, A.E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by perioconceptional vitamin supplementetion. **New England Journal of Medicine**, **327**: (26): 1832-1835, 1992.
- DALY, S; MILLS, J.R; MOLLOY, A.M; CONLEY, M; LEE, Y.J; KIRKE P.N; WEIR, D.G; SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**, **350**:(9092): 1666- 1669, 1997.
- DAY, B.P.; GREGORY III, J. F.; Determiation of folacin derivatives in selected foods by high-performace liquid chromatography. **Journal Agricultural Food Chemtry**, **29**: 374-377, 1981.
- DONG, M.W; LEPORE, J; TARUMOTO T. Factors affecting the ion-pair chromatography of water-soluble vitamins. **Journal of Chromatography**, **442**:81-95, 1988.
- GREGORYIII, J.F.; SARTAIN, D.B.; DAY, B.P.; Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performace liquid chromatography. **Journal Nutrition**, **114**: 341-353, 1984.
- KATZUNG B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- KONINGS, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determing folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. **Jounal of Association of Official Aricultural Chemists International**, **82** (1): 119-127, 1999.
- LUCOCK, M.D. ; GREEN, M. ; PRIESTNALL, M. ; DASKALAKIS, I. ; LEVENE &HARTLEY M.I. Optimisation of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. **Food Chemistry**,**53**: 329-338, 1995.
- MALINOW, M.R. ; DUELL, P.B. ; HESS, D.L. ; ANDERSON, P.H.; KRUGER, W.D. PHILLIPSON, B.E. ; GLUCKMAN, R.A. ; BLOCK, P.C. ; UPSON, B.M. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with Folic acid in patients with coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, **338** (15): 1009-1015, 1998.
- MOSHFEGH A.J. ; COOK A.J. ; HO J.W. ; FRIDAY J.E. Folate intakes. **Food Surveys Research Group**. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.
- OAKLEY, G.P.Jr. ; ERICKSON, J.D. ; ADAMS, M.J. Urgent need to increase folic acid consumption. **Jounal of the American Medical Association**, **274** (21): 1717-1718, 1995.

- RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M **Farmacologia**. 3.ed Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.
- SCHULZ, A.; WEIDEMANN, K.; BITSCH, I. Stabilisation of 5-CH₃H₄-Pglu and subsequent analysis by reverse phase high performace liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, **328**: 417-421, 1985.
- ULENE A.; ULENE V. **Vitaminas** . 1ed. Blumenau: EKO, 1995.
- VAHTERISTO L. T, OLLILAINEN V, KOIVISTOINEN, P. E; VARO P. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performace liquid chromatography. **Journal Agriculture Food Chemistry**, **44** : 477-482, 1996.
- VAHTERISTO L. T, OLLILAINEN V, VARO P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg, and dairy products consumed in Finland. **Journal of AOAC International**, **80** (2): 373-378, 1997.

CONCLUSÕES

O presente estudo vem propor uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), rápida simples e versátil, com possibilidades de ser empregada como análise de rotina em várias indústrias, órgãos de fiscalização e pesquisa

A extração com solução alcalina (KOH 0,1 mol/L), com vibração ultra-sônica por 10 minutos, apresenta-se eficiente na determinação de ácido fólico em produtos enriquecidos, assim como o ácido tricloroacético se mostrou como uma alternativa adequada na etapa de limpeza do extrato.

No processo cromatográfico, a eluição por gradiente é essencial para obtenção de boa resolução, quando se deseja a determinação em alimentos. Além disso, possibilita uma análise bem rápida. Os dados deste trabalho recomendam a detecção do ácido fólico a 290nm para produtos enriquecidos, devido a diminuição da interferência de outros constituintes da amostra.

Pequenas alterações nas concentrações dos modificadores orgânicos e no pH da fase móvel podem melhorar, principalmente, a separação de interferentes que eluem próximo ao ácido fólico.

O procedimento opcional de extração em fase sólida utilizando cartuchos SAX (amina quaternária, Baker 7091-3) apresentou-se como boa alternativa para a análise de ácido fólico em leites, porém devido ao seu alto custo agregado somando com a impossibilidade de reutilização do cartucho, faz com que o analista opte por outras técnicas de limpeza em produtos enriquecidos.

Constatou-se com o estudo de superfície de resposta que as faixas de trabalho para as variáveis escolhidas estavam dentro da faixa teórica ótima, 1,0g de amostra de leite em pó, 10 minutos no ultra-som depois da adição de 3mL de KOH (0,1mol/L), adição de 350 μ L de ácido tricloroacético com injeção imediata foram considerados como ótimos de resposta com aproveitamento excelente.

O limite de detecção determinado foi de 1,3ng/mL. Os resultados de recuperação e repetibilidade foram bons, nos níveis de enriquecimento dos produtos analisados.

O enriquecimento em produtos lácteos realmente é feito, entretanto, é necessário um estudo de prateleira e das características do produto em relação ao AF, para um melhor planejamento da adição desta vitamina.

Os resultados mostraram a não existência de um bom controle no enriquecimento de cereais matinais com ácido fólico pelas empresas alimentícias, enquanto que, as farinhas especiais estavam dentro das faixas especificadas em rótulo, porém, estudos de prateleira com estes produtos devem ser realizados.

SUGESTÕES

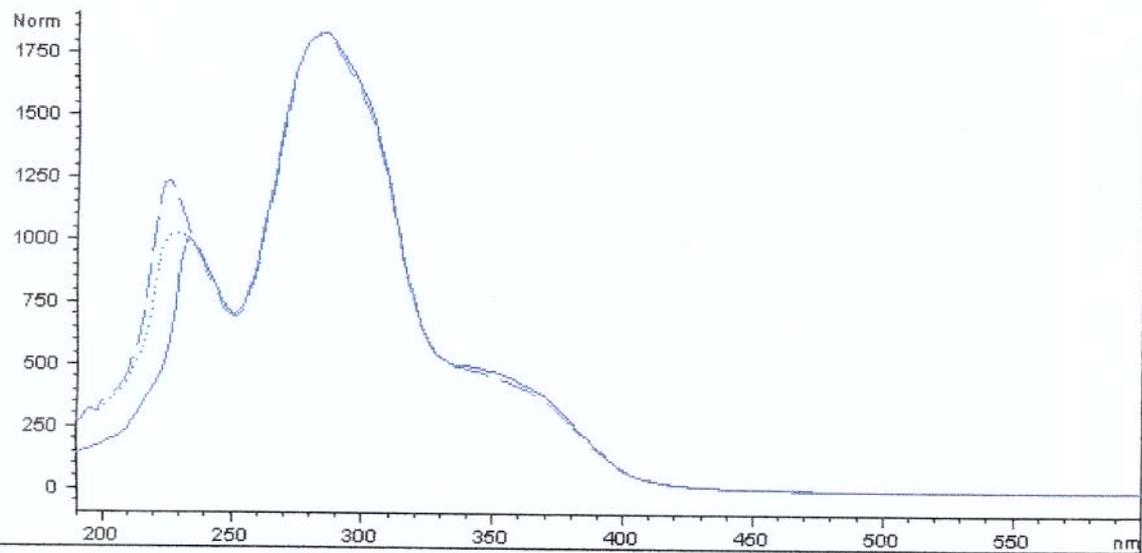
Sugerimos que os produtos, hoje produzidos pela indústria de alimentos, que contenham o ácido fólico em sua composição sejam submetido a um estudo de prateleira, visando se determinar com maior garantia a estabilidade do AF adicionado.

Extensão da metodologia para outros alimentos enriquecidos.

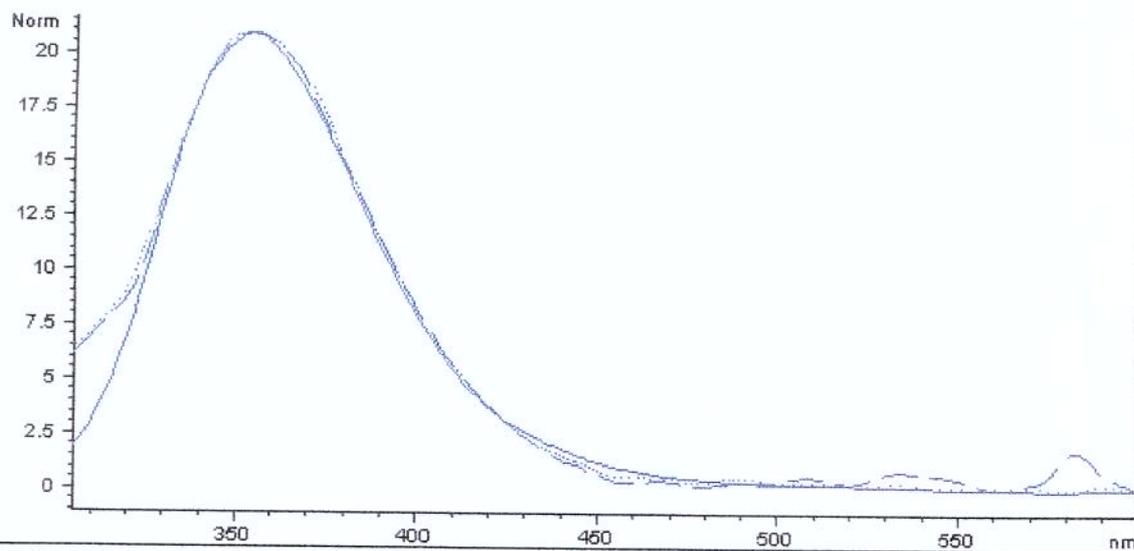
Extensão da metodologia aqui desenvolvida para premix, formulações farmacêuticas e rações.

Sugerimos, também, o desenvolvimento de um método por cromatografia líquida de alta eficiência mais abrangente, ou seja, uma metodologia que possa determinar todos os folatos incluindo o ácido fólico, em uma mesma corrida para o estabelecimento dos valores vitamínicos de alimentos não enriquecidos, auxiliando na descoberta de novos alimentos fontes de vitamina M.

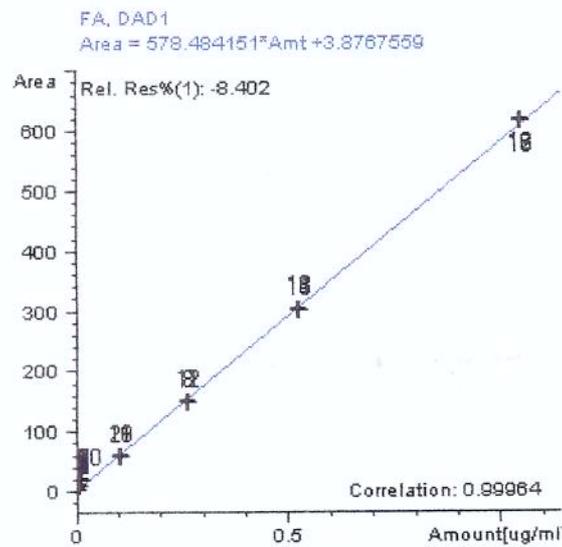
Anexos



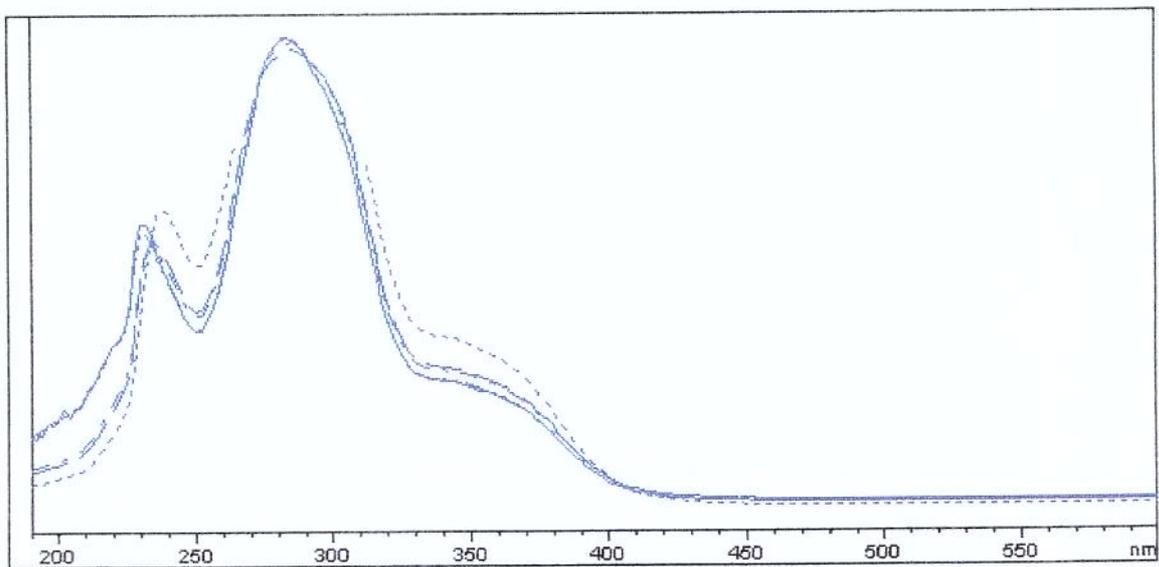
Anexo 1: Perfis dos espectros de absorção, obtidas através do detector de arranjo de diodos, do ácido fólico em solução padrão (-); leite esterelizado(...); e leite em pó (—).



Anexo 2: Perfis dos espectros de absorção, obtidos através do detector de fluorescência, do ácido fólico em solução padrão (-); leite esterelizado(...); e leite em pó (—).



Anexo 3: Curva analítica do ácido fólico obtida por padronização externa, traçada com média de triplicatas.



Anexo 4: Espectros de absorção do ácido fólico em leite esterilizado enriquecido, obtidas no detector de arranjo de diodos em vários pontos do pico, testando o grau de pureza.