

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E ENGENHARIAS
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

KAREN PETYELE LORENO

**QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE TRIGO ADOTANDO O
MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM
DETECTOR UV: VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

CAXIAS DO SUL

2021

KAREN PETYELE LORENO

**QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE TRIGO ADOTANDO O
MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM
DETECTOR UV: VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de Engenharia Química da Universidade de Caxias do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva.

CAXIAS DO SUL

2021

KAREN PETYELE LORENO

**QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE TRIGO ADOTANDO O
MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM
DETECTOR UV: VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de Engenharia Química da Universidade de Caxias do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva.

Aprovada em ____/____/2021.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva
Universidade de Caxias do Sul - UCS

Prof^a. Dr^a. Luciani Tatsch Piemolini Barreto
Universidade de Caxias do Sul - UCS

Ma. Taís Sabedot Pertile
Universidade de Caxias do Sul – UCS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado chegar até aqui.

Agradeço ao Prof. Thiago Barcellos da Silva, responsável pela orientação deste trabalho.

A Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade em cursar esta graduação, em especial, os laboratórios (LAPAM e LATAM) no apoio para que este trabalho pudesse ser executado.

A Dr^a. Sabrina Carra, que dispôs do seu tempo para me treinar na utilização do equipamento.

Ao Moinhos Galópolis em doar a mistura de ferro e ácido fólico e a amostra de farinha de trigo tipo I pura, utilizada no processo de validação do método.

Aos meus amigos, especialmente a Eng. Quím. Edinéia Tomazi Stroehner, por todo ensinamento, parceria e por sempre acreditar que eu chegaria até aqui.

Agradeço muito meu esposo e família pelo apoio e compreensão da minha ausência durante esses 6 anos de estudo e dedicação.

*“O homem não é nada além
daquilo que a educação faz
dele”*

Immanuel Kant

RESUMO

A carência de vitamina B₉ nas refeições diárias está relacionada principalmente à anomalias no desenvolvimento do feto, problemas de coração e medula óssea. E para suprir esta necessidade, países adotaram a obrigatoriedade da fortificação de alimentos com ácido fólico, e para isto, utilizaram a farinha de trigo e milho como principal meio, pois está presente praticamente em todos os cafés da manhã. Para garantir o controle de qualidade na fortificação do produto entregue ao consumidor final, surgiu a necessidade em desenvolver métodos para a quantificação do ácido fólico nestas farinhas comercializadas no país. Este trabalho teve como objetivo avaliar o método de extração do ácido fólico em amostras de farinha de trigo tipo I, definir as condições para quantificação do analito por cromatografia líquida de alta eficiência e para a confiabilidade dos resultados se fez necessária a validação do método. A extração do analito foi realizada com solução de hidróxido de potássio 0,1 mol L⁻¹, seguida de dispersão com ultrassom e para diminuir os interferentes foi realizada a clarificação do extrato com soluções ácidas de ácido fosfórico e ácido tricloroacético, ambos na concentração de 0,1 mol L⁻¹. Para a injeção da amostra no cromatógrafo se faz necessário a filtração da amostra, e para facilitar esta etapa, o extrato foi centrifugado por 10 min em 3600 rpm e após filtrado para vial com membrana de fluoreto de polivinilideno. Para a análise cromatográfica foi injetado 20 µL da amostra, utilizando coluna C18, com eluição isocrática de 85% de tampão acetato com pH ajustado em 2,8 e 15% de acetonitrila, vazão de 0,5 mL min⁻¹ e detector UV/Vis no comprimento de onda de 290 nm. O tempo de retenção do ácido fólico nas condições citadas, foi de 7,6 min. Após avaliou-se a seletividade do método obtendo um F_{calculado} 9,012, menor que o F_{tabelado}, critério para confirmar que o método é seletivo. Determinou-se a faixa de trabalho e linearidade da curva de calibração, atendendo ao critério de aceitação para um R² maior que 0,9945 entre 9 e 500 µg L⁻¹, além da verificação aleatória dos resíduos da curva de calibração. Determinou-se o limite de quantificação e detecção para o método de 17,53 µg e 5,79 µg para 100 g de farinha de trigo tipo I, respectivamente. Avaliou-se a taxa de recuperação do analito fortificado com concentração conhecida, obtendo-se uma média de 101,80%. Avaliou-se o desvio padrão relativo para a repetibilidade do método com 3 concentrações de padrão de ácido fólico analisadas em triplicata, obtendo DPR 0,49%, menor que o critério de 15%. Avaliou-se a precisão intermediária com as mesmas concentrações da repetibilidade, porém com intervalo de 10 dias, obtendo resultado de 0,52%, menor que 15%. Determinou-se pelo método definido no trabalho a quantificação do ácido fólico de 5 amostras comerciais de farinha de trigo tipo I, todas apresentaram teor de ácido fólico em acordo com o previsto Resolução da ANVISA RDC n° 150 de 13 de abril de 2017. Os parâmetros estatísticos avaliados demonstraram que o método proposto para validação é adequado para a determinação de ácido fólico em farinha de trigo tipo I, uma vez que os resultados ficaram dentro dos padrões estabelecidos como critérios de aceitação.

Palavras-chave: Ácido fólico. Farinha de trigo tipo I. Cromatografia líquida de alta eficiência. Validação do método.

ABSTRACT

The lack of vitamin B₉ in daily diet is mainly related to abnormalities in the fetus development and heart and bone marrow diseases. In order to avoid folic acid deficiency, some countries adopted the mandatory fortification of foods with folic acid. Wheat and cornflour were chosen as the main source due to their presence in practically all breakfasts. In order to ensure quality control for the folic acid fortification on the commercialized products, adequate methodologies are necessary. Thus, this work aimed to evaluate the method for folic acid extraction from samples of type I wheat flour and the development of the analytical conditions and method validation by high-performance liquid chromatography. The analyte extraction was carried out with a 0.1 mol L⁻¹ potassium hydroxide solution, followed by ultrasound dispersion. To reduce interferences, the extract was clarified with phosphoric acid and trichloroacetic acid solutions, both at a concentration of 0,1 mol L⁻¹. Prior to the CLAE analysis, the extract was centrifuged at 3600 rpm for 10 min and subsequently filtered through a polyvinylidene fluoride membrane. For chromatographic analysis, 20 µL of the sample was injected using a C18 column, with isocratic elution of 85% acetate buffer with pH adjusted to 2,8 and 15% acetonitrile, flow rate of 0,5 mL min⁻¹ and UV/Vis detector at 290 nm. The retention time of folic acid under the mentioned conditions was 7,6 min. Afterward, the selectivity of the method was evaluated, obtaining an $F_{\text{calculated}}$ 9,012, lower than the F_{tabled} , criterion to confirm that the method is selective. The working range and linearity of the calibration curve were determined, meeting the acceptance criteria for an R^2 greater than 0,9945 between 9 and 500 µg L⁻¹, in addition to the random verification of the calibration curve residues. The limit of quantification and detection for the method was 17,53 g and 5,79 µg for 100 g of type I wheat flour, respectively. The recovery rate of the fortified analyte with known concentration was evaluated, obtaining an average of 101,80%. The relative standard deviation for the repeatability of the method was evaluated with 3 standard concentrations of folic acid analyzed in triplicate, obtaining a DPR 0,49%, lower than the 15% criterion. Intermediate precision was evaluated with the same repeatability concentrations, but with an interval of 10 days, obtaining a result of 0,52%, less than 15%. The quantification of folic acid from 5 commercial samples of type I wheat flour was determined by the method defined in this work and all of which presented adequate folic acid content according to the ANVISA resolution N^o 150 of April 13, 2017. The evaluated statistical parameters showed that the method proposed for validation is suitable for the determination of folic acid in type I, wheat flour since the results were within the standards established as acceptance criteria.

Keywords: Folic acid. Type I wheat flour. High-performance liquid chromatography. Method validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do ácido fólico e as unidades básicas que compõe a estrutura molecular.....	14
Figura 2 - Estrutura molecular de diferentes formas naturais de folatos.	15
Figura 3 - Metabolismo do ácido fólico levando ao folato bioativo 5,6,7,8 tetraidrofolato (THF) e posterior metilação ao 5-metiltetrafolato (5-MTHF).....	18
Figura 4 - Esquema ilustrativo de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.	24
Figura 5 - Colunas cromatográficas	25
Figura 6 - Fluxograma de extração e clarificação de ácido fólico em farinha de trigo	32
Figura 7 - Comparação de eluição com 1 e 0,5 mL min ⁻¹	39
Figura 8 - Gráficos de relação área <i>versus</i> concentração das curvas de calibração obtidas COM e SEM presença da matriz de referência	41
Figura 9 - Gráfico de área <i>versus</i> concentração das retas do procedimento de seletividade COM e SEM a presença da matriz	42
Figura 10 - Curva de calibração na faixa linear de trabalho	44
Figura 11 - Cromatograma comparativo entre as 9 concentrações definidas para a linearidade.....	45
Figura 12 - Cromatograma do solvente tampão fosfato utilizado para o preparo da curva de linearidade	46
Figura 13 - Gráfico da relação entre resíduo <i>versus</i> concentração de ácido fólico obtidos pela curva de calibração	47
Figura 14 - Gráfico da relação entre a concentração de ácido fólico <i>versus</i> absorbância, representado pela área do sinal, e correlação baseada na linha de tendência.....	47
Figura 15 - Matriz de referência fortificada com mistura de ferro e ácido fólico	51
Figura 16 - Cromatograma de área <i>versus</i> concentração de 5 amostras de farinha de trigo tipo I comerciais fortificadas com ácido fólico, denominadas A, B, C, D e E	54
Figura 17 - Cromatograma comparativo entre a amostra padrão de ácido fólico e amostra comercial	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alimentos fontes de folatos, e as respectivas quantidades em μg DFE por porção.	16
Tabela 2 - Determinação $F_{\text{calculado}}$ conforme os graus de liberdade aplicado para o método	34
Tabela 3 - Seletividade do método avaliado pela variância dos resultados obtidos COM e SEM matriz de referência	42
Tabela 4 - Teste-t aplicado para duas variáveis (SEM a presença da matriz e COM a presença da matriz).....	43
Tabela 5 - Dados obtidos na determinação da linearidade do método de quantificação de ácido fólico em farinha de trigo tipo I.....	46
Tabela 6 - Dados para obtenção do limite de quantificação de ácido fólico em farinha de trigo tipo I.....	48
Tabela 7 - Dados para obtenção do limite de detecção do método de ácido fólico em farinha de trigo tipo I.....	49
Tabela 8 - Dados obtidos na recuperação da fortificação de ácido fólico em amostra referência (farinha de trigo tipo I sem adição do ácido fólico)	51
Tabela 9 - Estudo de repetibilidade do método	52
Tabela 10 - Estudo da precisão intermediária avaliada pelo desvio padrão relativo de 3 concentrações de solução padrão de ácido fólico	53
Tabela 11 - Relação da concentração e desvio padrão de amostras comerciais analisadas para ácido fólico	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-MTHF	5-metiltetrafolato
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DFE	Equivalente de Folato Dietético
DPR	Desvio Padrão Relativo
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FTN	fechamento do tubo neural
LDM	limite de detecção do método
LQ	limite de quantificação
PTFE	Politetrafluoretileno
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
QuEChERS	rápido, fácil, barato, eletivo, robusto e seguro, do inglês: <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>
rpm	rotação por minuto
SAX	colunas de troca iônica forte
SPE	extração por fase sólida, do inglês: <i>solid phase extraction</i>
THF	5,6,7,8-Tetraidrofolato
UV/Vis	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVO GERAL	13
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	FOLATOS E ÁCIDO FÓLICO	14
2.1.1	Efeitos biológicos.....	17
2.1.2	Mecanismo de ação.....	17
2.2	FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM ÁCIDO FÓLICO	19
2.2.1	Legislação brasileira para fortificação de ácido fólico.....	20
2.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO.....	21
2.4	MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO	22
2.5	DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	23
2.5.1	Instrumentação de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência..	24
2.5.2	Escolha da fase móvel adequada para determinação de ácido fólico	25
2.5.3	Tipos de colunas cromatográficas	25
2.5.4	Injetores.....	26
2.5.5	Tipos de detectores	26
2.6	VALIDAÇÃO DE MÉTODO	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	MATERIAIS.....	30
3.2	MÉTODOS	30
3.2.1	Extração do ácido fólico em farinha de trigo tipo I	30
3.2.2	Definição das condições experimentais para quantificação do ácido fólico por cromatografia líquida de alta eficiência.....	32
3.2.3	Quantificação do ácido fólico por cromatografia líquida de alta eficiência	32

3.2.4	Processo de validação do método para quantificação do ácido fólico.....	33
3.2.4.1	Seletividade do método e efeito matriz.....	33
3.2.4.2	Limite de quantificação (LQ).....	34
3.2.4.3	Limite de detecção do método (LDM).....	35
3.2.4.4	Faixa de trabalho.....	35
3.2.4.5	Linearidade da curva de calibração e faixa linear	35
3.2.4.6	Exatidão do método.....	36
3.2.4.7	Repetibilidade do método.....	36
3.2.4.8	Precisão intermediária.....	37
4.2.4.9	Análise da quantificação do ácido fólico em amostras comerciais	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	MÉTODO DE EXTRAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE TRIGO.....	38
4.2	PROCESSO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO	38
4.2.1	Seletividade e Efeito Matriz	39
4.2.2	Faixa linear de trabalho	44
4.2.3	Linearidade da curva de calibração.....	44
4.2.4	Limite de quantificação (LQ).....	48
4.2.5	Limite de detecção do método (LDM).....	49
4.2.6	Exatidão do método.....	50
4.2.7	Repetibilidade do método.....	52
4.2.8	Precisão intermediária	53
4.2.9	Quantificação do ácido fólico em amostras de farinha de trigo tipo I comerciais	53
5	CONCLUSÃO.....	57
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A fortificação de alimentos tornou-se obrigatória após pesquisas relacionarem algumas doenças à deficiência de vitaminas na dieta alimentar. Tendo em vista mudanças na rotina e o aumento expressivo pelo consumo de alimentos prontos, os países não alcançaram sucesso na implementação de programas de conscientização da população em se alimentar de forma adequada.

Para isto, utilizaram-se da estratégia de fortificação de alimentos para suprir a falta de vitaminas essenciais para o organismo. Para solucionar a carência de ácido fólico ou também conhecido como vitamina B₉, adotou-se como norma aos fabricantes, a fortificação de farinhas de trigo e milho, já que estas, estão presentes diariamente nas refeições.

Folatos são vitaminas do complexo B hidrossolúveis, encontrados principalmente em vegetais, tendo como sua forma sintética o ácido fólico. Desempenha papel importante para biossíntese de nucleotídeos no organismo humano, fortalecendo o sistema imunológico.

A obrigatoriedade da fortificação de farinhas com ácido fólico trouxe como resultados a redução de riscos relacionados ao fechamento do tubo neural e malformação da medula espinhal do feto. A vitamina B₉ é essencial para a saúde humana, principalmente na gravidez em que a demanda é aumentada, devida sua importância no desenvolvimento e crescimento do feto, o ácido fólico também auxilia no ajuste de produção da homocisteína, evitando problemas cardiovasculares.

Para garantir aos fabricantes de farinhas resultados confiáveis de fortificação e ao consumidor a compra de produto com qualidade, se faz necessário o emprego de um método para quantificação de ácido fólico. Com isto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar o método de quantificação de ácido fólico em amostras de farinha de trigo utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector ultravioleta (UV/Vis).

1.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar o ácido fólico em farinhas de trigo tipo I empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectroscopia no ultravioleta.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral do trabalho serão realizadas as seguintes ações:

- a) determinar as variáveis de extração e quantificação de ácido fólico;
- b) validar o método para determinação de ácido fólico por cromatografia líquida de alta eficiência, avaliando seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade da curva de calibração, limite de quantificação e detecção, precisão e exatidão do método;
- c) extrair ácido fólico de 5 amostras comerciais de farinha de trigo do tipo I.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

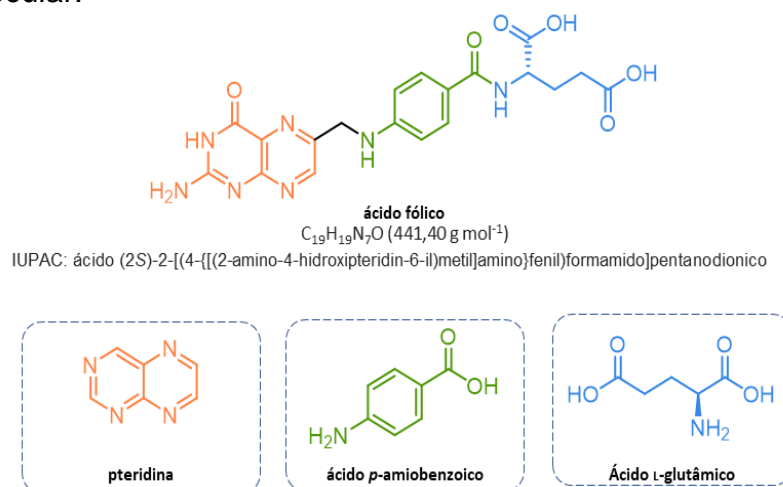
2.1 FOLATOS E ÁCIDO FÓLICO

Existe certa confusão ao se empregar corretamente os termos folatos e ácido fólico. O termo folato é designado a um conjunto de moléculas hidrofílicas, que estão disponíveis naturalmente, e foram identificadas inicialmente como fatores essenciais para o crescimento das bactérias como a *Lactobacillus casei* e *Lactococcus lactis*, e para o crescimento e formação de hemoglobinas em pintos (CIESLIK; CIESLIK, 2018).

O termo ácido fólico origina-se da palavra em latim *folium*, o qual significa folha, e foi empregado pela primeira vez no ano de 1941 quando foi isolado a partir de 4 toneladas de folhas de espinafre (MITCHELL; SNELL; WILLIAMS, 1941). Neste estudo, o composto isolado foi associado aos fatores de crescimento para a *Lactobacillus casei*, e então foi associado aos compostos os fatores de crescimento observados anteriormente.

Na tentativa de obter o composto por síntese química, pesquisadores do laboratório Lederle obtiveram o ácido fólico na forma pura (ANGIER et al., 1945). A partir deste trabalho foi possível confirmar que a estrutura do ácido fólico é composta de uma unidade oxidada do heterocíclico pteridina, do ácido *p*-aminobenzoico e do ácido glutâmico, como mostrado na Figura 1.

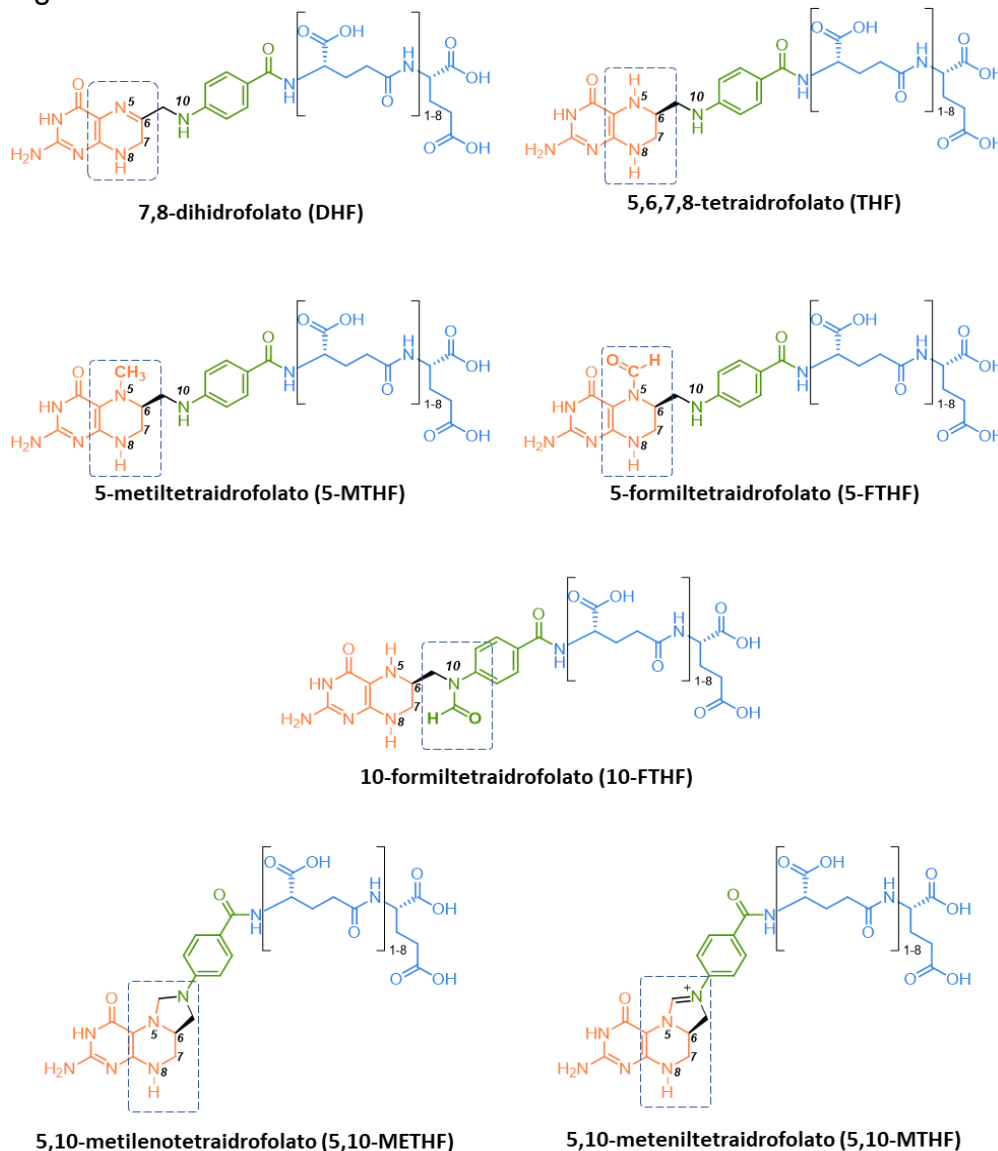
Figura 1 - Estrutura molecular do ácido fólico e as unidades básicas que compõe a estrutura molecular.



Fonte: A autora (2021).

As moléculas encontradas naturalmente não são idênticas ao ácido fólico e sim estruturas análogas em que são observadas 3 principais distinções, como: (a) a redução do anel pteridínico na forma de di- ou tetraidropteridina, (b) a presença de mais ácidos glutâmicos ligados a estrutura e (c) a presença de grupos metila, formila ligados aos nitrogênios N5 ou N10 (Figura 2) (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

Figura 2 - Estrutura molecular de diferentes formas naturais de folatos.



Fonte: A autora (2021).

Assim, é de consenso que o termo ácido fólico deve ser empregado apenas para a forma sintética, completamente oxidada. Dentre os diferentes nomes usuais para o ácido fólico, vitamina B₉ é a mais frequente. Entretanto, nomes como folacina,

ácido pteroilglutâmico e vitamina M, também são empregados. Já o termo folatos deve ser empregado para as formas naturais e biologicamente ativas (PINTO, 2017).

Segundo Higdon (2014), foi definida uma unidade de medida pelo Food and Nutrition Board do US Institute of Medicine para a recomendação de folato na dieta alimentar, o Equivalente de Folato Dietético (DFE). O uso dessa unidade demonstra a biodisponibilidade do ácido fólico encontrado em alimentos enriquecidos em comparação com a vitamina presente de forma natural nos alimentos.

Como exemplo, uma porção de alimento com 60 µg de folato fornece 60 µg de DFE, ao passo que 60 µg de um alimento fortificado (ácido fólico) fornece cerca de 102 µg de DFE, devido a maior biodisponibilidade do ácido fólico.

Na Tabela 1 são verificados os dados da quantidade de folatos e ácido fólico presente em alguns alimentos. O folato além de ser encontrado em vegetais folhosos pode ser encontrado também no feijão, lentilha e ervilhas. Em fontes de origem animal o folato é encontrado por exemplo na gema de ovo, fígado e também na microbiota intestinal, já que é responsável pela síntese da vitamina B₉ no organismo (HIGDON, 2014).

Tabela 1 - Alimentos fontes de folatos, e as respectivas quantidades em µg DFE por porção.

Alimento	Porção	Folato (µg DFE)^a
Lentilhas (sementes maduras, cozidas, fervidas)	½ xícara	179
Grão-de-bico (cozido)	½ xícara	141
Espargos (cozidos, fervidos)	½ xícara	134
Espinafre (cozido)	½ xícara	131
Feijão-lima	½ xícara	78
Suco de laranja (cru)	177 mL	56
Espaguete (enriquecido, cozido)	1 copo	167
Arroz branco (enriquecido, cozido)	1 copo	153
Pão (enriquecido)	1 fatia	84

DFE = equivalente de folato dietético

Fonte: Adaptado de HIGDON (2014).

Mais de 80% de ácido fólico é encontrado na forma de resíduos de ácido L-glutâmico ligados ao ácido *p*-aminobenzoico, para que ocorra sua absorção é necessário sofrer hidrólise com a enzima peptidase (PINTO, 2017).

2.1.1 Efeitos biológicos

Para a síntese de DNA e reprodução celular, o ácido fólico é essencial na nutrição alimentar. O folato e a vitamina B₁₂ estão associadas metabolicamente, com isto, não se pode distingui-las caso exista a falta de alguma dessas vitaminas. A carência de ácido fólico está ligada principalmente a falhas relacionadas a anomalias no desenvolvimento funcional e estrutural do feto, além de problemas cardiovasculares e na medula óssea (RANG et al., 2016).

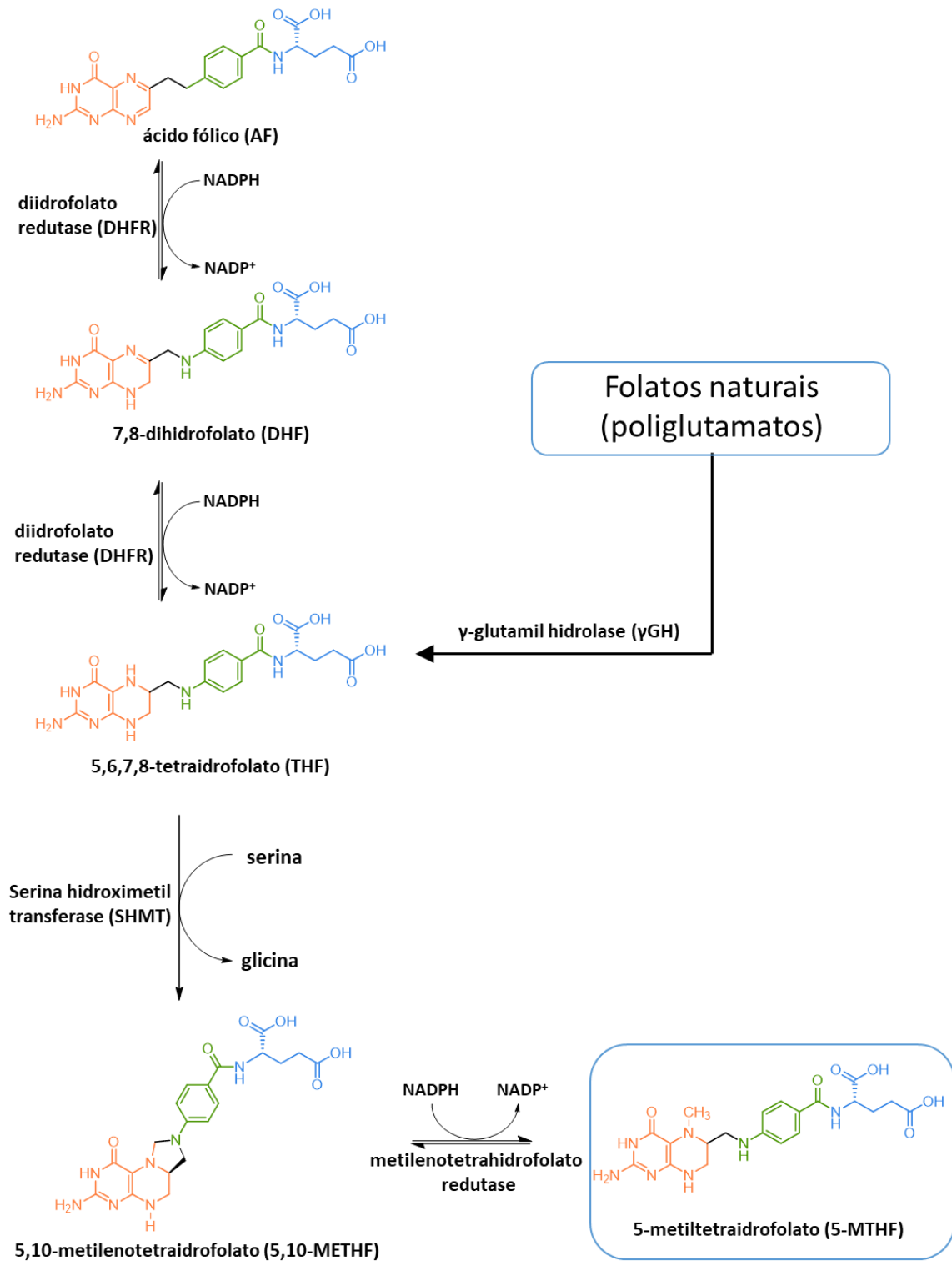
Conforme afirma Pinto (2017), o maior consumo de ácido fólico ocorre na gestação, pois a falta desse pode ocasionar sérios problemas neurológicos a criança e até mesmo o não fechamento do canal vertebral. Além disso, podem ocorrer o antagonismo da vitamina devido a substâncias presentes em medicamentos, como, metotrexato, utilizado para tratamento de câncer e remédios para controle de convulsões, na qual disputam pelos mesmos receptores intestinais.

2.1.2 Mecanismo de ação

O ácido fólico é uma forma de folato obtido por síntese química, com estrutura similar aos folatos naturais. Uma vez que o anel pteridínico está totalmente oxidado, o ácido fólico se torna mais estável que as outras formas de folato e, portanto, é a forma preferencial para ser administrado na forma de medicamento ou na fortificação de alimentos. Outra vantagem do ácido fólico frente aos folatos naturais é que não há necessidade da hidrólise das unidades de ácido L-glutâmico até a forma de monoglutamato, sendo melhor aproveitado no organismo humano. Assim, o ácido fólico é convertido mais facilmente a forma bioativa 5,6,7,8-tetraidrofolato (THF).

A redução do anel pteridínico ao THF ocorre pelas enzimas diidrofolato-reductase (Figura 3). Este processo torna o ácido fólico inativo em uma vitamina ativa, pois a molécula fica com um átomo de carbono instável se tornando um ótimo doador de carbono na biossíntese de nucleotídeos (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

Figura 3 - Metabolismo do ácido fólico levando ao folato bioativo 5,6,7,8 tetraidrofolato (THF) e posterior metilação ao 5-metiltetrafolato (5-MTHF)



Fonte: Adaptado de Smith; Marks; Lieberman (2007).

Segundo Alaburda e Shundo (2007), os folatos agem no metabolismo por meio de duas sínteses diferentes: (1) síntese de DNA a partir de seus precursores e (2)

síntese de metionina, a qual é importante para a síntese de S-adenosilmetionina. Este último desempenha papel de doador do grupo metila, utilizado nas reações biológicas de metilação, reação importante na prevenção de câncer.

2.2 FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM ÁCIDO FÓLICO

De acordo com Vellozo (2010) uma alimentação balanceada desde a gestação favorece para um crescimento e desenvolvimento sadio. No entanto, situações diversas podem dificultar a inserção de algumas vitaminas importantes na dieta alimentar, como as vitaminas do grupo B, que são pouco ingeridas pela população. Apesar das quantidades necessárias serem pequenas, a falta destas vitaminas no organismo pode acarretar doenças de formação do feto, anemia e doenças cardiovasculares na fase adulta.

O problema do fechamento do tubo neural (FTN) acontece no início do desenvolvimento do embrião, cerca de 28 dias após a concepção e esse problema foi uma das causas da mortalidade infantil no século XX. Após estudo realizado pelo Conselho de Pesquisa Britânico de Medicina, a doença foi relacionada com a falta de vitamina B₉ no organismo de gestantes (CRIDER; BAILEY; BERRY, 2011).

De acordo com Crider; Bailey e Berry (2011) o estudo indicou que a suplementação com ácido fólico favorecia na prevenção de FTN e que mulheres que apresentaram gravidez com esse problema reduziram em 70% o problema na segunda gestação, utilizando 4.000 µg de ácido fólico diariamente. Para um estudo realizado na Hungria, mulheres que utilizaram cerca de 800 µg da vitamina no pré-natal apresentaram redução de 100% na patologia.

Além dos problemas relacionados ao desenvolvimento embrionário, a deficiência de vitamina B₉ pode ocasionar complicações cardíacas e desenvolvimento de cânceres, o estudo de Higdon (2014) salienta que a ingestão diária mínima, recomendada de ácido fólico para evitar esses problemas na fase sênior deve ser de 400 µg.

A partir desses resultados iniciou-se programas de fortificação nos países, porém, incentivar as pessoas ao consumo de alimentos ricos em folatos não foi suficiente para obter resultados eficazes. Com isto, os países optaram pela fortificação de alimentos consumidos pela população, essa estratégia tem sido considerada eficiente com relação ao custo-eficácia. Para a escolha dos alimentos fortificados leva-

se em consideração fatores como: rotina e hábitos alimentares da população, disposição do alimento e correlação entre o ácido fólico e o alimento fortificado. A maioria dos países encontraram na farinha de trigo a opção alimentar para a inserção da vitamina B₉ na alimentação diária (ALABURDA; SHUNDO, 2007).

2.2.1 Legislação brasileira para fortificação de ácido fólico

No Brasil a fortificação tornou-se obrigatória em 2004 com a resolução RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2002) que estabelece:

“É obrigatória a adição de ferro e de ácido fólico nas farinhas de trigo e nas farinhas de milho pré-embaladas na ausência do cliente e prontas para oferta ao consumidor, as destinadas ao uso industrial, incluindo as de panificação e as farinhas adicionadas nas pré-misturas, devendo cada 100g de farinha de trigo e de farinha de milho fornecerem no mínimo 4,2 mg (quatro vírgula dois miligramas) de ferro e 150 mcg (cento e cinquenta microgramas) de ácido fólico.”

As regras de fortificação foram alteradas com a Resolução RDC nº 150 de 13 de abril de 2017, com um prazo de 24 meses para as empresas se adequarem com os novos parâmetros que passaram a ser de 4 mg a 9 mg de ferro de 140 µg a 220 µg de ácido fólico para cada 100 g de farinhas de trigo e milho (ANVISA, 2017a).

A resolução ainda determina que o ácido fólico utilizado na fortificação deve ser de grau alimentício e garantir estabilidade até o prazo de validade das farinhas. Além de ser obrigatório apresentar no rótulo a frase de fortificação com ácido fólico (ANVISA, 2017a).

Ainda de acordo com Anvisa (2017a), a empresa que não cumprir as exigências estabelecidas, está sujeita as penalidades definidas pela Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, o qual abrange as infrações à legislação sanitária. As punições definidas variam de acordo com a classificação da gravidade da infração, podendo ser aplicada advertência, multa com valores entre de R\$ 2.000,00 a R\$ 1.500.000,00, confisco, suspensão e até o cancelamento do registro do produto.

Em dezembro de 2013, conforme dados publicados no site da Anvisa, um moinho no estado do Paraná foi autuado, sendo proibida a venda do produto devido apresentar 124 µg de ácido fólico para 100 g de farinha, abaixo do permitido (150 µg/100g) (ANVISA, 2013). Em 2014, outro moinho localizado no estado de Minas

Gerais foi notificado com medida cautelar por não apresentar o teor obrigatório de ácido fólico. Neste caso foi verificado que as farinhas apresentavam um teor de ácido fólico de 98 µg/100 g (BRASIL, 2014).

Para garantir resultados válidos que auxiliem as empresas a se manterem dentro da legislação e fornecer ao consumidor produtos que contribuam para a redução de patologias, se buscam métodos rápidos, eficientes e de qualidade para a quantificação da substância (OSSEYI; WEHLING; ALBRECHT, 1998).

2.3 METÓDOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO

O estágio de extração é um dos pontos mais significativos para se obter resultados exatos e precisos. A definição do método deve levar em consideração variáveis como o pH, temperatura, solventes e demais condições experimentais que favoreçam a quantificação do analito (ALABURDA; SHUNDO, 2007).

Segundo Prado (2012), em razão da família de vitaminas do ácido fólico apresentarem características físico-químicas diferentes, a definição do método apropriado depende do analito e da matriz na qual se busca quantificar. A determinação do ácido fólico é considerada difícil em razão da sua estrutura molecular, de suas diferentes formas e pela baixa estabilidade. Por esse motivo, se torna necessário o desenvolvimento de um método de quantificação rápido, com baixo custo e eficiente (FARAJI; MAHMOODI-MAYMAND; DASTMALCHI, 2020).

Um método que vem se destacando para extrações em ensaios de cromatografia é o método QuEChERS (acrônimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*). A metodologia proporciona resultados com elevada qualidade, poucas etapas e baixo consumo de solventes, porém possui custo elevado (PRADO, 2012).

O trabalho de Catharino, Godoy e Lima-Pallone (2006), validou a determinação de ácido fólico pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, em que foram analisadas amostras de fígado de porco, leite em pó e misturas de vegetais. Para extração utilizou-se 1 g de amostra, homogeneizada com acetato de amônio em banho ultrassom, a leitura realizada empregando-se CLAE apresentou resultados próximos dos padrões de referência e taxas de recuperação em média de 95%, concluindo-se satisfatório a aplicação do método para de terminação de ácido fólico em alimentos.

O método para extração em farinhas utilizado por Boen et al. (2008), foi adaptado de Catharino; Godoy; Lima-Pallone, (2006). O ácido fólico foi extraído com acetonitrila, hidróxido de potássio, tampão fosfato e ácido tricloroacético. O extrato primeiramente foi filtrado em papel qualitativo, em seguida passado por uma membrana PTFE 0,45 µm e para análise foram injetados 20 µL do extrato final. Os resultados obtidos foram adequados, com recuperação em torno de 94 a 97%.

A clarificação do extrato utilizando SPE com cartuchos em fase sólida fortemente aniônica (SAX), apontou ser uma alternativa viável para o ensaio. Pois, além de apresentar resultados eficientes na retenção do ácido fólico na farinha, demonstrou baixa retenção de elementos extraídos (PRADO, 2012).

Amostras de leite em pó fortificadas com ácido fólico foram analisadas e validadas por Catharino, Visentainer, Godoy (2003) apresentando resultados satisfatórios. Dentre as variáveis avaliadas estão a composição da fase móvel, sistema de eluição, soluções de limpeza do extrato, detecção e estabilidade. Com isto, concluiu-se que a estabilidade de ácido fólico se dá em soluções com pH maior que 6,5; e a extração do analito com solução alcalina em banho ultrassônico, seguida da clarificação com solução de ácido tricloroacético, juntamente com eluição por gradiente e detector ultravioleta com comprimento de onda de 290 nm, demonstraram resultados de 98,5% de recuperação, tornando-se um método adequado para determinação de ácido fólico.

2.4 MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO

Segundo Catharino; Godoy; Lima-Pallone (2006) a determinação de vitaminas em alimentos é um processo que envolve muitas dificuldades pelo fato de apresentarem baixas concentrações. Para quantificação é necessário empregar métodos analíticos que assegurem os resultados obtidos. Os métodos mais indicados para determinação de ácido fólico são bio-específicos, microbiológico e físico-químicos, sendo os dois últimos os mais empregados (ALABURDA; SHUNDO, 2007).

Os métodos bio-específicos podem ser realizados pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), na qual ocorrem reações antígeno-anticorpo e análise por radioensaio. No entanto, este é comumente aplicado para determinações de vitaminas no sangue, tendo sua aplicação em alimentos restrita (ALABURDA; SHUNDO, 2007)

A determinação por microbiologia é a mais utilizada para determinação de ácido fólico e baseia-se na determinação da turbidez do meio, que é proporcional ao crescimento do microrganismo láctico na presença de folato, a bactéria eficiente para esse método a *Lactobacillus casei* (SHRESTHA; ARCOT; PATERSON, 2000). Como vantagens do ensaio se pode citar baixo custo, alta sensibilidade e determinação de folatos total, porém necessita de período longo de incubação o que dificulta a rotina laboral (ALABURDA; SHUNDO, 2007).

Determinações de ácido fólico por vias físico-químicas podem ser realizadas por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. Conforme Skoog et al. (2014), o espectrofotômetro é um equipamento que converte intensidade radiante em sinais elétricos tendo como vantagem avaliar um espectro de absorção. A metodologia por espectroscopia é baseada na lei de Lambert-Beer, em que a quantidade de radiação absorvida em determinado comprimento de onda é proporcional a concentração do analito que se deseja quantificar.

A espectrofotometria é comumente utilizada em princípios ativos de fármacos, pois permite a identificação de grupos funcionais. A aplicação deste método na rotina se torna viável, pois além de ser consolidado e robusto, possui baixo custo (ANVISA, 2019; ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

A metodologia por CLAE consiste na separação dos analitos de uma amostra, na qual a amostra é injetada e misturada na fase móvel, que percorre a fase estacionária sendo quantificada de acordo com o tempo de retenção, área do pico e afinidade com a coluna. Além dessas variantes a escolha do tipo de detector auxilia na quantificação, pois emite um sinal para cada composto separado (CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2017).

2.5 DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Segundo Tejerina (2011) a cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica com objetivo de identificar e quantificar substâncias de uma amostra pela separação destas, de acordo com a afinidade da fase estacionária. Para isto, a fase móvel deve apresentar grau elevado de pureza, detector adequado e principalmente, dissolver a amostra sem interagir com a mesma.

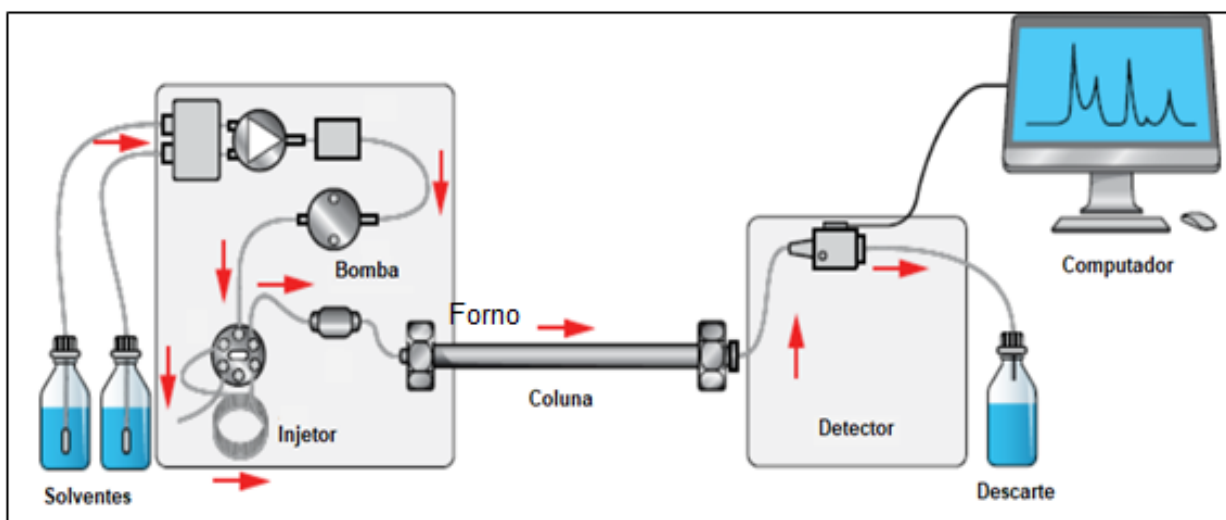
A fase estacionária é composta normalmente de sólidos com propriedade de fixar o analito em sua superfície, quanto maior afinidade entre ambos, maior será o

resultado do tempo de retenção do analito na coluna (DIAS et al., 2016). A técnica se torna indispensável em laboratórios, pois além de simples e rápida é eficiente.

2.5.1 Instrumentação de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência

De acordo com Dias et al. (2016), o sistema cromatográfico de alta eficiência (Figura 4) consiste em sete acessórios principais: reservatórios para fase móvel, bomba, forno, computador para inclusão e coleta de dados, coluna, injetor e detector.

Figura 4 - Esquema ilustrativo de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.



Fonte: Iris et al. (2021).

O reservatório de fase móvel é constituído de frascos de vidro que armazenam a fase móvel e os outros solventes que serão utilizados no ensaio. Em seguida tem-se a bomba, com finalidade de assegurar uma vazão contínua, propiciando um fluxo efetivo para o percurso do eluente na coluna. A bomba deve garantir precisão e exatidão no fluxo, usualmente utiliza-se 1 mL min^{-1} . Para que possam suportar altas pressões as bombas são fabricadas em aço inox, poli (éter-éter-cetona) ou titânio (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; IRIS et al. 2021).

Segundo Iris et al. (2021), o forno tem o objetivo de acomodar a coluna mantendo-a com temperatura constante. A temperatura é um dos fatores importantes que asseguram a repetitividade das análises. O aumento da temperatura acelera o processo do analito em deixar a coluna, em regra os fornos trabalham com temperaturas de até $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.5.2 Escolha da fase móvel adequada para determinação de ácido fólico

Segundo Dias et al. (2016), algumas propriedades precisam ser analisadas para escolha da fase móvel: baixa viscosidade para facilitar a eluição; capacidade em solubilizar o analito; não reagir com a fase estacionária; elevado grau de pureza e ainda ser desgaseificada para evitar a formação de bolhas.

A eluição do solvente pode acontecer de modo isocrático, quando um ou mais solventes percorrem a coluna em concentração constante ou pela técnica de gradiente, na qual a concentração do solvente é alterada durante a análise. Geralmente este segundo favorece a eficiência na separação dos analitos (SKOOG et al., 2014).

2.5.3 Tipos de colunas cromatográficas

Os cuidados com a extração da amostra, fase móvel, bomba de fluxo constante e detectores não são suficientes para o alcance de resultados satisfatórios se a fase estacionária não for escolhida com muita atenção (IRIS et al., 2021).

Geralmente as colunas (Figura 5) são tubos fabricados em aço inoxidável para suportar pressões elevadas, mas também se encontram em materiais de vidro e Tygon para pressões menores que 600 psi. O comprimento e diâmetro variam de 3 a 30 cm e 1 a 5 mm, respectivamente, sendo o principal recheio das colunas partículas de sílica, mas ainda existem recheios de alumina, polímeros porosos e resina de troca iônica (DIAS et al., 2016).

Figura 5 - Colunas cromatográficas



Fonte: Iris et al. (2021).

As colunas são recheadas com partículas esféricas com diâmetro de 3 e 10 μm , essas colunas apresentam cerca de 40.000 a 60.000 pratos m^{-1} , porém já existem colunas com diâmetros de 1 a 4,6 μm e comprimento de 3 a 7,5 cm, essas possuem cerca de 100.000 pratos m^{-1} , características que trazem velocidade e menor consumo de solventes, que por sua vez, são caros pela exigência de pureza (SKOOG et al., 2014).

Alguns procedimentos indicam utilizar colunas denominadas colunas de sacrifício, instaladas antes da coluna principal e tem como objetivo proteger o sistema cromatográfico. É composta pelo mesmo recheio da coluna principal, entretanto suas partículas possuem diâmetros maiores para reter contaminantes do solvente e isto auxilia no aumento da vida útil da coluna analítica (DIAS et al., 2016).

2.5.4 Injetores

A análise do composto se inicia de fato, no momento em que a amostra é injetada no cromatógrafo. Na cromatografia líquida de alta eficiência a amostra pode ser injetada de forma manual ou automática. No entanto, a maioria dos equipamentos já são adaptados com amostradores automáticos, sistema que facilita o dia-dia do laboratório, pois possui praticidade, menor tempo na injeção, mantém o amostrador preparado para a próxima amostra, além de conferir repetitividade nos resultados (IRIS et al., 2021).

O injetor é constituído por um reservatório de amostra e uma válvula que orienta o líquido conforme estabelecido pelo analista. A injeção acontece por uma seringa que aspira um volume de amostra superior ao volume da alça de amostragem (DIAS et al., 2016).

2.5.5 Tipos de detectores

Os detectores são instalados logo após a coluna cromatográfica, responsável pela detecção e quantificação do analito. O analito ao passar pela coluna emite um sinal elétrico representado no detector em formatos de pico. A escolha do detector irá depender da natureza do analito (IRIS et al., 2021).

Os principais detectores aplicados em CLAE são: fluorescência, espalhamento de luz por evaporação, índice de refração, infravermelho, eletroquímico,

espectrometria de massas, ressonância magnética e absorvância no UV-Vis. A definição do melhor detector para a análise deve levar em consideração as características de sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão e faixa linear (IRIS et al., 2021).

O detector além de transmitir o pico correspondente a substância, muitas vezes emite ruídos que podem ser diminuídos pela mudança de fluxo de eluente, eliminação de bolhas de ar, aumento de temperatura de aquecimento do detector e ou técnica de eluição por gradiente. Segundo PRADO (2012), podem ser destrutivos: espectrômetros de massas e eletroquímicos, nestes a amostra é modificada durante o processo de detecção, e os não-destrutivos: os detectores óticos por absorvância no ultravioleta-visível, infravermelho, índice de refração e fluorescência.

Para a determinação de ácido fólico estudos indicam um melhor desempenho com a utilização de detector por absorvância no ultravioleta-visível (UV/Vis) com arranjo de diodos (DAD). O mecanismo de detecção ocorre pela transformação da intensidade de transmitância em sinal elétrico, ou seja, quando a luz emitida pela lâmpada atravessa a célula de fluxo e encontra o analito que eluiu da coluna. Os detectores UV são divididos em fotômetros, espectrofotômetros de comprimento de onda variável e os espectrofotômetros com arranjo de diodos (IRIS et al., 2021).

Os fotômetros utilizam radiações com comprimentos específicos, esse equipamento gera radiações que podem ser absorvidas por diversos grupos funcionais. Para detector do tipo comprimento de onda variável, é utilizado monocromador que serve para isolar uma banda estreita de comprimentos de onda. A lâmpada mais utilizada é a de deutério que emite na região do ultravioleta (190 a 380 nm) e a de tungstênio para a região do visível (380 a 780 nm).

O detector com arranjo de diodos é um sistema que permite caracterizar todos os espectros da amostra eluída, isso acontece porque a amostra é irradiada com uma fonte de luz contínua. Todas as radiações UV entram em contato com o analito que está percorrendo junto a fase móvel. Parte dessa radiação é absorvida e refletida para uma rede de difração que se propaga sob uma malha de fotodiodos (DIAS et al., 2016; IRIS et al., 2021).

A identificação e quantificação do analito é realizada pelo seu espectro, área de pico e o tempo de retenção. A confirmação se dá a partir das comparações com as bibliotecas já existentes no próprio software, ou ainda desenvolvida pelo próprio analista (IRIS et al., 2021).

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Validação de método tem a finalidade de atestar a eficiência do laboratório na reprodução de resultados analíticos válidos, e para isto, ao utilizar um método normalizado ou adaptado torna-se primordial realizar uma avaliação para demonstrar que os resultados atingidos são reproduzidos de acordo com as condições e estrutura do laboratório (EPA. USA, 2016).

A NBR ISO/IEC 17025:2017, preconiza que métodos não normalizados, desenvolvidos pelo laboratório ou modificados devem ser validados, diferente de métodos já padronizados em que se faz necessário uma verificação de método demonstrando em registros o alcance de resultados confiáveis na sua rotina (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017).

Com a finalidade de orientar laboratórios de ensaio na garantia de obtenção de resultados válidos aplicados em suas dependências, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia INMETRO (2020) desenvolveu um documento com diretrizes para validação de métodos. A validação inicia-se com definição do escopo, parâmetros, critérios de aceitação, equipamentos disponíveis, realização dos ensaios, avaliação dos resultados e por fim, conclusão sobre a aplicação do método.

Para Albano; Rodriguez (2015) é fundamental que o laboratório defina a utilização de metodologias atualizadas e referenciadas por normas internacionais ou nacionais. Para escolha do método deve-se avaliar as condições de amostragem, medição e ensaio, para assim afirmar que o método proposto é adequado para tal finalidade. Os principais parâmetros de desempenho do método quando aplicáveis são:

- a) seletividade - um dos primeiros requisitos a serem aplicados na validação, pois avalia-se quanto a metodologia é indiferente a presença da matriz, garantindo que os efeitos não são significativos;
- b) linearidade/faixa de trabalho – É a capacidade de obter resultados proporcionais a concentração do analito numa faixa linear de trabalho inferior e superior. A regressão linear é avaliada pela equação da reta $y = ax + b$, na qual o intervalo de aceitação da curva é definido pelo coeficiente de determinação (R^2) $> 0,9945$;

- c) limite de quantificação (LQ) – É a menor concentração do analito que pode ser determinada quantitativamente com exatidão e precisão, na prática corresponde a concentração do primeiro ponto da curva de calibração;
- d) limite de detecção do método (LDM) – É a menor concentração do analito detectável pelo método, essa medida deve apresentar cerca de 95 a 99% de confiança que a concentração da substância é maior que zero;
- e) robustez – É um parâmetro opcional para validação de método, sendo a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações;
- f) precisão – É calculada pelo desvio padrão da amplitude entre um conjunto de leituras, as quais são realizadas com mesmo procedimento, analista, equipamento, local e condições. Esta reflete a tendência de maior ou menor erro da repetibilidade e reprodutibilidade;
- g) exatidão – Avalia a concordância entre um resultado verdadeiro e o obtido no ensaio. A exatidão pode ser aplicada pela comparação com um método já definido ou pela taxa de recuperação da fortificação de uma matriz branca com analito.

Após a validação do método, é necessário estabelecer procedimentos de controle de qualidade para acompanhar e monitorar os métodos. Pode-se citar a utilização de padrões de referência, calibrações de equipamentos, participação em ensaios de proficiência e estabelecer treinamento contínuo da equipe (EURACHEM, 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A fase experimental deste trabalho consistiu na extração, quantificação e validação de método para determinação do ácido fólico em farinha de trigo. Para isto, foi realizada a extração do analito seguida da determinação das condições para sua quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/Vis.

3.1 MATERIAIS

Foram analisadas 5 marcas de farinha de trigo tipo I, denominadas como amostras A, B, C, D e E obtidas em supermercados da cidade de Caxias do Sul, RS. A farinha de trigo do tipo I, sem a adição de ácido fólico, foi doada pelo Moinhos Galópolis S/A (Caxias do Sul, distrito de Galópolis – RS) e utilizada como matriz de referência. A mistura empregada como fortificante nas farinhas, contendo ferro ($20.626,84 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) e o ácido fólico ($879,5135 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), da marca Doremus Nutrimix FME (lote M17091/0421) também foi doado pelo Moinhos Galópolis S/A.

O padrão de ácido fólico, com pureza de 97% (lote F7876), foi obtido da Sigma-Aldrich. Todos solventes grau CLAE, foram adquiridos da empresa Merck. Os demais reagentes foram empregados como obtidos, sem prévia purificação. A água ultrapura do tipo I foi obtida em um purificador Millipore (modelo Direct-Q3 UV).

Os cálculos para validação do método foram determinados pelo software Microsoft Excel 2016.

3.2 MÉTODOS

O método de extração e quantificação do ácido fólico em farinha de trigo foi adaptado de Catharino, Visentainer e Godoy (2003) e a validação do método foi executada de acordo com Anvisa (2017b), Associação Brasileira de Normas Técnicas (2017), Albano; Rodriguez (2015) e INMETRO (2020).

3.2.1 Extração do ácido fólico em farinha de trigo tipo I

Para obter resultados efetivos na validação do método, a extração da amostra é a etapa mais importante do método, representando a maior fonte de erro na

determinação da vitamina. Para evitar uma extração inadequada que resulte em resultados errôneos, deve-se avaliar a melhor solução que extraia o analito sem a ocorrência de perdas na quantificação (CATHARINO; VISENTAINER; GODOY, 2003).

Quando concluída a etapa de extração, deve-se assegurar que o extrato em que se encontra o analito esteja livre de interferentes e para isto, é realizada a etapa de clarificação e filtração do extrato. Segundo CONAB (2017) a farinha de trigo é composta principalmente de proteínas, carboidratos, lipídeos e fibras e, são esses compostos que devem ser removidos ou minimizados na etapa de clarificação e filtração, facilitando a quantificação do ácido fólico.

A Figura 6 representa o fluxograma de extração e clarificação do ácido fólico em farinha de trigo tipo I. Para os ensaios de extração foram medidas alíquotas de 1 g da amostra de farinha de trigo tipo I e transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Após, a cada balão foi adicionado 3,0 mL de uma solução aquosa de hidróxido de potássio de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, as misturas foram dispersadas com o auxílio de um banho ultrassônico (modelo Unique), com frequência de 40 KHz, por 10 min. Para a clarificação, foram adicionados 3 mL de ácido fosfórico de concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 350 μL de ácido tricloroacético, e completado o volume do balão com solução tampão fosfato (fosfato dissódico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ / fosfato de potássio monobásico $0,37 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5).

Após a homogeneização, a amostra foi transferida para tubos de centrífuga (modelo Eppendorf), na qual foi submetida a 3600 rpm, por 10 min. Após foi filtrada em membrana de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF), marca Whatman, de porosidade $0,22 \mu\text{m}$ e diâmetro de 13 mm. O extrato purificado foi transferido para um vial de 2 mL para determinação por CLAE.

Figura 6 - Fluxograma de extração e clarificação de ácido fólico em farinha de trigo



Fonte: A autora (2021).

3.2.2 Definição das condições experimentais para quantificação do ácido fólico por cromatografia líquida de alta eficiência

A quantificação foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-20AD, equipado com um controlador CMB-20A, forno de coluna CTO-20A e um detector UV SPD-20^a no comprimento de 290 nm. Foi utilizada uma coluna com fase estacionária de sílica ligada a octadecilsilano (C18), (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) (modelo ROC C18), protegida por uma coluna de sacrifício (4x10mm) (modelo ROC C18), ambas da marca Restek. O fluxo da fase móvel na quantificação de ácido fólico foi de 0,5 mL min⁻¹ com eluição isocrática de 85% de tampão acetato pH 2,8 e 15% de acetonitrila. Todos os procedimentos foram conduzidos a temperatura de 30 °C, o tempo de retenção do ácido fólico foi em 7,6 min, com eluente permanecendo na coluna até completos 15 min para eluir todos compostos presentes na matriz.

3.2.3 Quantificação do ácido fólico por cromatografia líquida de alta eficiência

A curva de calibração foi preparada com 9 concentrações a partir de uma solução padrão de ácido fólico de 1000 µg mL⁻¹. As diluições foram realizadas em balões volumétricos de 10 mL com tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 6,5). Sendo injetado 20 µL no sistema cromatográfico em ordem crescente de concentração, tendo como

critério de aceitação uma curva linear com coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,9945. Em seguida iniciou-se as leituras das amostras. Após, os resultados foram avaliados e se a concentração fosse superior à concentração máxima da curva de calibração, realizou-se a diluição da amostra conforme necessário.

3.2.4 Processo de validação do método para quantificação do ácido fólico

3.2.4.1 Seletividade do método e efeito matriz

Para determinar a seletividade do método e o efeito matriz, foi preparado o extrato a partir de 10 g da matriz de referência, ou seja, a farinha de trigo sem a adição de ácido fólico. Nessa amostra foram adicionados 30 mL de hidróxido de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, dispersado em ultrassom por 10 min, em seguida realizou-se a clarificação com 30 mL de ácido fosfórico e 3,5 mL de ácido tricloroacético, completou-se o balão com solução tampão fosfato pH 6,5. Após, o extrato foi transferido para tubos de centrifuga e submetido a 3600 rpm por 10 min.

Para o preparo da curva de calibração com a matriz de referência, em 6 balões volumétricos de 10 mL foram adicionados 0,15, 0,50, 1, 2, 3 e 5 mL da solução padrão de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ para o preparo das concentrações de 15, 50, 100, 200, 300 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente e avolumados com a solução extraída da amostra de referência.

Para o preparo da curva de calibração sem a matriz, as mesmas 6 concentrações foram adicionadas em 6 balões e completados apenas com solução tampão fosfato pH 6,5. Ambas as curvas de calibração foram filtradas com membrana de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF), antes de serem injetadas na CLAE.

A seletividade foi avaliada comparando as regressões lineares das duas curvas de calibração com e sem matriz juntamente com o teste F (Fischer-Snedecor) (Equação 1) que avalia as variâncias das curvas, verificando estatisticamente se possuem diferenças significativas (ALBANO; RODRIGUEZ, 2015).

$$F_{calculado} = \frac{S_{maior}^2}{S_{menor}^2} \quad (1)$$

Onde:

s: desvio padrão

Compara-se o $F_{\text{calculado}}$ com F_{tabelado} (Tabela 2), o segundo se obtém analisando os graus de liberdade da curva ($n-1$), onde n é o número de repetições que foram aplicadas para o cálculo da variância. Neste método o n é 3, pois cada ponto foi calculado com 3 repetições.

Tabela 2 - Determinação $F_{\text{calculado}}$ conforme os graus de liberdade aplicado para o método

Alfa = 0,05	Maior s^2 (n-1)					
Menor s^2 (n-1)	1	2	3	4	5	6
1	161,446	199,499	215,707	224,583	230,160	233,988
2	18,513	19,000	19,164	19,247	19,296	19,329
3	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941

Fonte: Albano; Rodriguez (2015).

Para o efeito matriz, foram comparados os coeficientes de inclinação das curvas de calibração construídas com padrão de ácido fólico em tampão fosfato pH 6,5 e com padrão em solução extraída da amostra de referência (sem ácido fólico). O indicativo de ausência de interferentes foi avaliado pelo paralelismo entre as curvas com e sem matriz e pelo Teste-t, no qual verifica-se diferenças entre duas variáveis no método; tanto para o Teste-t como para o Teste-f foi utilizado um alfa de 0,05 que corresponde a 95% de confiança (ALBANO; RODRIGUEZ, 2015).

3.2.4.2 Limite de quantificação (LQ)

Para determinar o limite de quantificação, foram analisadas 9 concentrações diferentes do padrão de ácido fólico em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5), sendo elas: 9, 15, 20, 50, 100, 200, 300, 400 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram analisadas em triplicata, nas condições cromatográficas citada no Item 3.2.2, gerando 3 curvas de calibração.

A média dos desvios padrão para o intercepto, com a média dos valores para as inclinações obtidas a partir das equações de cada curva de calibração foram aplicados na Equação 2.

$$LQ = \frac{10 \times \bar{s}}{\overline{IC}} \quad (2)$$

Onde:

\bar{s} : média desvio padrão intercepto com eixo Y da curva de calibração

\overline{IC} : média da inclinação da curva de calibração

3.2.4.3 Limite de detecção do método (LDM)

A determinação do LDM também foi obtida a partir da média do desvio padrão do intercepto com o eixo Y e inclinação da reta obtidas das equações das curvas de calibração, conforme a Equação 3.

$$LDM = \frac{3,3 \times \bar{s}}{\overline{IC}} \quad (3)$$

3.2.4.4 Faixa de trabalho

A faixa linear de trabalho foi determinada a partir da escolha de 16 concentrações aleatórias de ácido fólico, dentre estas, deu-se preferência para as concentrações estabelecidas pela Resolução RDC nº 150, de 140 e 220 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$. A partir dos resultados, aplicou-se a regressão linear obedecendo o modelo matemático da equação linear (Equação 4), onde o x é variável independente (concentração da solução padrão) e y a variável dependente (sinal analítico obtido). Avaliou-se a linearidade da curva pelo coeficiente de determinação (R^2) que explica a variabilidade de um modelo estatístico linear, quanto mais próximo de 1 melhor o ajuste da reta é explicado (ALBANO; RODRIGUEZ, 2015).

$$y = ax + b \quad (4)$$

3.2.4.5 Linearidade da curva de calibração e faixa linear

Para a determinação da linearidade e faixa linear foram realizadas análises por CLAE de 9 concentrações (9, 15, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) de solução

padrão de ácido fólico correspondentes a faixa de trabalho considerada linear. Cada análise foi realizada em triplicata. A partir dos resultados, aplicou-se a regressão linear (Equação 4) e avaliou-se o coeficiente de determinação (R^2) utilizando o software Microsoft Excel 2016.

3.2.4.6 Exatidão do método

Para a análise de exatidão do método foram analisadas em triplicata 3 concentrações (140, 220 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) de analito dentro da faixa linear de trabalho estabelecida. Com os resultados, calculou-se a taxa de recuperação (Equação 5) relacionadas as quantidades conhecidas do analito.

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (5)$$

Onde:

C_1 : concentração do analito na amostra fortificada.

C_2 : concentração do analito na amostra não fortificada.

C_3 : concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

3.2.4.7 Repetibilidade do método

Foram preparadas 9 replicatas com 3 concentrações (9, 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a partir da solução padrão de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, analisadas sob as mesmas condições operacionais, mesmo analista e no mesmo dia. Para isto, calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) pela Equação 6.

$$\text{DPR}(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde:

DPR = Desvio padrão relativo

s = Desvio padrão

\bar{x} = Média das concentrações

3.2.4.8 Precisão intermediária

Para o nível de precisão intermediária foram analisadas 9 replicatas com 3 concentrações (9, 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a partir da solução padrão de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no intervalo de 10 dias. O resultado foi avaliado pelo desvio padrão relativo (Equação 6).

3.2.4.9 Análise da quantificação do ácido fólico em amostras comerciais

Avaliou-se 5 marcas de farinha de trigo tipo I, denominadas como amostras A, B, C, D e E obtidas em supermercados da cidade de Caxias do Sul, RS, pelo método validado neste trabalho. Calculou-se os resultados obtidos entre as duplicatas de cada amostra pelo desvio padrão relativo (Equação 6).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A validação de um método é documentar mediante critérios estatísticos que nas condições o qual o método foi proposto, a produção dos resultados são confiáveis (ANVISA, 2017b). Existem poucos trabalhos sobre a determinação de ácido fólico utilizado para fortificação, e pelo fato da vitamina B₉ representar um papel importante na alimentação diária, surge a importância em desenvolver uma metodologia que garanta a avaliação dos limites estabelecidos pela Resolução RDC n° 150 de 13 de abril de 2017 para a fortificação de farinhas de trigos com ácido fólico.

Pela complexibilidade dos cálculos estatísticos, foram utilizadas planilhas eletrônicas do programa Microsoft Excel que possibilita a execução e apresentação dos resultados por gráficos e tabelas.

4.1 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE TRIGO

Para a extração do ácido fólico em amostras de farinha de trigo utilizou-se uma solução básica de KOH, pois de acordo com Catharino; Visentainer; Godoy (2003) o ácido fólico na forma de sal de potássio, aumenta sua solubilidade no meio.

De acordo com o mesmo artigo, o principal objetivo em clarificar o extrato é eliminar principalmente as proteínas que possam dificultar a quantificação. Para este método, empregou-se soluções de ácido fosfórico e tricloroacético que apresentaram os melhores desempenhos no ensaio de recuperação para Catharino; Visentainer; Godoy (2003).

A extração inicialmente foi realizada sem o uso da centrifuga, já que o método proposto pelo autor não a mencionava. Porém, o extrato apresentou grandes dificuldades em ser filtrado diretamente pela membrana, com isto, optou-se em utilizar a etapa de centrifugação, o qual mostrou evidências positivas para realização da etapa final.

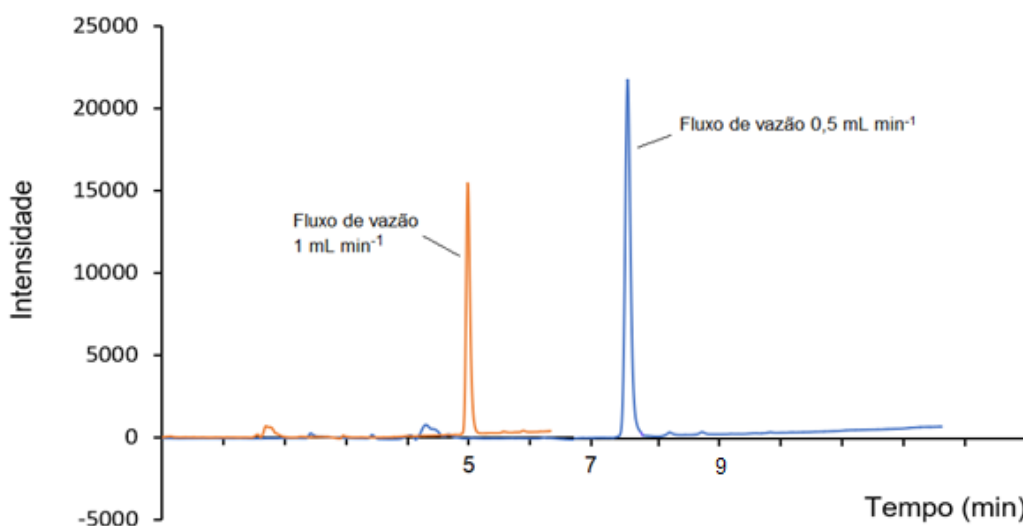
4.2 PROCESSO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Com o analito extraído e livre de interferentes, a próxima etapa é de ajustes nas condições instrumentais, com isto, consegue-se validar o método alcançando

resultados satisfatórios de recuperação e limites que atendam a Resolução RDC n° 150 de 13 de abril de 2017 da Anvisa para a fortificação de farinhas de trigo com ácido fólico.

Iniciou-se testes com eluição em gradiente conforme estudos de Catharino; Visentainer; Godoy (2003), porém observou-se que o pico do analito aparecia após o gradiente, com isto optou-se por avaliar a eluição isocrática (85% tampão acetato, pH 2,8 e 15% de acetonitrila) iniciando com fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ com pico saindo em 7,6 min. Com objetivo de diminuir o tempo de retenção testou-se a fase móvel com fluxo de vazão em 1 mL min^{-1} . Pode-se observar que utilizando fluxo de 1 mL min^{-1} o pico foi detectado com tempo de 5 min, porém com altura menor em relação ao fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 7). Avaliando-se a intensidade dos picos e por não existir diferença significativa no tempo de retenção, optou-se em utilizar fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e manter eluição isocrática, já que facilita a extensão do método para equipamentos que possuem apenas uma bomba de eluição.

Figura 7 - Comparação de eluição com 1 e $0,5 \text{ mL min}^{-1}$



Fonte: A autora (2021).

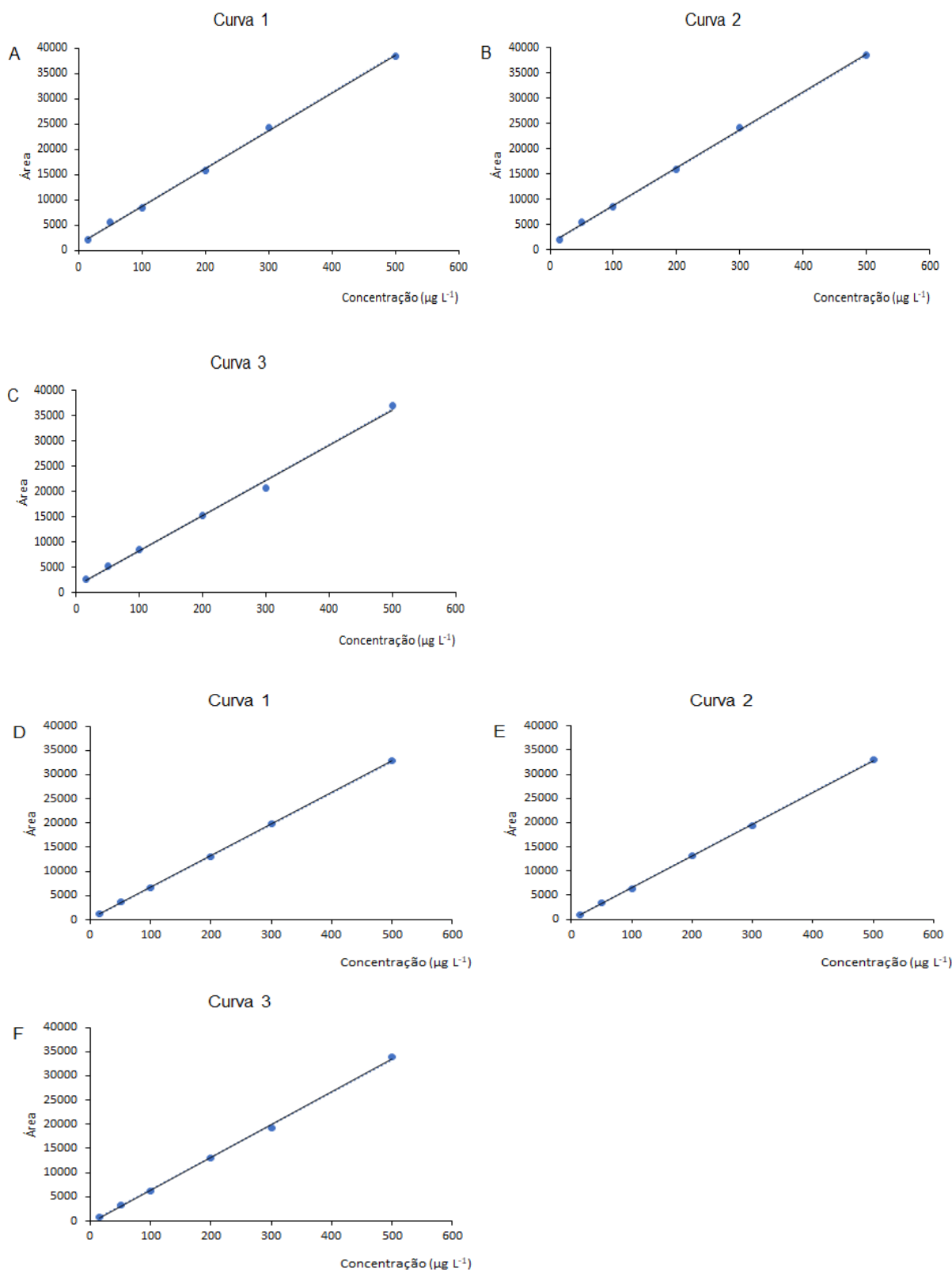
4.2.1 Seletividade e Efeito Matriz

A seletividade avalia o quanto o método consegue quantificar um analito na presença de outros compostos presente na amostra. Um método é chamado seletivo,

quando em meio a vários compostos, consegue-se distinguir o analito de interesse sem interferências dos demais.

Para a seletividade do método e a influência da matriz na execução do ensaio, foram analisadas em triplicata curvas de calibrações com 6 concentrações diferentes do padrão de ácido fólico ao longo da faixa analítica (15, 50, 100, 200, 300 e 500) $\mu\text{g L}^{-1}$ com e sem a matriz de referência (farinha de trigo, sem a adição de ácido fólico) (Figura 8).

Figura 8 - Gráficos de relação área *versus* concentração das curvas de calibração obtidas COM e SEM presença da matriz de referência

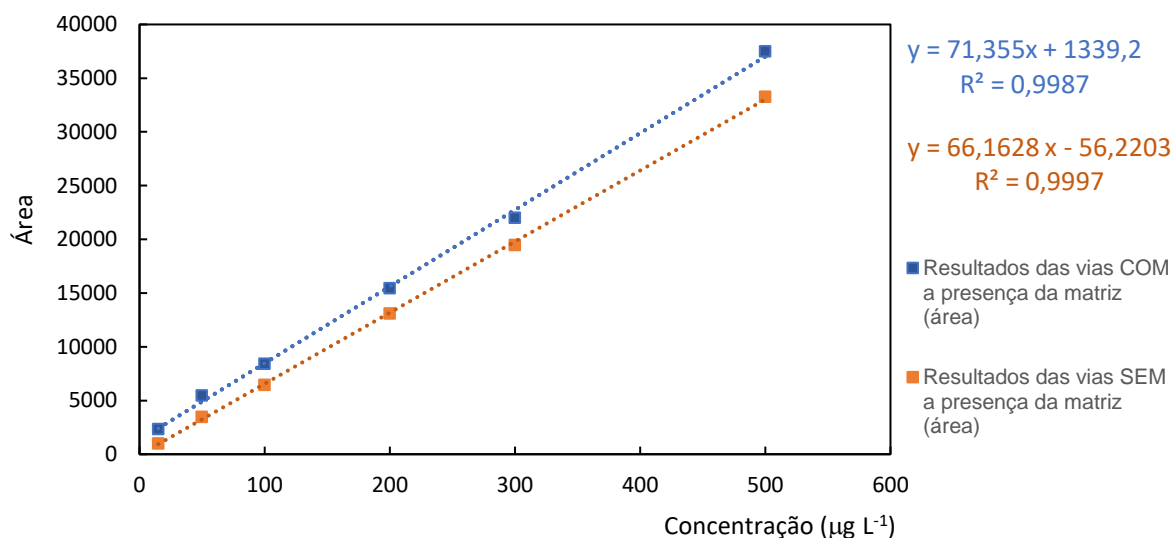


Fonte: A autora (2021).

Notas: A, B e C – Gráficos correspondente a curvas de calibração realizadas em solução extraída da matriz referência. D, E e F – Gráficos correspondente a curvas de calibração realizadas em tampão fosfato.

Aplicando a média dos resultados obtidos nas triplicatas de cada curva de calibração, tem-se o gráfico (Figura 9) de área *versus* concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) e foi calculado o teste F conforme Equação 1 e dados da Tabela 3.

Figura 9 - Gráfico de área *versus* concentração das retas do procedimento de seletividade COM e SEM a presença da matriz



Fonte: A autora (2021).

O coeficiente de correlação explica o ajuste do modelo linear avaliado, os coeficientes das curvas sem e com matriz de referência, R^2 0,9997 e R^2 0,9987 respectivamente, indicam que possíveis interferentes presentes na matriz analisada não interferiram de forma significativa no método avaliado.

Tabela 3 - Seletividade do método avaliado pela variância dos resultados obtidos COM e SEM matriz de referência

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área do pico	
	SEM matriz	COM matriz
15	991	2350
50	3478	5465
100	6461	8415
200	13102	15450
300	19461	21993
500	33249	37490
Variância	92388	832596
$F_{\text{calculado}}$	9,012	

Fonte: A autora (2021).

$F_{\text{calculado}}$ 9,012 é menor que 19,000 F_{tabelado} (Tabela 2), para o grau de liberdade $n-1$, igual a 2 e alfa de 0,05. Logo não existem diferenças significativas entre as curvas executadas com e sem a presença da matriz, indicando que o método é adequado para quantificação de ácido fólico em farinha de trigo tipo I (ALBANO; RODRIGUEZ, 2015).

A Tabela 4 para o teste-t foi calculada com os coeficientes de inclinação obtidas nas equações de cada curva de calibração diretamente pelo software Excel. Para o teste-t foram avaliadas duas variáveis, que para a seletividade foram as curvas com e sem a presença da matriz farinha de trigo tipo I.

Tabela 4 - Teste-t aplicado para duas variáveis (SEM a presença da matriz e COM a presença da matriz)

	SEM matriz	COM matriz
1	65,7240	61,9692
2	65,7451	74,9097
3	65,6893	71,3563
Média	65,7195	69,4117
Variância	0,0008	44,7001
Observações	3	3
Correlação de Pearson	0,1288	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-0,9570	
P(T<=t) uni-caudal	0,2198	
t crítico uni-caudal	2,9200	
P(T<=t) bi-caudal	0,4395	
t crítico bi-caudal	4,3027	

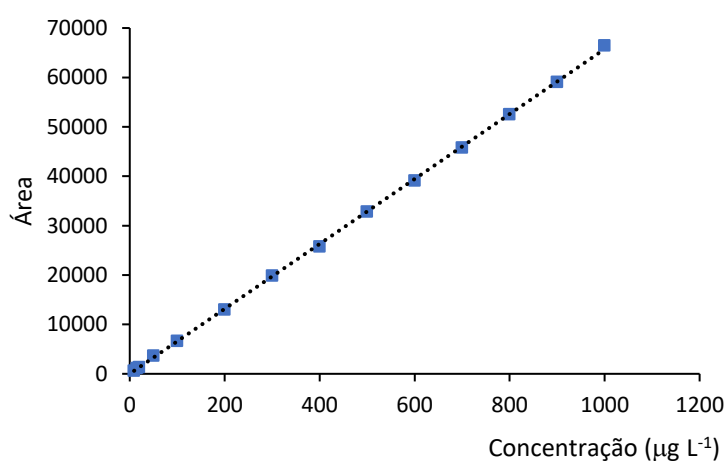
Fonte: A autora (2021).

Observa-se que o Stat t (t calculado) é menor que o t crítico bi-caudal, evidenciando que não existem diferenças significativas entre os resultados obtidos com o padrão de referência do ácido fólico analisado com e sem a matriz de referência (ALBANO; RODRIGUEZ, 2015).

4.2.2 Faixa linear de trabalho

Para definir a faixa de trabalho ideal para quantificação de ácido fólico na farinha de trigo tipo I e que apresente um coeficiente de determinação maior que $R^2 0,9945$, foram avaliados os dados experimentais sobre a reta obtidos entre concentrações de 3 a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ que resultaram em um $R^2 0,9867$, sendo menor que o critério de aceitação. Em vista disso, por análise visual o melhor ajuste dos dados se apresentou na faixa de 9 a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 10).

Figura 10 - Curva de calibração na faixa linear de trabalho



Fonte: A autora (2021).

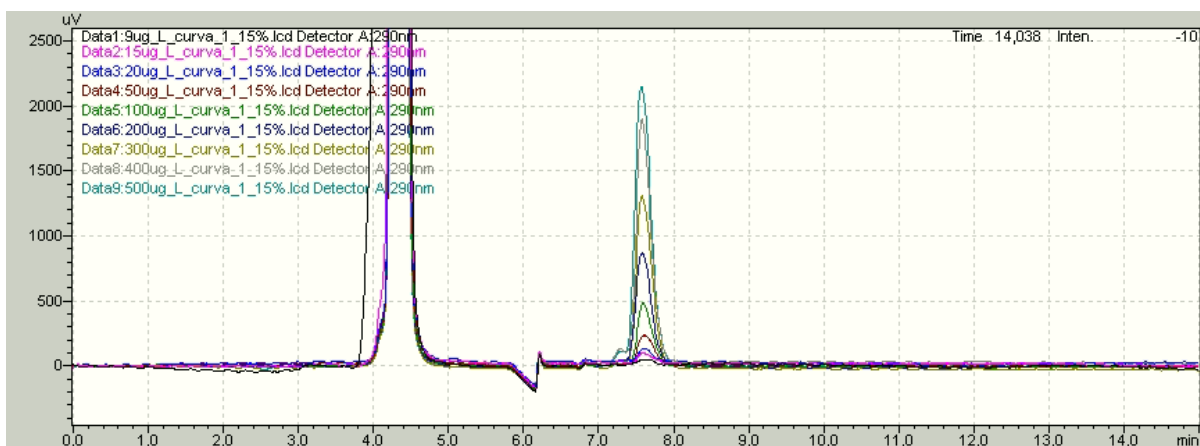
Com isso, verifica-se que a faixa de trabalho que apresenta linearidade e $R^2 0,9998$ compreende as concentrações de 9 a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Indicando que o modelo explica 99,98% a variabilidade dos dados de resposta ao redor de sua média, estando acima do critério definido como adequado ($R^2 0,9945$) estabelecido por Anvisa (2017b).

4.2.3 Linearidade da curva de calibração

Definir a linearidade de um método analítico é demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade é uma determinação do ajuste por regressão linear e avaliação do perfil gráfico dos resíduos da regressão (INMETRO, 2020).

A partir da avaliação da faixa linear, foram selecionadas e preparadas 9 concentrações de padrão de ácido fólico a partir da solução padrão de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ conforme item 3.2.3. Em aproximadamente 7,6 min (Figura 11) tem-se os picos obtidos das concentrações do padrão de ácido fólico utilizadas para a determinação da linearidade.

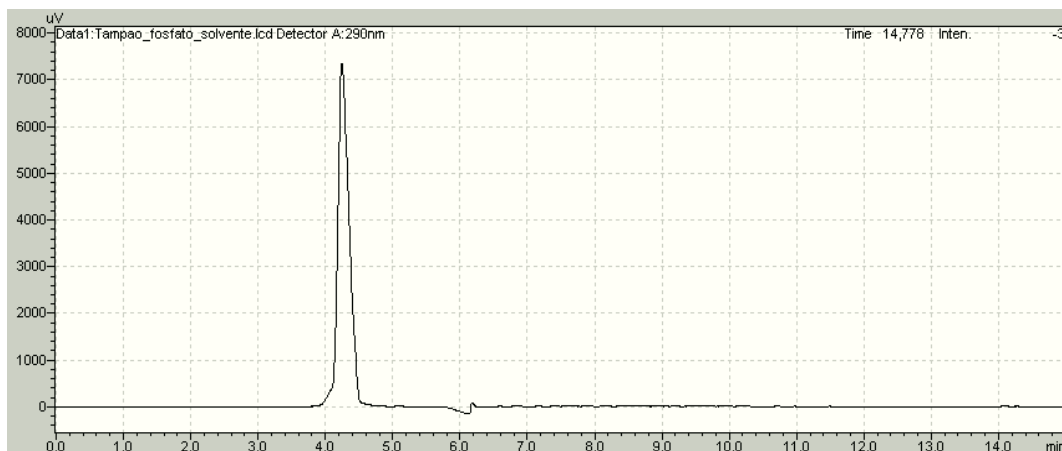
Figura 11 - Cromatograma comparativo entre as 9 concentrações definidas para a linearidade



Fonte: A autora (2021).

Em cerca de 4 min observou-se o surgimento de um pico com intensidade bem definida. Para garantir que este não pertence às soluções padrões, apenas a solução tampão fosfato utilizada para o preparo das soluções padrões, foi filtrada com membrana de PVDF para um vial e injetada no cromatógrafo (Figura 12). Assim foi confirmado que o pico se trata de um composto presente apenas no solvente.

Figura 12 - Cromatograma do solvente tampão fosfato utilizado para o preparo da curva de linearidade



Fonte: A autora (2021).

Na Tabela 5 foram registrados os dados obtidos na concentração experimental e o respectivo resíduo das 3 curvas de calibração aplicadas com as 9 concentrações de solução padrão de ácido fólico.

Tabela 5 - Dados obtidos na determinação da linearidade do método de quantificação de ácido fólico em farinha de trigo tipo I.

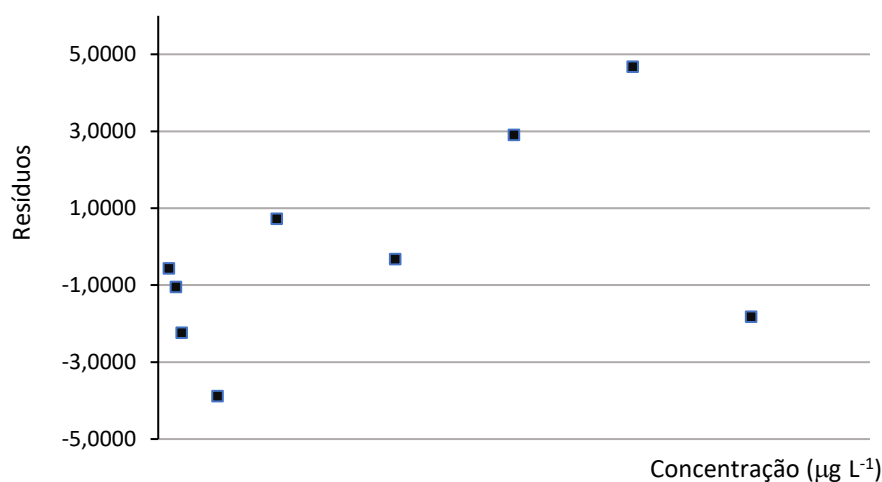
Concentração teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Resíduo
9	9,5733	-0,5733
15	16,0587	-1,0587
20	22,2440	-2,2440
50	53,8893	-3,8893
100	99,2800	0,7200
200	200,3350	-0,3350
300	297,1023	2,8977
400	395,3327	4,6673
500	501,8303	-1,8303

Fonte: A autora (2021).

Com os resíduos obtidos pela diferença entre a concentração teórica e experimental, analisou-se se os resíduos seguem uma ordem aleatória indicando a ausência de erros sistemáticos e tendências. Na (Figura 13) estão plotados os resíduos gerados, assim consegue-se observar graficamente que não existem

tendências entre os valores, confirmando que o modelo é adequado para o método (INMETRO, 2020).

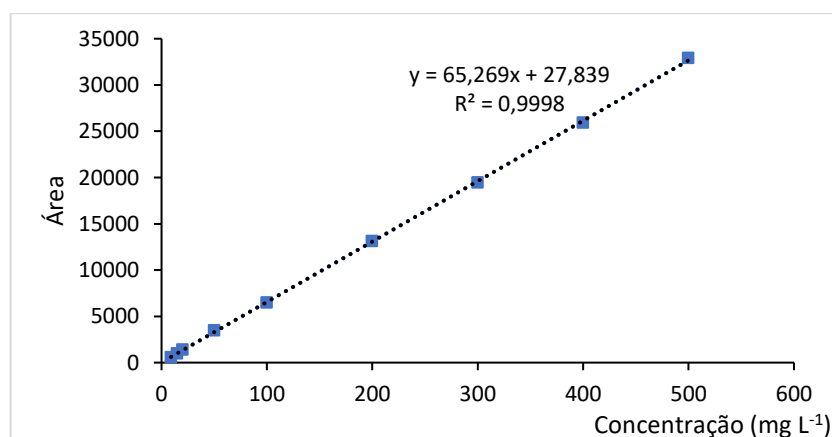
Figura 13 - Gráfico da relação entre resíduo *versus* concentração de ácido fólico obtidos pela curva de calibração



Fonte: A autora (2021).

Além da avaliação dos resíduos, a curva de calibração (Figura 14) obteve R^2 0,9998 e equação da reta, $y = 65,2688x + 27,8387$. Assim, a Linearidade é considerada conforme para o método, já que o R^2 obtido pela curva de calibração está acima de 0,9945 e os resíduos apresentarem comportamento aleatório (ALBANO; RODRIGUEZ, 2015).

Figura 14 - Gráfico da relação entre a concentração de ácido fólico *versus* absorvância, representado pela área do sinal, e correlação baseada na linha de tendência



Fonte: A autora (2021).

4.2.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão (INMETRO, 2020). O LQ foi determinado a partir da estimativa da curva analítica, utilizando a média das inclinações e interceptos obtidos a partir das equações das retas.

A Tabela 6 apresenta os dados em triplicata de 9 concentrações a partir do padrão de ácido fólico $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, preparadas em balões volumétricos e avolumadas com solução tampão fosfato pH 6,5.

Tabela 6 - Dados para obtenção do limite de quantificação de ácido fólico em farinha de trigo tipo I

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
9	642	581	473
15	1146	960	868
20	1355	1441	1397
50	3646	3475	3312
100	6659	6431	6292
200	12965	13228	13113
300	19894	19303	19187
400	25784	26058	25909
500	32848	33014	32886
Intercepto	145,476	21,214	-83,0954
Inclinação	65,0126	65,4329	65,3612
Desvio padrão intercepto	114,4307509		
Média Inclinação	65,2689		
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	17,53		
LQ ($\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$)	17,53		

Fonte: A autora (2021).

Utilizando-se a Equação 2 se pode determinar o limite de quantificação para o método, sendo encontrado para o método o LQ de $17,53 \mu\text{g}$ para cada 100g de farinha de trigo, com isto, se garante a quantificação de uma amostra, pois a concentração

do analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão está abaixo do limite de $140 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ estabelecido pela Resolução RDC nº 150, de 13 de abril de 2017.

$$LQ = \frac{10 \times \bar{s}}{\overline{IC}} \quad (2)$$

4.2.5 Limite de detecção do método (LDM)

O limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. A quantificação de baixos níveis do analito na amostra, requer a necessidade em identificar a menor concentração que pode ser detectada pelo método. O LDM pode variar com o tipo de amostra, sendo fundamental a garantia de que todas as etapas do processo estejam incluídas na determinação do LDM (INMETRO, 2020).

Para a determinação do limite de detecção foram preparadas 9 concentrações de padrão de ácido fólico em triplicata, fez-se a regressão linear de cada curva de calibração e com os interceptos e coeficiente de inclinação determinou-se o LDM pela Equação 3, utilizando os dados da Tabela 7.

$$LDM = \frac{3,3 \times \bar{s}}{\overline{IC}} \quad (3)$$

Tabela 7 - Dados para obtenção do limite de detecção do método de ácido fólico em farinha de trigo tipo I

(continua)

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
9	642	581	473
15	1146	960	868
20	1355	1441	1397
50	3646	3475	3312
100	6659	6431	6292
200	12965	13228	13113
300	19894	19303	19187
400	25784	26058	25909
500	32848	33014	32886

	(conclusão)		
Intercepto	145,476	21,214	-83,0954
Inclinação	65,0126	65,4329	65,3612
Desvio padrão intercepto	114,4307509		
Média Inclinação	65,2689		
LDM ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,79		
LDM ($\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$)	5,79		

Fonte: A autora (2021).

Este resultado indica que o método consegue detectar uma concentração de 5,79 μg para cada 100 g de farinha de trigo tipo I analisada, utilizando um fator de 3,3 vezes maior que o nível de ruído do método. Obtendo um resultado abaixo dos limites estabelecidos, garantindo a quantificação adequada para o analito.

4.2.6 Exatidão do método

A procedimento analítico para determinar a exatidão do método pode ser realizado a partir da recuperação do analito em amostras fortificadas com quantidades conhecidas.

Para o estudo de exatidão do método fortificou-se 100 g da matriz de referência (farinha de trigo sem adição de ácido fólico) com a mistura de ferro e ácido fólico nas concentrações de 140, 220 e 500 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ (Figura 15). Após realizou-se a extração em triplicata de cada uma das concentrações citadas. Na Tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos a partir da Equação 5 para determinação do percentual de recuperação para as amostras.

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (5)$$

Figura 15 - Matriz de referência fortificada com mistura de ferro e ácido fólico



Fonte: A autora (2021).

Tabela 8 - Dados obtidos na recuperação da fortificação de ácido fólico em amostra referência (farinha de trigo tipo I sem adição do ácido de fólico)

Concentração esperada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
140	145,75	104,11
140	144,34	103,10
140	146,54	104,67
220	219,37	99,72
220	216,28	98,31
220	223,78	101,72
500	505,42	101,08
500	509,89	101,98
500	507,68	101,54
Média (%)	101,80	

Fonte: A autora (2021).

A média da recuperação encontrada entre as concentrações foi de 101,80%, com a fração mássica de 10^{-7} do analito presente na amostra, o critério de aceitação

é de 80 a 110% para recuperação do ácido fólico, atendendo assim, o critério de aceitação (INMETRO, 2020).

4.2.7 Repetibilidade do método

A repetibilidade do método é um procedimento analítico que avalia a medição num conjunto de condições, as quais incluem o mesmo método, analista, equipamento, laboratório e período de execução.

Os dados coletados em triplicada das concentrações de 9, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparadas a partir da solução de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ em solução tampão fosfato pH 6,5, estão apresentados na Tabela 9, na qual foram calculados o desvio padrão relativo conforme Equação 6.

$$DPR(\%) = \left(\frac{S}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Tabela 9 - Estudo de repetibilidade do método

Concentração teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	1	2	3
9	9,57	9,52	9,62
100	101,12	98,50	98,21
500	499,59	502,83	503,06
Média	203,56		
Desvio padrão	1,00		
DPR (%)	0,49		

Fonte: A autora (2021).

Segundo INMETRO (2020) os laboratórios devem estabelecer critérios seguindo as normativas aplicáveis para às áreas de atividades, sendo que esses critérios geralmente estão atrelados ao nível de concentração do analito na amostra. Para este procedimento o desvio padrão relativo encontrado para o conjunto de replicatas foi de 0,49%, estando dentro do critério de 15% estabelecido para a fração mássica de ácido fólico presente na amostra de 10^{-7} .

4.2.8 Precisão intermediária

A precisão intermediária evidencia a variabilidade dos resultados em um laboratório, essa avaliação, diferente da repetibilidade, deve variar pelo menos uma condição, que para este procedimento utilizou-se o tempo como variável. Utilizando as mesmas concentrações em triplicata do item 4.2.7 e mantendo as mesmas condições, as amostras foram analisadas após um intervalo de 10 dias, os dados estão representados conforme Tabela 10.

Tabela 10 - Estudo da precisão intermediária avaliada pelo desvio padrão relativo de 3 concentrações de solução padrão de ácido fólico

Concentração teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	1	2	3	4	5	6
9	9,57	9,52	9,62	9,55	9,61	9,46
100	101,12	98,50	98,21	99,87	101,67	102,45
500	499,59	502,83	503,06	498,24	502,87	501,32
Média	203,73					
Desvio padrão	1,05					
DPR (%)	0,52					

Fonte: A autora (2021).

Foi encontrado pela Equação 6 um desvio padrão relativo ou coeficiente de variação de 0,52%, resultado este que expressa o desvio padrão como % da média do conjunto. O resultado encontrado atende ao critério de 15% estabelecido para a fração mássica do analito (10^{-7}), indicando assim que a precisão intermediária é aceitável (INMETRO, 2020).

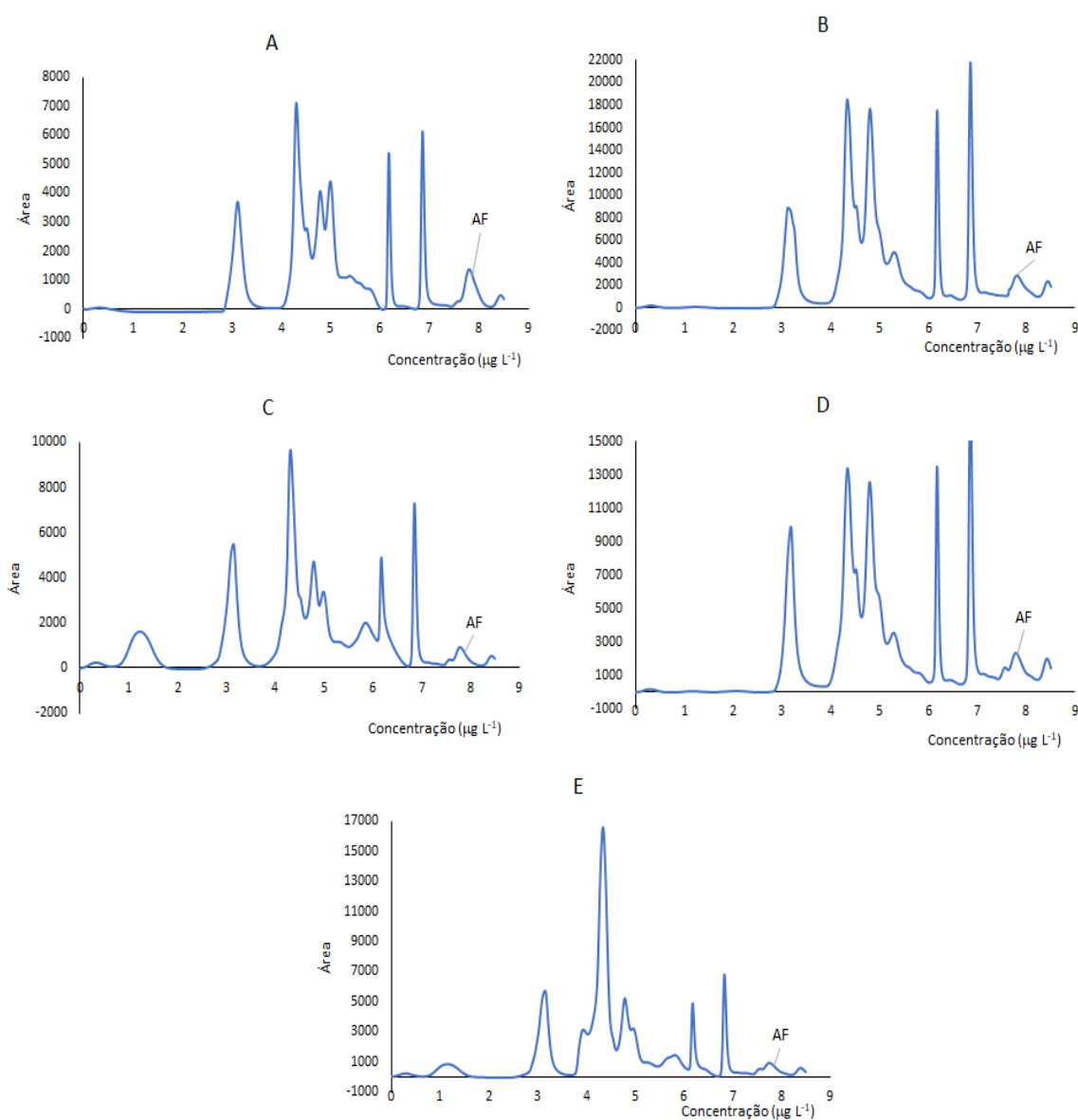
4.2.9 Quantificação do ácido fólico em amostras de farinha de trigo tipo I comerciais

Cinco amostras de farinha de trigo tipo I fortificadas com ácido fólico de marcas comerciais diferentes, denominadas de A, B, C, D e E, obtidas em supermercado da

cidade de Caxias do Sul, foram extraídas e avaliadas pelo método para determinar a concentração do analito presente em 100 g de amostra.

A extração, clarificação e filtração foram realizadas como citada no item 3.2.1 e, em seguida 20 μL foram injetados na CLAE para quantificação do ácido fólico pelo método validado. As concentrações determinadas para cada amostra em duplicata estão apresentadas nos cromatogramas (Figura 16).

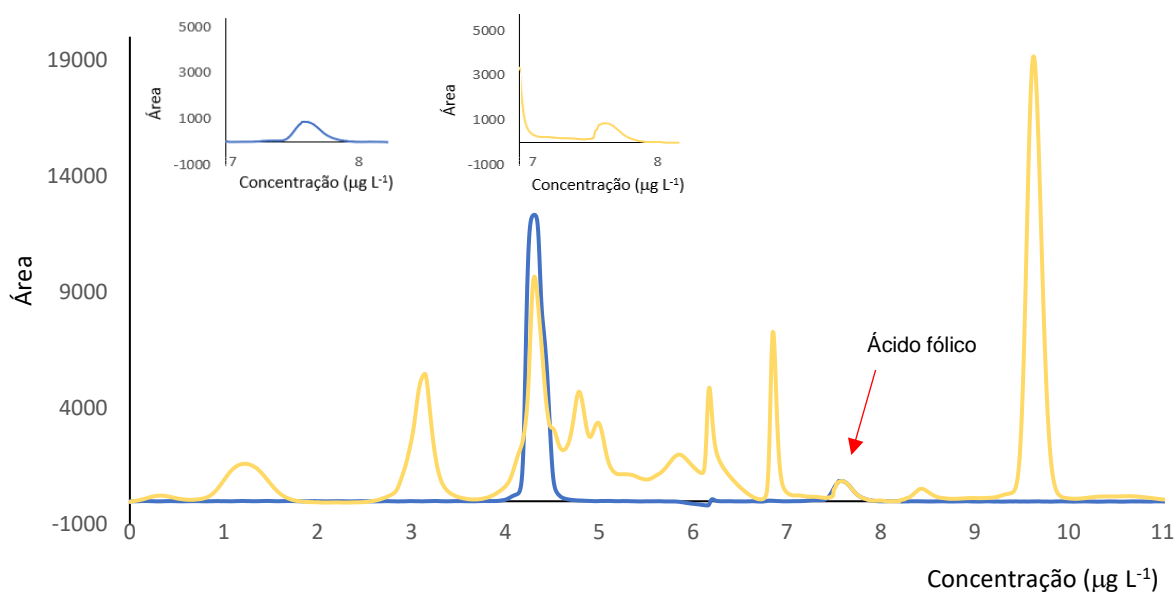
Figura 16 - Cromatograma de área *versus* concentração de 5 amostras de farinha de trigo tipo I comerciais fortificadas com ácido fólico, denominadas A, B, C, D e E



Fonte: A autora (2021).

A Figura 16 apresenta vários picos com intensidades diferentes, e para identificar o pico de interesse fez-se um comparativo entre um padrão utilizado na curva de calibração com o da amostra analisada (Figura 17).

Figura 17 - Cromatograma comparativo entre a amostra padrão de ácido fólico e amostra comercial



Fonte: A autora (2021).

Notas: Azul) padrão de 200 μg . Amarelo) amostra C.

O cromatograma em azul corresponde ao padrão de 200 μg (concentração próxima da obtida pela amostra) e em amarelo o cromatograma da amostra C. Outra forma de avaliar se o pico corresponde ao ácido fólico é o tempo de retenção, e assim pode-se garantir a identificação e quantificação correta do composto desejado. A Tabela 11 exibe os resultados obtidos entre as amostras analisadas em duplicata com seu respectivo desvio padrão relativo (DPR).

Tabela 11 - Relação da concentração e desvio padrão de amostras comerciais analisadas para ácido fólico

Amostra	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{g 100g}^{-1}$)	Média	Desvio padrão	DPR (%)
A	219,560	219,560	217,861	2,402749	1,1029
A	216,162	216,162			
B	216,467	216,467	217,329	1,219052	0,5609
B	218,191	218,191			
C	211,211	211,211	215,163	5,588265	2,5972
C	219,114	219,114			
D	190,364	190,364	188,742	2,294562	1,2157
D	187,119	187,119			
E	219,510	219,510	218,410	1,555635	0,7123
E	217,310	217,310			

Fonte: A autora (2021).

Para determinar a concentração obtida em $\mu\text{g 100g}^{-1}$, é necessário realizar a conversão para a massa de 1 g medida e volume final de 10 mL para a extração. E essa conversão perfaz ao valor inicial, por esse motivo os valores apresentados na tabela 11 são iguais.

Os resultados avaliados entre as duplicatas apresentaram desvio padrão relativo abaixo de 15%, atendendo os critérios estabelecido (INMETRO, 2020). Além da avaliação de repetibilidade entre as duplicatas, se avaliou o cumprimento da Resolução RDC nº 150, de 13 de abril de 2017 pelos moinhos, na determinação da faixa de 140 a 220 μg para 100 g de farinha de trigo. Todas as amostras analisadas apresentaram resultados satisfatórios para a faixa determinada por Anvisa (2017b), confirmando a frase presente na embalagem “enriquecida com ferro e ácido fólico”.

5 CONCLUSÃO

A extração da amostra de farinha de trigo tipo I com solução de hidróxido de potássio permitiu a adequada extração do analito da matriz, ou seja, a adequada extração do ácido fólico presente na farinha de trigo. Esta etapa também permitiu que as etapas de clarificação e filtração fossem realizadas de forma que o extrato final ficasse livre ou com baixas concentrações de interferentes. A partir deste estudo de validação, pode-se evidenciar que a CLAE se mostrou um método promissor para a quantificação do ácido fólico em farinhas de trigo. Com excelente seletividade, uma vez que o método discrimina o analito na presença dos demais constituintes da farinha de trigo tipo I. Excelente resposta quando a relação concentração *versus* absorvância, visto pela forte linearidade da curva de calibração (R^2 de 0,9998) na faixa de 9 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e com resíduos da curva de calibração aleatórios.

Os valores obtidos para o limite de quantificação (LQ) e o limite de determinação do método (LDM) ficaram abaixo dos valores indicados na portaria para a fortificação, favorecendo assim a garantia de quantificação do analito.

Outro fator importante para a validação deste método analítico e que se mostraram dentro dos valores esperados foram a repetibilidade do método, com DPR de 0,49%, e a precisão intermediária, com intervalo de 10 dias e com DPR de 0,52%, mostrando-se eficiente para o critério de 15%.

Assim, a metodologia validada foi empregada na quantificação de ácido fólico de cinco amostras de farinha de trigo tipo I comerciais. Todas as amostras apresentaram valores adequados para a resolução.

O método proposto neste trabalho indica confiabilidade nos resultados obtidos, dado que, todos os parâmetros estatísticos avaliados estão dentro dos padrões estabelecidos e atendem aos critérios de aceitação definidos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estimar a incerteza de medição do método;
- Implementar carta controle para avaliar o método na rotina;
- Desenvolver e validar o método utilizando CLAE, para determinação de ácido fólico em outros tipos de farinhas, como farinhas de trigo integral, farinha de milho, e outros produtos a base destas farinhas que sejam fortificados com o ácido fólico.

REFERÊNCIAS

- ALABURDA, J.; SHUNDO, L. Ácido fólico e fortificação de alimentos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 2007.
- ALBANO, Filipe de Medeiros; RAYA-RODRIGUEZ, Maria Teresa. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. 2. ed. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2015. 132 p.
- ANGIER, R. B. et al. Synthesis of a compound identical with the l. casei factor isolated from liver. **Science**, v. 102, n. 2644, p. 227–228, 1945.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 344**, de 13 de dezembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de dez. 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 24 abr. 2021.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Específica nº 04936/2013**. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/produtos-irregulares#/visualizar-produto-irregular/23361>. Acesso em: 21 abr. 2021.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 150**, de 13 de abril de 2017. Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 17 de abril de 2017a. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis. Acesso em: 24 abr. 2021.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017. Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 25 de julho de 2017b. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 24 abr. 2021.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, v. 2. 6 ed. Brasília, 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017.
- BOEN, T. R. et al. Folic Acid and Iron Evaluation in Brazilian Enriched Corn and Wheat Flours. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 19, n. 1, p. 53–59, 2008.
- BRASIL. Gerência colegiada da superintendência de vigilância sanitária nº56/2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, de 18 set. 2014. Disponível em: <https://www.saude.mg.gov.br/manualparacontratacao/douments?start=564>. Acesso em: 21 abr.2021.
- CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T.; LIMA-PALLONE, J. A. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 972–976, 2006.

CATHARINO, R. R.; VISENTAINER, J. V.; GODOY, H. T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 389–395, dez. 2003.

CIESLIK, E.; CIESLIK, I. Occurrence and significance of folic acid. **Pteridines**, v. 29, n. 1, p. 187–195, 31 dez. 2018.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. A cultura do trigo. Organizadores: Aroldo Antônio de Oliveira Neto e Candice Mello Romero Santos - Brasília: Conab, 2017. Disponível em em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_03_16_09_46_a_cultura_do_trigo_versao_digital_nova_logo.pdf. Acesso em: 01 nov. 2021.

CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12, 2017, São Carlos, SP: Análise dos produtos gasosos da hidropirólise de carvão mineral por cromatografia gasosa. UFSCar, 2017.

CRIDER, K. S.; BAILEY, L. B.; BERRY, R. J. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directionsNutrients. MDPI AG, 2011. Disponível em:/pmc/articles/PMC3257747. Acesso em: 25 abr. 2021.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova**, v. 7, n. 7, p. 21–25, 1998.

DIAS, S. L. P. et al. **Química Analítica: Teoria e Prática Essenciais**. 1. ed. Porto Alegre: Bookman Companhia Editora Ltda, 2016.

EPA. USA. Validation and peer review of US Environmental Protection Agency chemical methods analysis. EPA Forum on Environmental Measurement. FEM Method Validation Team. p. 1–23, 2016.

EURACHEM: The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2 ed. Teddington, 2014. ISBN 978-91-87461-59-0.

FARAJI, M.; MAHMOODI-MAYMAND, M.; DASTMALCHI, F. Green, fast and simple dispersive liquid-liquid microextraction method by using hydrophobic deep eutectic solvent for analysis of folic acid in fortified flour samples before liquid chromatography determination. **Food Chemistry**, v. 320, n. February, p. 126486, 2020.

HIGDON, J. **Folate**. Disponível em: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/folate>. Acesso em: 5 mai. 2021.

IRIS, A. et al. **Análise Instrumental: Uma abordagem prática**. 1 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev. 09, Rio de Janeiro, jun. 2020, 30 p. Disponível em:

http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio Acesso em: 08 de mai. 2021.

MITCHELL, H. K.; SNELL, E. E.; WILLIAMS, R. J. THE CONCENTRATION OF "FOLIC ACID". **Jornal da American Chemical Society**, v. 63, n. 2284, p. 2284, 1941.

OSSEYI, E. S.; WEHLING, R. L.; ALBRECHT, J. A. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, v. 826, n. 2, p. 235–240, 27 nov. 1998.

PINTO, W. DE J. **Bioquímica clínica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2017. PRADO, G. C. Desenvolvimento, otimização e validação de método rápido para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida. Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

PRADO, G. C. **Desenvolvimento, otimização e validação de método rápido para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida**. Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale: Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro, 2016.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807–812, 2004.

SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J.; PATERSON, J. Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. **Food Chemistry**, v. 71, n. 4, p. 545–552, 2000.

SILVA, G. L. A. et al. **Avaliação da qualidade físico-química de comprimidos industrializados de sertralina 50 mg e de cápsulas magistrais comercializadas na cidade de Governador Valadares - MG**. Universidade do Vale do Rio Doce, 2010.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo, 2014.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica**. 2 ed. Porto alegre: ARTMED, 2007.

TEJERINA, K. L. G. Validação de métodos para análise de estatinas em medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. 2011. 172f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos). Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, São Paulo, 2011.

VELLOZO, E. P.; FISBERG, M. **O impacto da fortificação de alimentos na prevenção da deficiência de ferro** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* **Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/yH4spfSYrNG4F3TZ8jZWLhN/?lang=pt>. Acesso em: 17 abr. 2021.