



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA



Vitória Müller Rathke

Desenvolvimento e validação de um método por HPLC-DAD para a determinação de ácido fólico em farinhas de trigo

Porto Alegre, novembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Desenvolvimento e validação de um método por HPLC-DAD para a determinação
de ácido fólico em farinhas de trigo**

Monografia apresentada junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do Curso de Química Industrial, realizado na UFRGS sob a supervisão do Prof. Eliseu Rodrigues.

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

Orientador

Porto Alegre, 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Eliseu Rodrigues por toda ajuda e empenho nesse trabalho, por me ensinar a por em prática os conhecimentos sobre cromatografia, por depositar confiança em mim e por toda paciência. Ao meu chefe Jonathan Vaz Martins Silva por todo auxílio, ajuda e por acreditar que esse trabalho seria possível. Aos meus colegas de trabalho e a minha família por acreditarem que eu era capaz de chegar até aqui. As minhas grandes amigas e amigos da faculdade, principalmente à Letícia, Débora, Mariana e Pedro por toda parceria, apoio e amizade ao longo desses 5 anos.

RESUMO

A importância dos folatos para a saúde humana associada a sua perda significativa durante o processamento dos alimentos, levou o Brasil a estabelecer a obrigatoriedade de fortificação de farinhas de trigo e milho com no mínimo 150 µg de ácido fólico por 100 g de produto. O monitoramento dos níveis dessa vitamina nos produtos fortificados depende de métodos analíticos confiáveis e viáveis economicamente. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) para a determinação de ácido fólico em farinhas de trigo e milho. Além disso, o método foi aplicado em cinco amostras comerciais de farinha de trigo. Nesse método o ácido fólico foi separado em uma coluna C18 utilizando um gradiente de água e acetonitrila ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. O método foi desenvolvido e validado com sucesso, apresentando um custo baixo por amostra, facilidade na sua execução, linearidade na faixa de concentração de 0,13 a 3,00 µg.mL⁻¹, baixos valores de limites de detecção (0,04 µg.mL⁻¹) e quantificação (0,11 µg.mL⁻¹), recuperação na faixa de 96-113% e repetibilidade inferior a 10%. A aplicação do método revelou que 40% das amostras comerciais de farinha de trigo analisadas não estão de acordo com a legislação brasileira. Nossos resultados sugerem que os órgãos de fiscalização devem atuar de maneira mais efetiva no monitoramento dos níveis de ácido fólico adicionados na farinha de trigo, bem como as indústrias devem adotar um controle de qualidade maior na fortificação destes produtos.

Palavras-chave: vitaminas, ácido fólico; validação; fortificação.

ABSTRACT

The importance of folates to human health associated with their significant loss during food processing led Brazil to establish the obligatory fortification of wheat and corn flours with at least 150 g of folic acid per 100 g of product. Monitoring vitamin levels in fortified products depends on reliable and economically feasible analytical methods. In this context, the objective of this work was to develop an analytical method by high performance liquid chromatography with diode arrangement detector (HPLC-DAD) for the determination of folic acid in wheat and corn flours. In addition, the method was applied to five commercial samples of wheat flour. In this method folic acid was separated on a C18 column using a gradient of water and acetonitrile both acidified with 0.1% formic acid. The method was developed and validated successfully, presenting a low cost per sample, ease of execution, linearity in the concentration range of 0.13 to 3.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, low detection limit values (0.04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and quantification (0.11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), recovery in the range of 96-113% and repeatability less than 10%. The application of the method revealed that 40% of the commercial samples of wheat flour analyzed are not in accordance with the Brazilian legislation. Our results suggest that surveillance agencies should act more effectively in monitoring the folic acid levels added in wheat flour, as well as industries should adopt a higher quality control in the fortification of these products.

Key words: vitamins, folic acid; validation; fortification.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do ácido fólico.....	13
Figura 2: Estrutura química dos folatos (n<10)	14
Figura 3: Estabilidade do ácido fólico (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) dissolvido em diferentes soluções	23
Figura 4: Estabilidade do ácido fólico (1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) dissolvido em diferentes soluções	233
Figura 5: Estabilidade do ácido fólico (3,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) dissolvido em diferentes soluções	24
Figura 6: Curva analítica de ácido fólico.	255
Figura 7: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do padrão de ácido fólico (3,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As condições cromatográficas estão descritas no texto	255
Figura 8: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do ácido fólico de uma amostra de farinha de trigo. As condições cromatográficas estão descritas no texto.	277
Figura 9: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do ácido fólico de uma amostra de farinha de milho. As condições cromatográficas estão descritas no texto.	29

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Concentração média de folatos em alguns alimentos	14
Tabela 2: Recomendação nutricional de folatos para cada idade e sexo.....	15
Tabela 3: Porcentagem de degradação em tampão fosfato pH 7.0, tampão fosfato pH 9.0 e na fase móvel de três concentrações da curva analítica.....	24
Tabela 4: Recuperação e repetibilidade do método	26
Tabela 5: Teor de ácido fólico em amostras comerciais de farinha de trigo	27
Tabela 6: Avaliação de custos para o desenvolvimento do projeto tecnológico.....	30
Tabela 7: Avaliação de custos fixos.....	31
Tabela 8: Avaliação de custos para a análise de uma amostra em triplicata.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ICTA - Instituto de Ciência dos Alimentos

CIENTEC - Fundação de Ciência e Tecnologia

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

DAD - Detector de Arranjo de Diodos

THF - Tetrahidrofolato

5-MTHF - 5-Metiltetraidrofolato

5-FTHF - 5-Formiltetraidrofolato

UV-Vis - Espectroscopia Ultravioleta no Visível

PTFE - Politetrafluoretileno

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

DPR - Desvio-padrão Relativo

SPE - Extração em Fase Sólida

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTAS DE FIGURAS	6
LISTAS DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
SUMÁRIO	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Estrutura, propriedades químicas e físicas, importância dos folatos para a saúde e fontes.....	13
3.2 Perdas com o processamento	15
3.3 Legislação brasileira	16
3.4 Métodos para a determinação de folatos e ácido fólico em alimentos	16
4. METODOLOGIA	19
4.1 Materiais	19
4.1.1 Solventes e reagentes	19
4.1.2 Amostras.....	19
4.2 Métodos	19

4.2.1	Preparo do padrão de ácido fólico.....	19
4.2.2	Preparo da curva analítica de ácido fólico	20
4.2.3	Extração do ácido fólico da farinha de trigo	20
4.2.4	Condições cromatográficas	20
4.2.5	Quantificação	21
4.2.6	Validação do Método	21
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1	Experimentos iniciais.....	22
5.2	Validação do método	24
5.2.1	Linearidade.....	24
5.2.2	Recuperação e repetibilidade	26
5.3	Aplicação do método	26
5.3.1	Farinhas de trigo.....	27
5.3.2	Farinhas de milho	28
5.4	Avaliação de custos	29
6.	CONCLUSÃO.....	34
7.	REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

Os folatos são importantes como coenzimas no metabolismo de ácidos nucléicos e aminoácidos, atuando como mediadores nas transformações de carbonos. A deficiência severa de folatos leva à anemia megaloblástica e problemas na formação do tubo neural em fetos. Considerando isso, a suplementação ou fortificação tem sido sugerida não só para lactantes e grávidas, mas também para mulheres com intenção de engravidar. A importância dos folatos para a saúde associada a sua significativa perda durante o processamento dos alimentos, levou vários países, como o Brasil, a incluir na legislação a obrigatoriedade de fortificação de farinhas com folatos, sendo que a forma química escolhida é a de ácido fólico (ANVISA). A RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 estabelece que as farinhas de trigo e milho devem conter no mínimo 150 µg de ácido fólico a cada 100 g de produto.

O monitoramento da concentração de ácido fólico pelas indústrias produtoras de farinhas de trigo e milho depende de métodos analíticos confiáveis e viáveis economicamente. Considerando isso, neste trabalho foi conduzida a validação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) para a determinação de ácido fólico em farinhas de trigo e milho.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método e validá-lo, por HPLC-DAD, para a determinação de ácido fólico em farinhas de trigo e milho, o qual será incluído nos serviços de análise de alimentos prestados por uma empresa.

Para a realização desse objetivo foram realizadas as seguintes etapas: (1º) pesquisa na literatura dos métodos por HPLC-DAD publicados para a determinação de ácido fólico em farinhas, (2º) otimização das condições de preparo do padrão de ácido fólico (3º) validação do método por HPLC-DAD, avaliando os seguintes parâmetros analíticos: linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade e exatidão (através de testes de recuperação), e finalmente, (4º) aplicação do método validado em amostras de farinha de trigo.

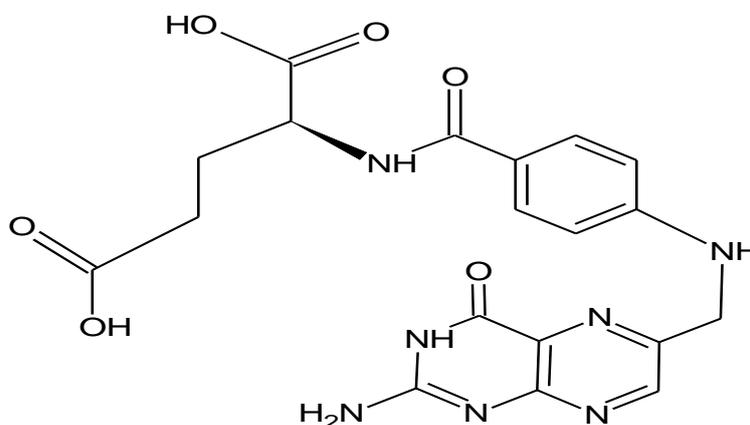
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Estrutura, propriedades químicas e físicas, importância dos folatos para a saúde e fontes

O ácido fólico ($C_{19}H_{19}N_7O_6$), também conhecido como vitamina B9, representa a forma sintética e mais estável dos folatos¹¹. A sua estrutura é composta por um grupo pteridina, um ácido *p*-amino benzoico e um resíduo de glutamato (**Figura 1**). O ácido fólico é um composto hidrossolúvel, amarelo-alaranjado, inodoro e cristalino. Ele decompõe-se a 250 °C, possui baixa solubilidade em água com pH neutro, sendo bastante solúvel em solução aquosa ácida ou alcalina e insolúvel em solventes orgânicos¹².

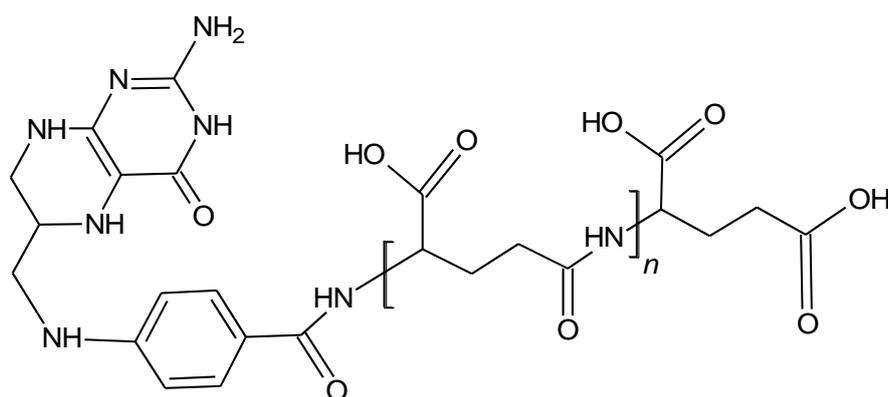
Nos alimentos a vitamina B9 está na forma de folatos. Os folatos possuem uma estrutura de ácido pteroilpoliglutâmico (**Figura 2**), com o grupo pteridina reduzido e com um número variável de resíduos de glutamato. Na **Tabela 1** estão apresentados os teores de folatos de alguns alimentos. A análise dessa tabela permite destacar alguns alimentos ricos em folatos, tais como o fígado, o farelo de trigo e o espinafre.¹²

Figura 1: Estrutura química do ácido fólico



Fonte: Autora Vitória Müller Rathke

Figura 2: Estrutura química dos folatos (n<10)



Fonte: Autora Vitória Müller Rathke

Tabela 1: Concentração média de folatos em alguns alimentos

Concentração de folatos em $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$	
Fígado de galinha cru	590
Farelo de trigo	260
Espinafre cozido	140
Brócolis cozido	110
Farinha de aveia	60
Laranja	37

Fonte: (RG-nutri 2010)

A absorção intestinal do ácido fólico da dieta é de 23-60%, enquanto nos suplementos ou alimentos enriquecidos é de 98%²³.

Os folatos são importantes para processos bioquímicos, como a formação de proteínas estruturais, hemoglobina⁵ e essenciais pra a formação dos glóbulos vermelhos, para a síntese de ácidos nucleicos e para o desenvolvimento do sistema nervoso e da medula óssea⁴. Durante a gravidez é fundamental para a saúde do feto, visto que participa do processo de multiplicação celular, formação do tubo neural, no aumento dos eritrócitos, alargamento do útero e crescimento da placenta^{2,4,5}. Os requerimentos dessa vitamina variam com o sexo, a idade, o período de gestação e lactação (**Tabela 2**).

Tabela 2: Recomendação nutricional de folatos para cada idade e sexo.

	Idade	µg por dia
Lactantes	0 a 6 meses	65
	7 a 12 meses	80
Crianças	1 a 3 anos	150
	4 a 8 anos	200
Homens	9 a 13 anos	300
	14 a 70 anos	400
	> 70 anos	400
Mulheres	9 a 13 anos	300
	14 a 70 anos	400
	> 70 anos	400
	Gravidez	600
	Lactação	500

Fonte: Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals Vitamins, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies, 2004.

3.2 Perdas com o processamento

Em alimentos, a estabilidade dos folatos é afetada pelas características da matriz, dos métodos de processamento industriais ou caseiros empregados, e de fatores como luz, pH, temperatura empregados no processamento¹³. Processos como a refrigeração, o congelamento, a desidratação, a fermentação, a pasteurização e esterilização, podem influenciar significativamente na retenção dessa vitamina nos alimentos¹⁴.

A estabilidade dos folatos é maior em meio alcalino do que em meio ácido, devido a isso se utiliza tampões neutros ou básicos tanto na extração quanto na

quantificação do ácido fólico⁷. Os folatos apresentam estabilidades diferentes, sendo o ácido fólico o mais estável e atraente para os fabricantes, já que o seu processo de fabricação é mais barato. A lixiviação é outro mecanismo importante envolvido em perdas de folatos, principalmente quando frutas e vegetais são processados em contato com a água¹⁸, como no branqueamento.

A degradação dos folatos é rápida, principalmente em temperaturas altas e em presença de oxigênio, podendo ser evitada/diminuída por antioxidantes. Em geral, o processamento de alimentos a temperaturas elevadas resulta em perdas consideráveis de folatos; a cocção dos alimentos reduz bastante o seu teor¹⁶. Por exemplo, a retenção dos folatos em vegetais após o cozimento variou de 17 para 87% no caso do Tetrahydrofolato (THF), 53 a 94% para 5-Metiltetraidrofolato (5-MTHF) e 39 a 108% para 5-formiltetraidrofolato (5-FTHF), dependendo da matriz de alimento, o tipo de isômero, e os métodos de cozimento utilizados¹⁹.

3.3 Legislação brasileira

Devido aos altos índices de anemia megaloblástica e de doenças causadas pela deficiência de folatos², o Ministério da Saúde e a Anvisa tornaram obrigatório a fortificação das farinhas de trigo e milho¹ com ácido fólico.

Em dezembro de 2002 foi publicada a Resolução – RDC no 344 que estabelece que as farinhas de trigo e de milho vendidas diretamente ao consumidor e aquelas utilizadas como matéria-prima pelas indústrias, na fabricação de outros produtos, devem ser fortificadas com no mínimo 150 µg a cada 100 g de farinha¹. A escolha desses produtos baseia-se no grande consumo da população em geral de produtos feitos a partir dessas farinhas.

3.4 Métodos para a determinação de folatos e ácido fólico em alimentos

Na literatura há um grande número de métodos descritos para a determinação de folatos e ácido fólico, os quais podem ser divididos em: (1) métodos espectrofotométricos, (2) métodos microbiológicos, e (3) métodos por cromatografia

líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando detector de fluorescência ou UV-Vis ou detector de arranjo de diodos.

A determinação de ácido fólico diretamente por espectrofotometria foi relada na literatura. Neste método o ácido fólico foi extraído usando solução de NaOH (0,1 mol.L⁻¹) e depois foi realizada a leitura no comprimento de máxima absorção do ácido fólico, ou seja, a 280 nm. Os resultados encontrados com esse método foram de 96-100 % de recuperação, 0,34 % de repetibilidade, e limites de detecção e quantificação de 0,08 e 0,24 µg.mL⁻¹, respectivamente⁸.

O método microbiológico baseia-se na relação quantitativa entre o conteúdo de folatos e o crescimento dos microrganismos a partir da medida da turbidez da solução. O crescimento dos microrganismos depende da quantidade de folatos presente na amostra, sendo que este crescimento é proporcional à turbidez do meio. Este método que requer equipamentos de baixo custo determina a quantidade total de folatos e é muito sensível. Porém, pode ocorrer interferência de outros compostos presentes na matriz que podem estimular ou inibir o crescimento dos microrganismos. Além disso, pode ocorrer interferência de outros compostos que absorvem a 280 nm, tais como proteínas e compostos fenólicos. Assim, não é um método com grande exatidão¹⁶.

Outro método utilizado é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência. Nesse método a molécula sofre derivatização pré-coluna. Pode ser utilizado um oxidante de cério (IV) tri-hidroxi-hidroperóxido de reator empacotado para a oxidação. O método é baseado na clivagem oxidativa do ácido fólico em produtos altamente fluorescentes, como 2-amino-4-hidroxipteridina, 6-carboxaldeído e o ácido 2-amino-4-hidroxipteridina-6-carboxílico²⁰. Essa técnica utiliza comprimentos de onda de excitação e emissão de 367 e 463 nm, respectivamente. O método mostrou recuperação de 99,31%, desvio-padrão relativo de 1,7% e limite de detecção de 0,07 ng.mL⁻¹²⁰.

O método mais largamente utilizado para a determinação de ácido fólico e folatos é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, tanto para farinhas quanto para outros alimentos. Nesse método já foi relatada a separação dos folatos utilizando tanto colunas C₁₈ quanto colunas C₃₀, porém, a mais amplamente utilizada é a C₁₈. As curvas analíticas obtidas apresentam uma boa linearidade, com R²>0,99¹⁵. Além disso, foram alcançados baixos limites de detecção e

quantificação, 0,06 e 0,18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente⁷, assim como recuperação de 90-104 %¹⁵.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

4.1.1 Solventes e reagentes

A acetonitrila (grau HPLC) e o metanol (grau HPLC) foram adquiridos da J.T. Baker. O ácido fórmico e o hidróxido de sódio foram comprados, respectivamente, da Merck e da Dinamica. O fosfato dissódico foi adquirido da Nuclear. Os filtros utilizados para a filtração das fases móveis foram o acetato de celulose (Sartorius Stedim, 0,2 μm) para a fase aquosa e o PTFE (Sartorius Stedim 0,45 μm) para a fase organica. O padrão de ácido fólico foi adquirido da êxodo Científica (98,2% de pureza). O filtro utilizado para as amostras foi de acetato de celulose (Sartorius Stedim, 0,2 μm). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura produzida por um sistema Milli-Q.

4.1.2 Amostras

O método foi aplicado em 5 amostras de farinha de trigo do tipo 1 adquiridas em um supermercado de São Leopoldo - RS.

Uma amostra branco (sem adição de ácido fólico) foi doada pela empresa Tondo S/A. As amostras foram acondicionadas nas suas embalagens originais até o momento das análises.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo do padrão de ácido fólico

Uma solução-estoque de ácido fólico (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi preparada dissolvendo o padrão em uma solução de hidróxido de sódio (0,1 mol.L⁻¹, pH 12,7).

4.2.2 Preparo da curva analítica de ácido fólico

A partir da solução-estoque ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparadas 8 concentrações de ácido fólico ($0,125$ a $3,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$) através da diluição em tampão fosfato de sódio dibásico ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 9,0).

4.2.3 Extração do ácido fólico da farinha de trigo

A extração foi realizada adicionando 5 mL da solução tampão fosfato de sódio dibásico ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 9,0) à 0,5g de farinha de trigo em um tubo falcon. Essa mistura foi submetida à agitação em vortex (Phoenix Lufereo, Modelo AP56) por 5 min. O extrato obtido foi centrifugado a 3000 g por 15 min. O sobrenadante foi recolhido, submetido a uma nova centrifugação a 13000 g por 5 min e filtrado em filtro de acetato de celulose e injetado no HPLC-DAD.

4.2.4 Condições cromatográficas

A determinação de ácido fólico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em um HPLC da marca Shimadzu equipado com um desgaseficador (DGU-20A_{3R}), duas bombas (LC-20AD), um injetor automático (Shimadzu SIL-20A HT), um forno de coluna (Shimadzu CTO-20A), um software (Shimadzu LC Solution Version 1.25 SP4) e um detector de arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A). O ácido fólico foi separado em uma coluna C18 X-Bridge Shield RP18 (150mm x 4,6mm x 5 μm), antecedida por uma coluna de guarda Waters XBridge Shield RP18 5 μm . A temperatura da coluna foi mantida em 35 °C. A separação do ácido fólico foi realizada utilizando um gradiente de eluição com acetonitrila (Fase móvel B) e água acidificada com ácido fórmico (0,1%, pH 2,6) (Fase móvel A). O gradiente foi iniciado com 8% de Fase móvel B e durante 10 min foi linearmente aumentado para 26%, que foi mantida isocriticamente por 5 min. Após esse tempo, a concentração de Fase móvel B foi aumentada linearmente durante 6 min para 50% e mantida isocriticamente por 9 min. Posteriormente, a proporção de Fase móvel B voltou para 8% dentro de 5 min. O fluxo foi mantido em $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de 20 μL . O ácido fólico foi monitorado no comprimento de onda de 280 nm.

4.2.5 Quantificação

A quantificação foi realizada utilizando uma curva analítica de ácido fólico nas concentrações de 0.125 a 3.00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para construir a curva analítica, os volumes adequados de solução estoque foram diluídos na solução tampão de fosfato de sódio bibásico (0,05 mol.L⁻¹, pH 9,0) para proporcionar as concentrações da curva. Para essa determinação quantitativa foi realizada uma análise de regressão linear, sendo os valores de x as concentrações de ácido fólico e os valores de y as respectivas áreas dos picos cromatográficos.

4.2.6 Validação do Método

A validação do método foi realizada avaliando os seguintes parâmetros analíticos: linearidade, limites de detecção e quantificação, recuperação e repetibilidade.

A linearidade foi estimada pelo valor do R² obtido da análise de regressão e o critério de aceitação, segundo o Inmetro e a Anvisa está descrito abaixo²⁴. Os valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir da curva analítica, de acordo com as equações abaixo:

Critério de aceitação Inmetro: $R^2 \geq 0,90$

Critério de aceitação Anvisa: $R^2 \geq 0,99$

$$LD = 3.3 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equação 2}$$

onde:

s = erro padrão da curva analítica

S = coeficiente angular da curva analítica

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimentos iniciais

O desenvolvimento do método e sua validação apresentada nesse trabalho foi baseada em um método existente¹², com algumas modificações. A primeira modificação foi em relação ao ácido utilizado para acidificar as fases móveis, onde foi substituído o ácido acético pelo ácido fórmico. As fases móveis foram inicialmente acidificadas com 1% de ácido fórmico, porém, o pH da fase móvel ficou muito baixo (pH 2,1). Um pH nessa faixa pode acarretar a hidrólise da fase estacionária da coluna cromatográfica. Assim, modificou-se o método para uma concentração de 0,1% de ácido fórmico, no qual a fase móvel apresentou um pH de 2,6.

Na sequência foram iniciados os experimentos para a construção da curva analítica seguindo exatamente o método descrito por Alaburda et al. (2008), onde a curva analítica foi preparada em tampão fosfato pH 7,0. As curvas analíticas preparadas com esse tampão fosfato pH 7,0 apresentaram grande variabilidade entre os dias. Assim, surgiu a hipótese de que o ácido fólico estava sofrendo degradação ao longo do experimento nessa condição de pH.

Para avaliar a hipótese conduzimos um experimento para avaliar a estabilidade do ácido fólico. A estabilidade foi avaliada em três diferentes condições: (1) ácido fólico dissolvido nas fases móveis (composição inicial do gradiente), (2) tampão fosfato pH 7,0 e (3) tampão fosfato de sódio bibásico (0,1 mol.L⁻¹, pH 9,0). O experimento foi conduzido através do monitoramento da absorbância do ácido fólico a 280 nm durante 4 horas a temperatura ambiente (20±2 °C). No experimento foi avaliada a estabilidade de três concentrações de ácido fólico (0,5 - 1,0 - 3,0 µg.mL⁻¹). Os resultados (**Figuras 3, 4, 5 e Tabela 3**) indicaram que o ácido fólico degrada significativamente em tampão fosfato (pH 7,0), o que explica a grande variação entre os dias dos coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas inicialmente. Em contrapartida, os resultados indicaram que o ácido fólico é mais estável em tampão fosfato pH 9,0. Assim, a partir desse experimento as concentrações da curva analítica e as amostras foram preparadas utilizando também tampão fosfato pH 9,0.

Figura 3: Estabilidade do ácido fólico ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dissolvido em diferentes soluções

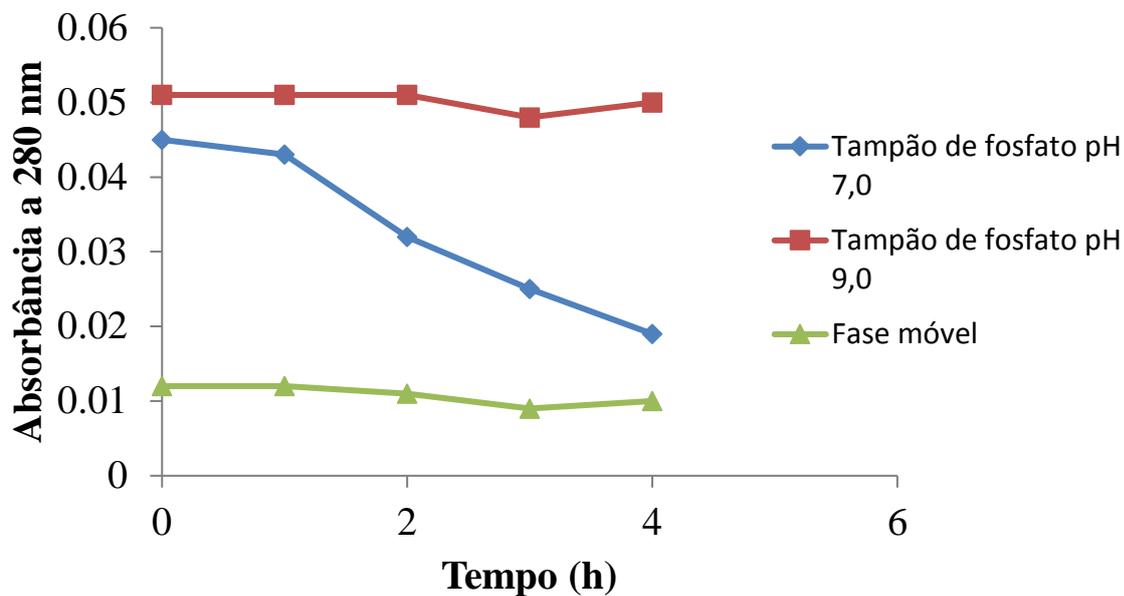


Figura 4: Estabilidade do ácido fólico ($1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dissolvido em diferentes soluções

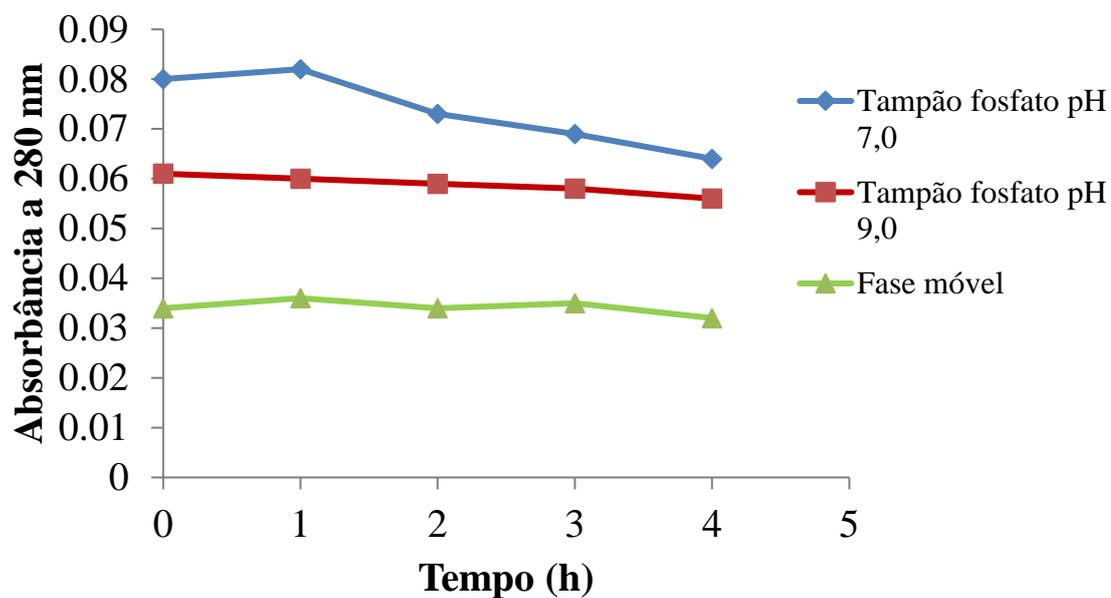


Figura 5: Estabilidade do ácido fólico ($3,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dissolvido em diferentes soluções

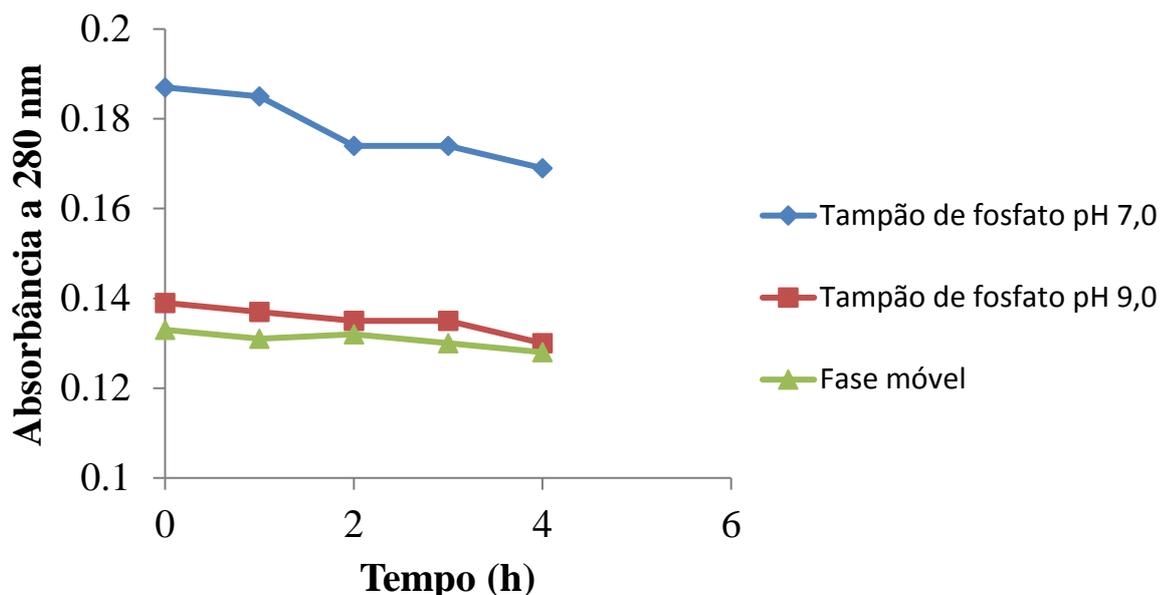


Tabela 3: Porcentagem de degradação em tampão fosfato pH 7.0, tampão fosfato pH 9.0 e na fase móvel de três concentrações da curva analítica

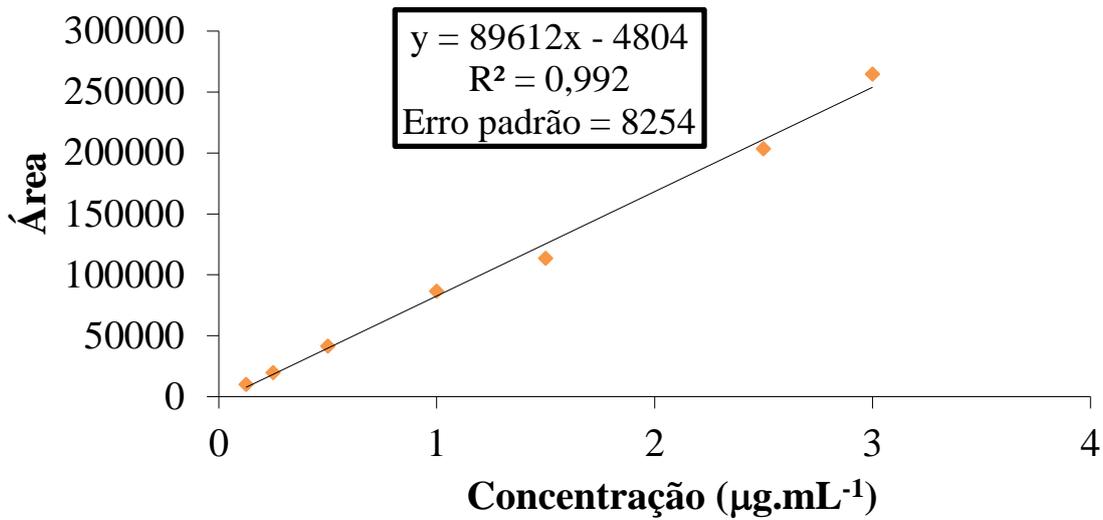
% de degradação	pH 7.0	pH 9.0	Fase móvel
$0,5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	58	2	17
$1,0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	20	5	6
$3,0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10	6	4

5.2 Validação do método

5.2.1 Linearidade

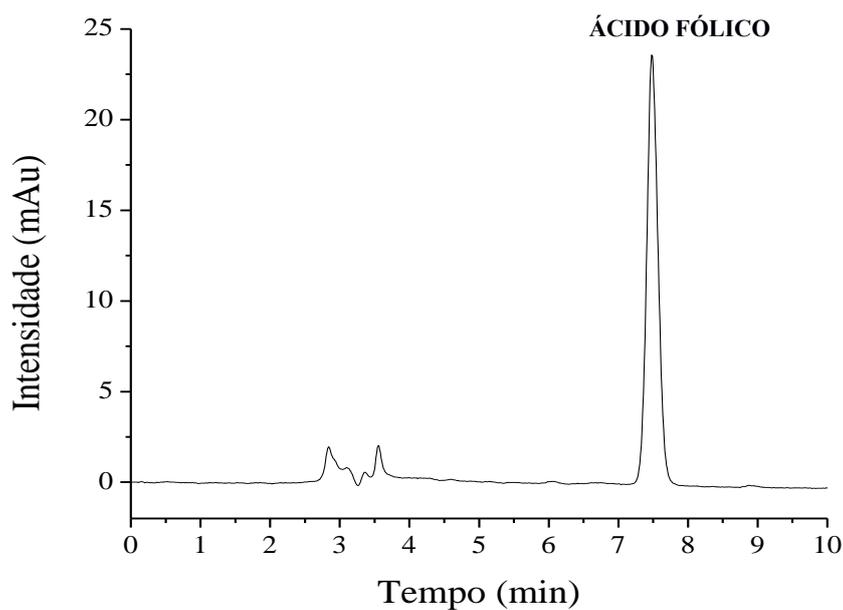
A determinação da linearidade foi obtida a partir da construção de três curvas analíticas independentes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão, da qual foram obtidas a equação da reta ($y = ax + b$), valor do R^2 e o valor do erro padrão.

Figura 6: Curva analítica de ácido fólico.



O valor de R^2 obtido (**Figura 6**) confirma que o método possui boa linearidade na faixa de concentração de 0,125 a 3,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores dos limites de detecção e quantificação foram de 0,04 e 0,11 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Na **Figura 7** é apresentado um cromatograma característico do padrão de ácido fólico.

Figura 7: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do padrão de ácido fólico (3,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As condições cromatográficas estão descritas no texto



5.2.2 Recuperação e repetibilidade

Com o objetivo de avaliar a exatidão foram realizadas testes de recuperação na amostra branco. Os resultados de recuperação foram utilizados para estimar a repetibilidade do método. A primeira não foi bem sucedida. O limitante nessa etapa foi a pequena massa de ácido fólico que tínhamos que medir para adicionar à farinha. Como tínhamos 1 kg de amostra branco, era necessário adicionar 1,5 mg de padrão. Contudo, essa medida em balança analítica apresentou um grande erro analítico, sendo obtidos valores de recuperação muito superiores a 100%.

Portanto, optou-se por uma adição de padrão em solução (solução de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) diretamente na via de análise, em 3 replicatas de amostra branco. A recuperação foi realizada para a concentração de 150 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Os resultados obtidos estão descritos abaixo na **Tabela 4**.

Tabela 4: Recuperação e repetibilidade do método

Replicata	Concentração de ácido fólico ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$)	Recuperação %
1	170	113
2	146	97
3	144	96
Média	153	102
Desvio-padrão relativo (DPR)	9	9

O parâmetro para uma boa recuperação, de acordo com o INMETRO para concentrações de $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, é valores na faixa de 80-120%, então é possível afirmar que se obteve bons resultados. A repetibilidade intra-dia do método foi estimada pela avaliação dos resultados das três replicatas de amostras branco que foram fortificadas. Os resultados (**Tabela 4**) indicam que o método possui uma boa repetibilidade, com um DPR menor do que 10%.

5.3 Aplicação do método

5.3.1 Farinhas de trigo

O método foi aplicado em 5 amostras de farinha de trigo. Na **Figura 8** é mostrada a separação do ácido fólico e na **Tabela 5** os resultados encontrados.

Figura 8: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do ácido fólico de uma amostra de farinha de trigo. As condições cromatográficas estão descritas no texto.

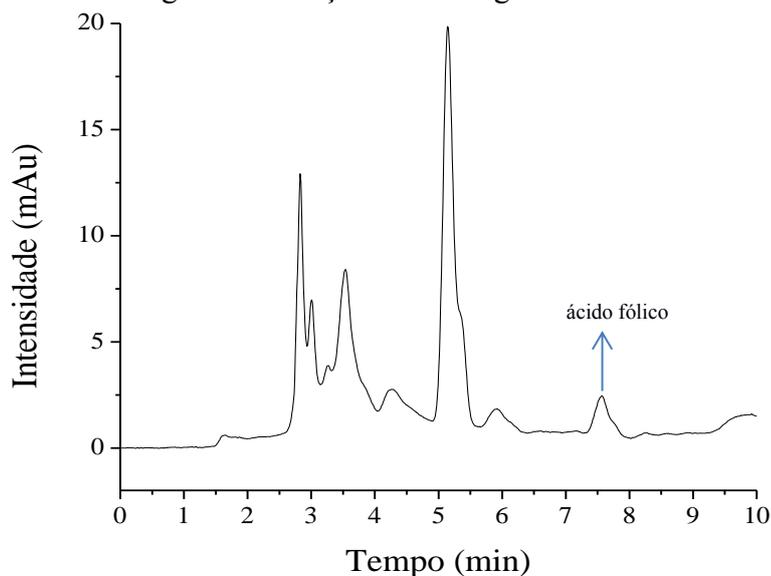


Tabela 5: Teor de ácido fólico em amostras comerciais de farinha de trigo

Marca	Média \pm desvio-padrão ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$)
1	189 \pm 17
2	269 \pm 165
3	95 \pm 17
4	81 \pm 22
5	160 \pm 29

Os resultados dos teores de ácido fólico nas amostras de farinha de trigo analisadas mostraram que 40% das farinhas de trigo estão com a concentração abaixo do mínimo estabelecido pela legislação brasileira ($150 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$). Essa menor concentração de ácido fólico pode ter ocorrido devido à adição proposital de menores quantidades ou pode estar relacionado à falta de controle de qualidade na etapa de fortificação da farinha de trigo na indústria.

Em estudo com farinhas de trigo consumidas no Brasil foi encontrada uma porcentagem similar (51%) de amostras de farinha de trigo com teores de ácido fólico abaixo do mínimo estabelecido pela legislação brasileira⁷.

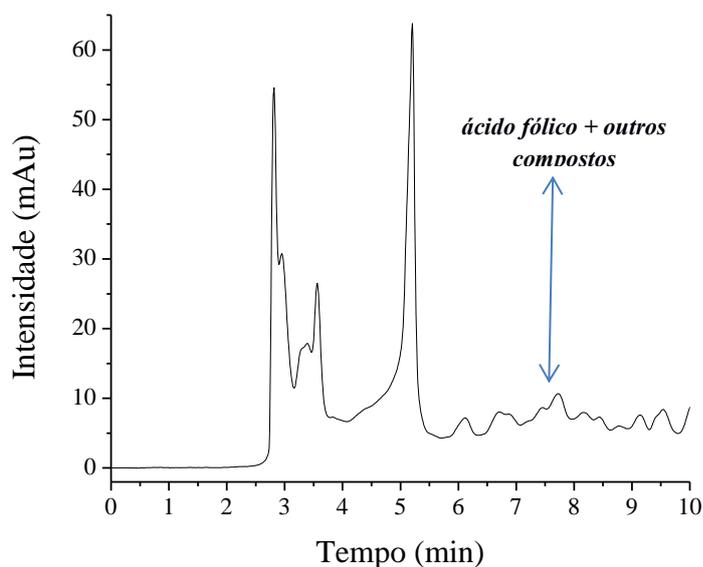
Essa menor concentração de ácido fólico encontrada em uma porcentagem significativa de amostras de farinha de trigo tem como principal consequência à disponibilização de um produto com um menor valor nutricional em relação a essa vitamina, comprometendo seriamente o objetivo da fortificação. Um estudo sobre a importância da correta fortificação foi realizado nos Estados Unidos, onde se verificou que aproximadamente 20% da população americana consome menos do que a metade da ingestão diária recomendada¹². Já no Brasil, 15,2% da população brasileira apresenta deficiência em ácido fólico²². Um maior estudo foi realizado sobre o aumento dessa vitamina no organismo após um mês de ingestão de farinhas de trigo e milho fortificadas e houve um aumento considerável tanto para crianças, quanto para adultos, de respectivamente 57% e 174%²². O enriquecimento dos alimentos, inclusive das farinhas, tem sido uma estratégia para aumentar os níveis de folatos, tendo a vantagem de alcançar uma ampla parte da população, sem a necessidade de mudanças nos hábitos alimentares¹⁶, sendo uma forma mais eficaz devido ao baixo custo quando comparado com mudanças nas dietas ou administração de suplementos²¹.

Depois do início da fortificação obrigatória das farinhas, os níveis médios de folato no soro sanguíneo em mulheres não grávidas, mas em idade reprodutível mais do que dobraram. A fortificação tem sido responsável pela redução de 16-78% de defeitos do tubo neural¹⁶.

5.3.2 Farinhas de milho

Não foi possível aplicar o método validado as amostras de de farinha de milho. Apenas uma amostra de farinha de milho foi testada, e a análise do cromatograma obtido indicou uma co-eluição (**Figura 9**).

Figura 9: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do ácido fólico de uma amostra de farinha de milho. As condições cromatográficas estão descritas no texto.



Uma possível solução futura para a determinação de ácido fólico em farinha de milho será a utilização da técnica de extração em fase sólida (SPE). A técnica SPE apresenta diversas vantagens com relação ao método clássico utilizado nesse trabalho, tais como praticidade, melhor separação, maior sensibilidade, porém, tem algumas limitações como a etapa de dessorção do analito aprisionado no cartucho de SPE que requer, geralmente, o uso de solventes tóxicos¹⁷. Não foi utilizada nesse trabalho devido à falta da mesma no ICTA e a sua compra levaria mais tempo do que o disponível para a finalização desse projeto tecnológico.

5.4 Avaliação de custos

Os custos foram avaliados considerando o desenvolvimento de uma curva analítica com 8 pontos e a análise de uma amostra em triplicata. As cotações de preços foram realizadas na distribuidora VWR, que dispõe de várias marcas como Merck e J. T.

Baker, e também na Sigma-Aldrich. Os valores utilizados para a construção do preço final são baseados no menor valor encontrado, conforme consta na **Tabela 6**.

Tabela 6: Avaliação de custos para o desenvolvimento do projeto tecnológico

Reagente	Tamanho da embalagem	Preço (R\$)	Quantidade utilizada	Custo (R\$)
Acetonitrila (grau HPLC)	4L	815,4 ^b	1,5L	305,8
Metanol (grau HPLC)	4L	138,0 ^a	2L	69,0
ácido Fórmico (98-100%)	1L	327,3 ^b	3mL	0,98
Hidróxido de Sódio (pellets)	1kg	43,02 ^a	2g	0,086
Fosfato Dissódico Anidro	1kg	53,02 ^a	14g	0,74
Padrão				
ácido Fólico (>98%)	100g	1878,9 ^a	50mg	0,94
Materiais				
Membrana Acetato de Celulose 0,22 μ m	Caixa com 100 unid.	120,0 ^c	2unid.	2,40
Membrana filtrante Acetato de Celulose 0,20 μ m	Caixa com 100 unid.	251,00 ^d	12unid	30,12
Membrana Teflon (PTFE) 0,22 μ m	Caixa com 100 unid.	490,0 ^c	2unid.	9,80
Total (R\$)				420,0
a. Sigma	b. Distribuidora VWR	c. Sartorius	d. Unifil	

Para calcular o valor final para a execução dessa análise deve-se levar em conta gastos como energia (HPLC-DAD, centrífuga, computador e vórtex), assim como o custo relativo de mão de obra e o preço das lampadas do detector que são caras e têm limite de uso, conforme consta na **Tabela 7**. Em todos os valores são considerados os

gastos por kWh dos equipamentos utilizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS e considerando o valor em reais por kWh da AES SUL (1kWh = R\$ 1,00). Os valores de depreciação do aparelho não foram colocados nesse trabalho, pois dependem de cada aparelho.

Tabela 7: Avaliação de custos fixos

Equipamento	Consumo (kWh)	Preço por hora (R\$)	Tempo utilizado	Custo (R\$)
HPLC-DAD	1,55	1,55	9h	14,0
Centrífuga	2	2,00	1h	2,0
Vortex	0,13	0,13	15min	0,03
Computador	0,25	0,25	9h	2,25
Lâmpada D2 (<i>Deutério</i>)	2,03	2,03	9h	18,3
Lâmpada W (<i>Tungstênio</i>)	0,11	0,11	9h	1,03
Mão-de-obra		26,19*	10h	261,9
			Total (R\$)	299,4

* Valor considerando a mão-de-obra de um funcionário técnico da Fundação de Ciência e Tecnologia (CIENTEC)

Então, o valor final para essa análise, considerando a execução da curva de calibração e uma amostra com três replicatas, é de R\$ 719,40.

Na empresa prestadora de serviço de análise o provável cálculo de custo para essa análise originará um valor final bem inferior ao valor final apresentado. Na empresa é feito um cálculo de gastos por amostra e mais um adicional pela curva, visto que uma curva tem estabilidade maior do que um dia (testes sobre estabilidade da curva não foram efetuados por falta de tempo) e podem ser realizadas mais de uma amostra por dia. O valor adicional pela curva depende de cada local, conforme seus gastos e quantidade de serviço, mas os outros valores podem ser estimados conforme consta abaixo na **Tabela 8**.

Tabela 8: Avaliação de custos para a análise de uma amostra em triplicata

Reagente	Tamanho da embalagem	Preço (R\$)	Quantidade utilizada	Custo (R\$)	
Acetonitrila (grau HPLC)	4L	815,4 ^b	25,3mL	5,16	
Metanol (grau HPLC)	4L	138,0 ^a	40mL	1,38	
Ácido Fórmico (98-100%)	1L	327,3 ^b	0,025mL	0,01	
Hidróxido de Sódio (pellets)	1kg	43,02 ^a	2g	0,09	
Fosfato Dissódico Anidro	1kg	53,02 ^a	0,42g	0,02	
Materiais					
Membrana Acetato de Celulose 0,22µm	Caixa com 100 unid.	120,0 ^c	1unid.	1,2	
Membrana filtrante Acetato de Celulose 0,20µm	Caixa com 100 unid.	251,00 ^d	3unid.	7,53	
Membrana Teflon (PTFE) 0,22µm	Caixa com 100 unid.	490,0 ^c	1unid.	4,9	
Equipamento	Consumo (kWh)	Preço por hora (R\$)	Tempo utilizado	Custo (R\$)	
HPLC-DAD	1,55	1,55	2,25h	3,5	
Centrífuga	2	2,00	15min	0,5	
Vortex	0,13	0,13	15min	0,03	
Computador	0,25	0,25	2,25h	2,25	
Lâmpada D2 (<i>Deutério</i>)	2,03	2,03	2,25h	18,3	
Lâmpada W (<i>Tungstênio</i>)	0,11	0,11	2,25h	1,03	
Mão-de-obra		26,19*	3h	78,6	
				Total (R\$)	124,4
a. Sigma	b. Distribuidora VWR	c. Sartorius	d. Unifil		

* Valor considerando a mão-de-obra de um funcionário técnico da Fundação de Ciência e Tecnologia (CIENTEC)

Então, o valor da análise se torna acessível e barato, admitindo-se que o valor final para uma amostra seja R\$ 124,4, mais o percentual em cima da curva analítica, enquanto apenas a curva o valor é de R\$ 595,00. Algumas empresas rotineiramente calculam 10-20% sobre um custo “fixo” que é distribuído entre diversas amostras, visando ter um menor preço para o cliente e mesmo assim obter um lucro considerável. Para fins de um resultado mais sólido, considerando 10% sobre o custo da curva analítica, a análise tem um valor de mercado de R\$ 185,00.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido, com sucesso, um método analítico, por HPLC-DAD, simples, barato e confiável para a determinação de ácido fólico em farinha de trigo. Um total de 5 amostras de farinha de trigo comerciais foram analisadas, sendo que uma porcentagem significativa apresentou teores de ácido fólico abaixo do estabelecido pela legislação brasileira.

Nossos resultados sugerem que os órgãos de fiscalização devem atuar de maneira mais efetiva no monitoramento dos níveis de ácido fólico adicionados na farinha de trigo, bem como as indústrias devem adotar um controle de qualidade maior na fortificação destes produtos.

7. REFERÊNCIAS

- [1] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n. 344**. Brasília, Distrito Federal, Dezembro, 2002
- [2] DALY, S.; MILLS, JR.; 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, Vol. 350, pág. 1666-1669, 1997.
- [3] LIMA, JULIANA A; CATHARINO, RODRIGO R; GODOY, HELENA T. **Determination of folic acid in enriched wheat and corn flour by means of high performance liquid chromatography**. Revista Instituto Adolfo Lutz; Vol. 63, pág. 149-154, 2004.
- [4] LIMA, JULIANA A; CATHARINO, RODRIGO R; GODOY, HELENA T. **Validação de metodologia para a determinação de ácido fólico em margarina enriquecida e avaliação da estabilidade da vitamina durante estocagem**. Revista Instituto Adolfo Lutz, Vol. 63, pág 10-14, 2004.
- [5] LIMA, JULIANA A; CATHARINO, RODRIGO R; GODOY, HELENA T. **Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos**. Química Nova, Vol.29, 2006.
- [6] SANTOS, LEONOR MARIA PACHECO; PEREIRA, MICHELLE ZANON. **Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural**. Cadernos de Saúde Pública, Vol. 23, pág. 17-24, 2007.

[7] ALABURDA, JANETE; DE ALMEIDA, ADRIANA P.; SHUNDO, LUZIA; RUVIERI, VALTER; SABINO, MYMA. **Determination of folic acid in fortified wheat flours.** *Revista Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 21, pág. 336 - 342, 2007.

[8] SILVA, Walisson Martins; DOS SANTOS, Flávia Regina; BATISTUTI, José Paschoal. **Validação de um novo método analítico para quantificação de ácido fólico por espectrofotometria-UV.** *Alimentos e Nutrição Araraquara*, Vol. 24 pág. 275-282, 2013.

[9] MARTINS JUNIOR, Helio A.; WANG, Alexandre Y.; ALABOURDA, Janete A.; PIRES, Maria A. F.; VEGA, Oscar B.; LEBRE, Daniel T. **A validated method to quantify folic acid in wheat flour samples using liquid chromatography.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 19, número 5, 2008.

[10] CHANDRA-HIOE, Maria V.; BUCKNALL, Martin P.; ARCOT, Jayashree. **Folic Acid-fortified Flour: Optimised and Fast Sample Preparation Coupled with a Validated High-Speed Mass Spectrometry Analysis Suitable for a Fortification Monitoring Program.** *Food Analytical*, Vol. 6, pág. 1416-1423, 2013.

[11] BALUZ, KáTOA; DO CARMO, MARIA DAS GRAÇAS TAVARES; ROSAS, GLORIMAR. **O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, Vol. 48, pág 597-607, 2002.

[12] ALABURDA, JANETE; SHUNDO, LUZI. **Ácido fólico e fortificação de alimentos.** *Revista Instituto Adolfo Lutz*, Vol. 66, pág. 95-102 2007.

[13] CORREIA, Laura Fernandes Melo; FARAONI, Aurélia Santos; PINHEIRO-SANT'ANA, Helena Maria. **Efeitos do processamento industrial sobre a estabilidade de vitaminas.** Alimentos e Nutrição Araraquara, Vol. 19, pág. 83-95, 2008.

[14] SOUZA FILHO, M. S. M. et al. **Effect of bleaching, osmotic process, heat treatment and storage on ascorbic acid stability of cashew apple processed by combined methods.** Ciência Tecnolgia Alimentos, Vol. 19, pág. 211-213, 1999.

[15] SUH, Joon Hyuk; YANG, Dong-Hyuf; LEE, Byung Kyu; EOM, Han Young; KIM, Unyoung; KIM, Junghyung; LEE, Hyeyeon; HAN, Sang Beom. **Simultaneous Determination of B Group Vitamins in Supplemented Food Products by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection.** Bulletin of the Korean Chemical Society, Vol. 32, 2011.

[16] LMP, Santos; MZ, Pereira. **Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural.** Caderno de Saúde Pública, Vol. 23, pág 17-24, 2007.

[17] BARRIONUEVO, Wilma Regina; LANÇAS, Fernando Mauro. **Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água.** Química Nova, Vol.24, 2001.

[18] DELCHIER, Nicolas;HERBIG, Anna-Lena; RYCHLIK, Michael; RENARD, Catherine M.G.C. **Folates in Fruits and Vegetables: Contents, Processing, and Stability.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Vol. 15, pág. 506-528, 2016.

- [19] DELCHIER, N; RINGLING, C; MAINGONNAT, J-F,; RYCHLIK, M; RENARD, CMGC. **Mechanisms of folate losses during processing: diffusion vs. Heat degradation.** Food Chemistry, Vol. 157, pág. 439–447, 2014.
- [20] EMARA, Samy; MASUJIMA, Tsutomu; ZARAD, Walaa; KAMAL, Maha; EI-BAGARY, Ramzia. **Online pre-column derivatization with chromatographic separation to determine folic acid.** Journal of Chromatographic Science, Vol. 51, pág. 544-551, 2013.
- [21] OS, Romano; NJ, Waitzman; RM, Scheffler; RD, Pi. **Folic acid fortification of grain: an economic analysis.** American Journal Public Health, Vol. 85, pág 667-76, 1995.
- [22] BRITTOA, Jéssica Carrilho Brittoa; CANÇADO, Rodolfo; GUERRA-SHINOHARA, Elvira Maria. **Concentrations of blood folate in Brazilian studies prior to and after fortification of wheat and cornmeal (maize flour) with folic acid: A review.** .Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Vol. 36, pág 275-286, 2013.
- [23] UEHARA, Sofia Kimi; ROSA, Glorimar. **Association between folic acid deficiency and disease and prevention strategies: a critical view.** Revista Nutrição, Vol. 23, 2010.
- [24] RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel Cristina S. Fontes; MELO, Lúcio Flávio Costa. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, Vol.27, pág 771-780, 2004.