



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE  
MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO  
EM FARINHA DE TRIGO ENRIQUECIDA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Guilherme Cervi Prado**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE  
MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO  
EM FARINHA DE TRIGO ENRIQUECIDA**

elaborada por  
**Guilherme Cervi Prado**

como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

**Comissão Examinadora**

---

**Prof. Dr. Renato Zanella – Orientador**  
Universidade Federal de Santa Maria

---

**Prof. Dr. Rogério M. Dallago**  
Universidade Regional Integrada – Erechim, RS

---

**Prof. Dr.<sup>a</sup> Sandra Cadore Peixoto**  
Centro Universitário Franciscano – Santa Maria, RS

Santa Maria, 9 de março de 2012

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE  
MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO  
EM FARINHA DE TRIGO ENRIQUECIDA**

**por**

**Guilherme Cervi Prado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Química, Área de Concentração em Química Analítica, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Renato Zanella

Santa Maria, RS, Brasil

**2012**

À Infinita Inteligência, que ampara  
a todos que procuram pela luz da  
sabedoria.

Aos meus pais e irmãos, minha  
família, meu lar, onde se encontram as  
bases sólidas dos caminhos que trilho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella, pela oportunidade de poder integrar seu grupo de pesquisa em minha busca por este título. Por sua orientação, sabedoria, apoio e amizade. Meu muito obrigado.

Aos professores Dr. Rogério M. Dallago e Dr.<sup>a</sup> Sandra Peixoto, pela disponibilidade em participar de minha defesa da dissertação, com seus questionamentos e suas sugestões.

Ao Dr. Manoel Martins, por seu companheirismo e amizade, por opiniões e ensinamentos, por sua valorosa colaboração no exame de qualificação.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Martha Adaime, pela amizade e co-orientação ao longo de minha trajetória pelo LARP.

Aos professores, Dr.<sup>a</sup> Caroline do Amaral Friggi e Dr. Osmar Damian Prestes, por suas amizades, companheirismo, e atenção ao longo de minha trajetória no LARP, por suas opiniões, ajudas e ensinamentos valiosos, que proporcionaram o aumento do meu saber.

À secretária do LARP, MSc. Márcia Botega, pela amizade, competência, companheirismo, suas “dicas” valorosas e sempre disposta a ajudar.

Aos colegas e amigos do LARP, por suas amizades, convivência agradável e companheirismo, nas horas boas e ruins, em nossos caminhos na busca por conhecimento.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Química da UFSM pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, que sempre me receberam bem e solucionaram qualquer problema com agilidade, competência e atenção.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade do ensino gratuito e de qualidade.

A todos que de alguma forma conviveram e contribuíram comigo ao longo de minha pesquisa.

A Deus, por sua Infinita Inteligência, provedora do Bem-Estar, concedendo paz, saúde e sabedoria ao longo desta etapa. Que abençoe a todos os mencionados em seus caminhos.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE TRIGO ENRIQUECIDA**

AUTOR: GUILHERME CERVI PRADO  
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 9 de março de 2012

Com o objetivo de suprimir os problemas relacionados à deficiência de ingestão de vitaminas da classe dos folatos, muitos produtos alimentícios estão sendo submetidos ao processo de enriquecimento. Entre eles, todos os tipos de farinha de trigo devem ser enriquecidos com ácido fólico. Portanto, fica evidenciada a necessidade de métodos analíticos para a rotina capazes de determinar com eficácia os níveis de ácido fólico na matriz enriquecida. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de um método rápido para determinação de ácido fólico adicionado a farinha de trigo, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico. O ácido fólico foi separado utilizando-se coluna de C8. Utilizou-se eluição por gradiente na fase móvel, com água acidificada com ácido acético glacial (pH 2,8) e acetonitrila. A detecção foi efetuada com detector por arranjo de diodos empregando o comprimento de onda de 290 nm. Foi utilizada padronização externa para quantificação. A vitamina foi extraída da matriz com solução aquosa de hidróxido de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> e solução aquosa de tetraborato de sódio 0,04 mol L<sup>-1</sup> de pH 8,5; seguida por etapa de limpeza do extrato da amostra através de SPE, utilizando cartuchos de SAX. O método mostrou-se eficiente, com valores de recuperação entre 96 e 99%, RSD de 1,3 a 3,8% e LOD e LOQ de 0,28 e 0,937 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Nas análises das amostras reais, das cinco marcas analisadas, somente uma marca apresentou concentração de ácido fólico acima do mínimo exigido pela legislação.

Palavras-Chave: Ácido fólico, HPLC, farinha de trigo.

**ABSTRACT**

Master Dissertation  
Post-Graduate Program in Chemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**DEVELOPMENT, OPTMIZATION AND VALIDATION OF A FAST METHOD FOR DETERMINATION OF FOLIC ACID IN ENRICHED WHEAT FLOUR**

AUTHOR: GUILHERME CERVI PRADO  
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA  
Santa Maria, March 9<sup>th</sup>, 2012

In order to eliminate the problems related to deficient intake of vitamins folate class, many food products are being subjected to the enrichment process. Among them, all types of wheat flour must be enriched with folic acid. Therefore, it is evident the need of analytical methods for routine able to effectively determine the levels of folic acid in enriched matrix. The objective of this work was the development and validation of a rapid method for determination of folic acid added to wheat flour, using the technique of high performance liquid chromatography with UV detection. Folic acid was separated using a C8 column. Was used for elution gradient mobile phase with water acidified with glacial acetic acid (pH 2.8) and acetonitrile. Detection was performed with a diode array detector employing a wavelength of 290 nm. External standard was used for quantification. Vitamin matrix was extracted with aqueous potassium hydroxide, 0.1 mol L<sup>-1</sup> and aqueous sodium tetraborate 0.04 mol L<sup>-1</sup> pH 8.5, followed by cleaning step of the extract of the sample through SPE using SAX cartridges. The method was efficient, with recovery values between 96 and 99%, RSD from 1.3 to 3.8% and LOD and LOQ of 0.28 and 0.937 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. In the analysis of real samples of five brands tested, only one brand presented concentration of folic acid above the minimum required by law.

Keywords: Folic acid, HPLC, wheat flour.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estrutura química do ácido fólico.....	3
<b>Figura 2.</b>	Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ.....	18
<b>Figura 3.</b>	Etapas de extração do método desenvolvido para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida.....	35
<b>Figura 4.</b>	Representação esquemática das etapas de limpeza do extrato da amostra do método desenvolvido.....	36
<b>Figura 5.</b>	Gráfico dos valores de recuperação de ácido fólico.....	41
<b>Figura 6.</b>	Cromatograma obtido por HPLC-DAD da fortificação da matriz no nível de 2,5 mg kg <sup>-1</sup> .....	44
<b>Figura 7.</b>	Cromatograma obtido por HPLC-DAD A) de uma solução analítica na concentração de 0,2 mg L <sup>-1</sup> de ácido fólico adicionada ao extrato “branco”, B) da fortificação da matriz no nível de 1,25 mg kg <sup>-1</sup> , C) para o extrato “branco” de farinha de trigo.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Gradiente da fase móvel para o ensaio 2.....	24
<b>Tabela 2.</b>	Gradiente da fase móvel para o ensaio 3.....	24
<b>Tabela 3.</b>	Gradiente da fase móvel para o ensaio 4.....	25
<b>Tabela 4.</b>	Gradiente da fase móvel para o ensaio 5.....	25
<b>Tabela 5.</b>	Gradiente da fase móvel para o ensaio 6.....	26
<b>Tabela 6.</b>	Gradiente da fase móvel para o ensaio 7.....	26
<b>Tabela 7.</b>	Gradiente da fase móvel para o ensaio 8.....	27
<b>Tabela 8.</b>	Gradiente da fase móvel utilizada para o estudo.....	37
<b>Tabela 9</b>	Equação da reta, coeficiente de determinação e intervalo linear....	41
<b>Tabela 10</b>	Recuperação, $RSD_r$ e $RSD_{pi}$ do método.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN – Acetonitrila

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*

DAD – Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detection*

FDA – *Food and Drug Administration*

GC – Cromatografia a Gás, do inglês *Gas Chromatography*

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IUPAC – *International Union of Pure Applied Chemistry*

JMPR – *Joint Meeting on Pesticide Residue*

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

NP – Fase normal, do inglês *normal phase*

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*

RP – Fase reversa, do inglês *reverse phase*

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD<sub>pi</sub> – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSD<sub>r</sub> – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

s – estimativa de desvio padrão absoluto

SAX – Cartucho de troca aniônica forte, do inglês *Strong Anionic Exchange*

SPE – Extração por fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

TCA – Ácido tricloro acético

UV-Vis – Detector por ultravioleta e visível, do inglês *ultraviolet-visible detector*

$x_i$  – valores individuais

$\bar{x}_m$  – média das medidas em replicatas

$\Delta t$  – intervalo de tempo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 O ácido fólico.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Alimentos e importância nutricional.....	5
<b>2.2 Legislação.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Métodos para determinação de folatos em alimentos.....</b>	<b>7</b>
2.3.1 Extração e limpeza do extrato da amostra.....	8
2.3.2 Método QuEChERS.....	10
<b>2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência .....</b>	<b>11</b>
2.4.1 Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção.....	11
2.4.2 Cromatografia líquida com fase ligada.....	13
2.4.3 Detector.....	14
<b>2.5 Validação de métodos cromatográficos.....</b>	<b>15</b>
2.5.1 Curva analítica e linearidade.....	16
2.5.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	17
2.5.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	19
2.5.4 Exatidão.....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Instrumentação.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Materiais.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Solventes e Reagentes.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Preparo das Soluções Analíticas.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5 Parâmetros de otimização do sistema HPLC-DAD.....</b>	<b>23</b>
3.5.1 Ensaio 1 – pH da fase móvel aquosa.....	23
3.5.2 Ensaio 2 – Coluna de C18.....	24
3.5.3 Ensaio 3 – Coluna de C18.....	24
3.5.4 Ensaio 4 – Coluna C18.....	25

3.5.5 Ensaio 5 – Coluna C18.....	25
3.5.6 Ensaio 6 – Coluna C18.....	26
3.5.7 Ensaio 7 – Coluna C18.....	26
3.5.8 Ensaio 8 – Coluna C8.....	27
<b>3.6 Amostras para etapa de validação.....</b>	<b>27</b>
<b>3.7 Desenvolvimento do método para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida.....</b>	<b>28</b>
3.7.1 Testes para limpeza do extrato da amostra com C18, PSA e MgSO <sub>4</sub> .....	28
3.7.1.1 Ensaio com C18.....	28
3.7.1.2 Ensaio com PSA.....	29
3.7.1.3 Ensaio com MgSO <sub>4</sub> .....	29
3.7.2 Ensaio com SPE – Cartuchos de SAX.....	29
3.7.2.1 Teste da capacidade de percolação pelo cartucho de SPE.....	29
3.7.2.2 Teste com água para limpeza e soluções para eluição.....	30
3.7.3 Teste de extração com acetonitrila, hidróxido de potássio e tetraborato de sódio.....	31
<b>3.8 Validação do método desenvolvido para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida.....</b>	<b>32</b>
3.8.1 Curvas analíticas e linearidade.....	32
3.8.2 Determinação da estimativa de LOD e LOQ, do instrumento e do método.....	32
3.8.3 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	33
<b>3.9 Aplicação do procedimento em amostras reais.....</b>	<b>36</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Condições do sistema HPLC-DAD.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Desenvolvimento e otimização do método para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida.....</b>	<b>38</b>
4.2.1 Avaliação dos testes para limpeza do extrato da amostra com C18, PSA e MgSO <sub>4</sub> .....	38
4.2.2 Avaliação da utilização de SPE – Cartuchos de SAX.....	39
4.2.2.1 Avaliação da capacidade de percolação pelo cartucho de SPE...	39

4.2.2.2 Avaliação da água de limpeza e soluções para eluição.....	40
4.2.3 Avaliação da extração com acetonitrila, KOH e tetraborato de sódio.....	40
<b>4.3 Validação do método rápido para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida.....</b>	<b>41</b>
4.3.1 Curvas analíticas e linearidade.....	41
4.3.2 Determinação do LOD e LOQ do instrumento e do método.....	42
4.3.3 Ensaio de fortificação, para avaliar exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária) do método.....	42
4.3.4 Aplicação do procedimento em amostras reais.....	46
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na última década a vitamina B9, mais conhecida como ácido fólico, se tornou um dos principais compostos sobre os holofotes das pesquisas relacionadas à saúde humana, e também animal. Devido às descobertas sobre suas propriedades vitamínicas indispensáveis para o desenvolvimento natural, correto e saudável do feto no ventre da mãe, e do benefício na prevenção de diversas doenças, como câncer de intestino e hepático (LIMA *et al.*, 2004), dentre outras, muitos países adotaram medidas profiláticas através do enriquecimento de seus alimentos com ácido fólico.

Assim como os Estados Unidos, o Brasil também adotou leis para enriquecimento de cereais com vitaminas, sendo obrigatória a adição de ácido fólico na farinha de trigo na concentração mínima de 150 µg por 100 g (1,5 µg g<sup>-1</sup>). Porém, ainda não há um controle e fiscalização eficazes para a prática do enriquecimento dos cereais. Desta forma, fica evidente a necessidade de metodologias eficientes para a determinação de ácido fólico adicionado à farinha de trigo.

A maioria dos ensaios desenvolvidos para a análise de folatos em alimentos e outros tipo de matrizes são microbiológicos, seguido dos ensaios com rádio marcadores. Entretanto, esses métodos apresentam em sua grande maioria características como a baixa confiabilidade, precisão e sensibilidade, lentidão na análise e exatidão questionável (LEENHEER *et al.*, 2000). Todavia, na tentativa de superar esses pontos negativos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) vem ganhando destaque na determinação de folatos.

Na HPLC, mesmo com todas as vantagens apresentadas pela técnica, a boa resolução do sistema cromatográfico é influenciada pelas características do extrato. Extratos mais limpos e concentrações mais altas dos compostos de interesse promovem, respectivamente, o aumento da vida útil da coluna e facilitam a identificação e quantificação das substâncias desejáveis (CATHARINO *et al.*, 2003). Além disso, as metodologias desenvolvidas para HPLC para determinação de ácido fólico demandam longos tempos de preparo

de amostra (com muitas etapas) e análise cromatográfica, bem como a utilização de grandes quantidades de solventes e reagentes.

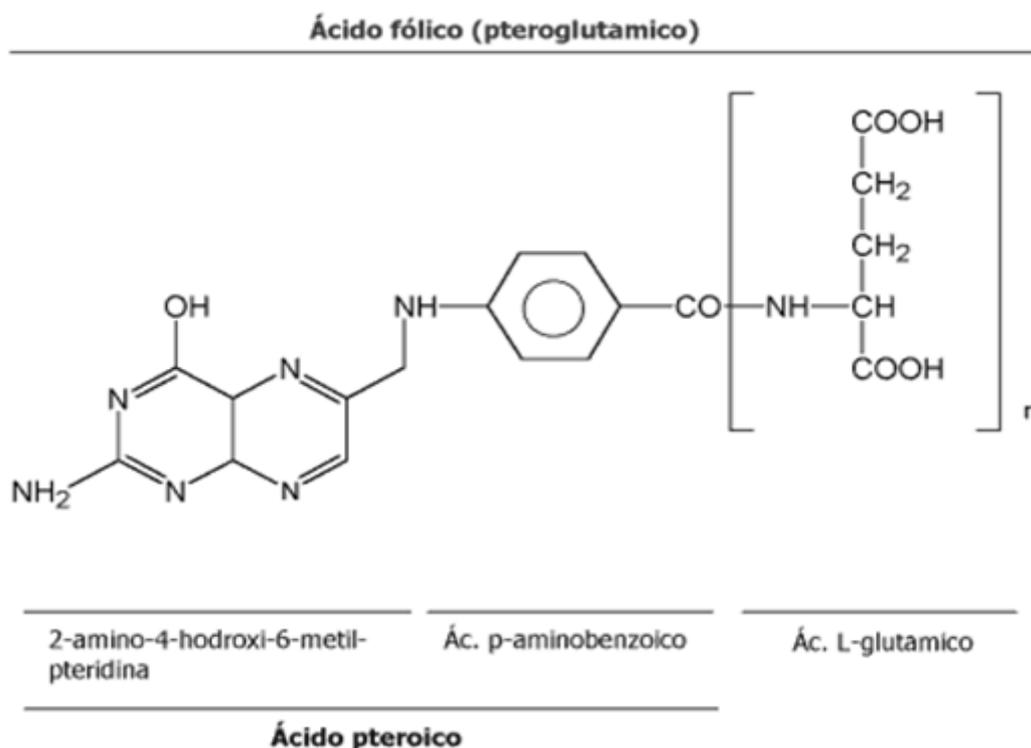
Outra vantagem que a técnica de HPLC apresenta é a capacidade de se empregar métodos para uso rotineiro de baixos custos, por exemplo, utilizando-se técnicas de HPLC acopladas a detectores por ultravioleta e visível (UV-Vis, do inglês *ultraviolet-visible*) ou detectores por arranjo de diodo (DAD, do inglês, *diode array detector*).

Considerando a necessidade de reduzir o custo e o tempo demandado nas análises de rotina, e a importância de se determinar e monitorar os níveis de ácido fólico adicionados à farinha de trigo, para que essa esteja de acordo com as leis estipuladas, este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de um método rápido para a determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida. Os objetivos específicos são: (i) desenvolver um novo método, rápido, para extração de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida e (ii) validar esse método de extração.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O ácido fólico

Também conhecido por vitamina B9, N-[4-[[[2-amino-1,4-dihidro-4-oxo-6-pteridinil)metil]-amino]-benzoil]-L-ácido glutâmico, ou ácido pteroilglutâmico, o ácido fólico, com sua estrutura química demonstrada na Figura 1, é um dos compostos metabolicamente ativos considerados importantíssimos para a saúde humana, e é comumente referido à classe dos folatos. Essa vitamina ajuda o corpo a converter carboidratos em glicose, para produzir energia. O fígado converte os folatos em 5-N-tetrahydrofolato, a principal forma circulante no sangue, a qual é responsável pela transferência de carbonos nas reações enzimáticas (converte homocisteína para produção de metionina), incluindo a síntese do DNA (MARTINS-JÚNIOR *et al.*, 2008). Hoje, os pesquisadores estão convencidos que o ácido fólico é indispensável à dieta humana e animal, exatamente por estar diretamente ligado a processos bioquímicos importantes (CATHARINO *et al.*, 2006).



**Figura 1. Estrutura química do ácido fólico**

Muitos sistemas de separação foram desenvolvidos para determinação de vitaminas folatos utilizando HPLC, incluindo fase reversa, íon-par, e tipos de troca de ânions, de acordo com a solubilidade das vitaminas. A solubilidade natural em água dos folatos, juntamente com as diferenças nas propriedades iônicas e hidrofobicidade fazem desses compostos adequados para separação tanto por troca iônica como por fase reversa em HPLC. Entretanto, o ácido fólico sólido apresenta-se praticamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. Para sua dissolução, é necessário utilizar soluções ácidas diluídas ou soluções alcalinas. Devido a sua degradação, o padrão sólido deve ser mantido longe do calor e da luz (LEENHEER *et al.*, 2000; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2005).

Os efeitos do pH na destruição oxidativa dos folatos tem sido revisada por vários autores. Cada vitamina tem seu próprio e único valor de pH em que se encontra estável, e portanto isto é uma das dificuldades encontradas no momento da otimização das condições de extração para todos os folatos em uma única extração. O pH, a presença de oxigênio, a temperatura utilizada, e, em adição, o tipo de tampão, podem afetar a eficiência da extração dos folatos (LEENHEER *et al.*, 2000).

Em separações por fase reversa, suprimir ou realçar a ionização de grupos funcionais pelo efeito do pH pode ser usado efetivamente para regular a separação na coluna cromatográfica. O pH, a força iônica, e a polaridade dos solventes são utilizados para otimizar a separação. Usualmente, um pH baixo ( $\text{pH} < 3$ ) com ou sem utilização de gradiente da fase orgânica é usado com fase estacionária de C18 ou fenil (LEENHEER *et al.*, 2000).

Em pH mais elevado que 2,8 ( $\text{pH} = 3 - 4$ ), o comportamento cromatográfico dos folatos se torna mais complicado pela ionização parcial do grupo  $\alpha\text{-COOH}$ , resultando na formação de íons folato bipolares com carga positiva no anel pteridino e carga negativa na parte glutâmica (PATRING *et al.*, 2006).

### 2.1.1 Alimentos e importância nutricional

O ácido fólico está amplamente distribuído nos alimentos, principalmente em verduras frescas (geralmente de coloração verde, como espinafre, brócolis, etc...), fígado, leveduras (levedo de cerveja), farelo de trigo, gema de ovo, algumas frutas, dentre outros alimentos, na forma de folatos. No entanto, nos dias atuais, a ingestão de uma dieta insuficiente em folatos tem levado à deficiência dessa vitamina (LIMA *et al.*, 2004).

O ácido fólico não ocorre naturalmente, mas é comumente utilizado para propósitos de enriquecimento de alimentos, isto porque ele é mais estável que os folatos que ocorrem naturalmente. Folatos são sensíveis ao calor, ácidos, oxidação e luz, e suas concentrações nos alimentos e amostras biológicas são usualmente muito baixas (LEENHEER *et al.*, 2000).

Um dos possíveis efeitos diretamente ligados a dietas carentes de ácido fólico são as malformações congênitas (durante a gravidez), com destaque para os defeitos no tubo neural de fetos (espinha bífida, fenda palatina, danos cerebrais e a mielomeningocele, por exemplo), e que tem surtido repercussão mundial (LIMA *et al.*, 2004). Outro tipo de doença conhecida causada pela abstenção dessa vitamina no corpo humano é a anemia megaloblástica, assim como efeitos na saúde mental e emocional, dentre outros efeitos biológicos (MARTINS-JÚNIOR *et al.*, 2008; KAMEI *et al.*, 2011).

Além disso, muitos estudos sugerem que o ácido fólico atue na prevenção de diversos tipos de câncer (incluindo hepático e intestinal), anemia e doenças cardíacas (LIMA *et al.*, 2004). A prevenção de ataques cardíacos e de acidentes vasculares cerebrais também é relacionada com a suplementação de ácido fólico na alimentação (ZARE *et al.*, 2011).

Entretanto, em contraponto, alguns pesquisadores também apresentaram preocupações quanto a possíveis efeitos colaterais do ácido fólico na saúde humana, especialmente quando há uma alta taxa de ingestão da vitamina. A questão do possível risco toxicológico do ácido fólico ganha mais força quando relacionada a pacientes que apresentam neoplasmas malignos pré-existentes. Alguns pesquisadores argumentam que existe o risco do desenvolvimento de alguns tipos de tumores (GUJSKA & KUNCEWICZ, 2005).

## 2.2 Legislação

Em 1996, o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, através do *Food and Drug Administration* (FDA) especificou que certos produtos de grãos de cereais necessitavam ser fortificados com níveis de ácido fólico entre 0,95 a 3,10  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Também determinou que todas as mulheres grávidas deveriam consumir 0,4 mg de ácido fólico diariamente (MARTINS-JÚNIOR *et al.*, 2008; THOMAS *et al.*, 2003). Da mesma forma, no Reino Unido, o Departamento de Saúde estabeleceu que a farinha de trigo também fosse enriquecida com ácido fólico na concentração de 240  $\mu\text{g}$  por 100 g (2,4  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (ZARE *et al.*, 2011).

A preocupação com a carência de ácido fólico na alimentação de gestantes é tão grande nos Estados Unidos, que em 1998 foi criada uma campanha nacional de incentivo à ingestão de ácido fólico, cujo principal objetivo é a redução das malformações congênitas. Com esse mesmo propósito, um grande estudo epidemiológico foi realizado no Chile, onde a vitamina está sendo adicionada à farinha de trigo destinada à fabricação de pães (220  $\mu\text{g}$  por 100 g). O consumo desse alimento foi relacionado com a incidência de malformações congênitas daquele país (LIMA *et al.*, 2004; THOMAS *et al.*, 2003).

Seguindo a mesma linha, vários outros países estão realizando o enriquecimento de farinhas, entretanto, os níveis de enriquecimento são um pouco diferentes. Estados Unidos, Canadá, Bolívia e Colômbia, por exemplo, utilizam 150  $\mu\text{g}$  de ácido fólico a cada 100 g de farinha. Já o Paraguai e o Equador adicionam 300 e 60  $\mu\text{g}$  de ácido fólico a cada 100 g de farinha, respectivamente (LIMA *et al.*, 2004).

Sem dúvida, o processo de enriquecimento aumenta a qualidade dos alimentos e pode vir a ser uma das soluções empregadas para resolver o problema da ingestão insuficiente de ácido fólico. A indústria brasileira vem promovendo um aumento do emprego de vitaminas para o enriquecimento de alimentos. Dentre as vitaminas, o ácido fólico. São escolhidos preferencialmente os alimentos destinados ao público infantil e gestantes para o enriquecimento com esta vitamina (LIMA *et al.*, 2004). O Ministério da Saúde brasileiro, através de uma resolução da ANVISA (RDC nº 344, de 13 de Dezembro de 2002),

aprovou a adição de ácido fólico em farinhas de trigo e milho na concentração mínima de 150 µg por 100 g (1,5 µg g<sup>-1</sup>) (MARTINS-JÚNIOR *et al.*, 2008).

Em 2004, a ANVISA divulgou um relatório com o objetivo de identificar laboratórios que analisam nutrientes, incluindo ácido fólico, em alimentos. Dos 26 laboratórios que analisavam nutrientes localizados no Brasil, 61,5% (16) analisam ácido fólico. Entre estes, dez laboratórios utilizavam a técnica de HPLC-UV, quatro laboratórios utilizavam métodos microbiológicos e um laboratório utilizava ambas as abordagens (MARTINS-JÚNIOR *et al.*, 2008).

### **2.3 Métodos para determinação de folatos em alimentos**

Técnicas adequadas para a determinação de folatos em alimentos e amostras biológicas incluem tipicamente ensaios microbiológicos, HPLC, procedimentos de rádio ensaios por ligação-competitiva utilizando radio marcadores e enzimas marcadas, e técnicas de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas usando isótopos estáveis (LEENHEER *et al.*, 2000).

Para determinação dos folatos totais, o método microbiológico ainda é o procedimento mais utilizado e amplamente aceito (ALABURDA *et al.*, 2008). Procedimentos de ensaio por ligação-competitiva são tipicamente mais utilizados para análise de folatos no sangue. Separação, identificação, e quantificação de folatos naturais utilizando procedimentos cromatográficos, particularmente HPLC, podem ser conseguidos, porém, não é simples, e requer uma seleção cuidadosa das condições cromatográficas para uma separação adequada (LEENHEER, 2000; NDAW *et al.*, 2001).

Muitos dos métodos empregados para a determinação de ácido fólico em alimentos apresentam alguns inconvenientes, como a baixa confiabilidade, precisão e sensibilidade, lentidão na análise e exatidão questionável. Na tentativa de superar essas dificuldades, métodos por HPLC têm sido desenvolvidos nos últimos anos (NDAW *et al.*, 2001). Mesmo com todas as vantagens apresentadas pela técnica, a boa resolução do sistema cromatográfico é influenciada pelas características do extrato. Extratos mais limpos e concentrações mais elevadas dos compostos de interesse promovem,

respectivamente, o aumento da vida útil da coluna e facilitam a identificação e quantificação das substâncias desejáveis (CATHARINO *et al.*, 2003) (ALABURDA *et al.*, 2008).

### 2.3.1 Extração e limpeza do extrato da amostra

Métodos para a extração do ácido fólico e folatos foram amplamente estudados por diversos pesquisadores. Devido às diferenças das propriedades físico-químicas de cada composto deste vasto grupo de vitaminas da família do ácido fólico, o método a ser escolhido depende do(s) tipo(s) de composto(s) (folatos) que se deseja analisar. Também deve ser levada em conta a matriz que se deseja analisar, sendo o composto de interesse naturalmente encontrado nela, ou simplesmente adicionado à matriz (ALABURDA *et al.*, 2008).

Muitos métodos para separação de um único composto da família dos folatos, como o ácido fólico, dos interferentes da matriz estão disponíveis. Por exemplo, segundo Leenheer *et al.* (2000), Akhtar *et al.* determinaram ácido fólico e seus produtos fotodegradados por HPLC utilizando pareamento de ions, coluna  $\mu$ -Bondapak C18 com metanol como solvente. O comprimento de onda no detector por ultravioleta foi de 254 nm, comprimento de onda padrão utilizado pelos primeiros detectores UV-Vis, porém com menor detectabilidade do ácido fólico que o comprimento de onda de 290 nm. (LEENHEER *et al.*, 2000).

Também segundo Leenheer *et al.* (2000), outros autores, como Hoppner e Lampi determinaram ácido fólico adicionado a medicamentos infantis com coluna Spherisorb ODS (10  $\mu$ m, 250 X 4,6 mm) utilizando gradiente linear de acetonitrila e tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0), com detecção por ultravioleta em 280 nm. Schieffer *et al.* utilizaram HPLC em fase reversa para a determinação de ácido fólico, com detecção no ultravioleta em 365 nm, empregando eluição isocrática com tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,7), para análise de alimentos industrializados. A utilização de comprimentos de onda na faixa de 360 nm teve por objetivo eliminar

interferências que coeluíram com o ácido fólico do cromatograma (LEENHEER *et al.*, 2000).

Segundo Catharino *et al.* (2006), Godoy *et al.* analisaram ácido fólico adicionado em leites e produtos lácteos utilizando 1 g ou 1 mL de amostra, a qual foi submetida a uma etapa de extração com 3 mL de solução aquosa de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A mistura foi deixada por 10 min em banho de ultrassom. Também foi utilizado ácido fosfórico ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e ácido tricloroacético (TCA) para limpeza do extrato. Filtrada em papel filtro comum e em membrana durapore (HVLP 01300 Millipore),  $0,45 \mu\text{m}$ , e injetada no sistema HPLC (CATHARINO *et al.*, 2006).

Lima *et al.* (2004) analisaram amostras de farinha de trigo e de milho enriquecidas com ácido fólico. Adaptaram o método descrito por Godoy *et al.* (2003) para suas matrizes, acrescentando na etapa de extração 1 mL de acetonitrila aos 3 mL de solução aquosa de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Também empregaram ácido fosfórico ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), tampão fosfato e TCA para a limpeza do extrato da amostra (LIMA *et al.*, 2004).

Em 2006, Catharino *et al.* analisaram amostras de fígado de porco, leite em pó e misturas de vegetais em relação ao teor de folatos e ácido fólico. Na etapa de extração, utilizaram solução de acetato de amônio ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) e banho ultrassônico por 10 min. Também foi utilizado TCA para limpeza do extrato da amostra. O comprimento de onda utilizado para a leitura do ácido fólico foi de 290 nm, em detector por ultravioleta (CATHARINO *et al.*, 2006).

Em 2008, Boen *et al.* adaptaram o método de Lima *et al.* (2004) para análise de farinha de trigo e farinha de milho enriquecidas com ácido fólico. Basicamente, a mudança no método se deve a utilização de 4 mL de acetonitrila, 3 mL de solução de KOH ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 2 mL de tampão fosfato na etapa de extração. Para limpeza da amostra foi utilizado igualmente TCA. O extrato foi filtrado em membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  e analisado por sistema HPLC com detecção por ultravioleta no comprimento de onda de 290 nm (BOEN *et al.*, 2008).

Alaburda *et al.* (2008) desenvolveram métodos para análise de farinha de trigo enriquecida com ácido fólico. Em um deles, foi utilizado tampão de tetraborato de sódio  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,5, ajustado com TCA, para a extração das amostras. Uma alíquota de 50 mL desta solução foi adicionada a 5 g de

amostra, a qual foi submetida a uma etapa de agitação por 30 min. Após, o sobrenadante era purificado através da técnica extração por fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) utilizando cartuchos de troca aniônica forte (SAX, do inglês *Strong Anionic Exchange*). O ácido fólico foi eluído do cartucho com 5 mL de solução aquosa de acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com fosfato de potássio dibásico 5% (m/v), pH 4,5, filtrado em membrana de nylon  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  e analisado por sistema HPLC, com detector por ultravioleta em 290 nm (ALABURDA *et al.*, 2008).

Segundo Catharino *et al.* (2006) e Leenheer *et al.* (2000), Vatheristo *et al.* e Stokes ed Webb foram os pioneiros na utilização da SPE para limpeza e pré-concentração dos folatos. Osseyi *et al.* foram os pioneiros a utilizar a SPE para análise de ácido fólico em cereais enriquecidos. Muitos dos cartuchos de SPE utilizados nesses estudos foram de trocadores aniônicos fortes, como as colunas SAX (amina quaternária, Baker 7091-3), em virtude das condições utilizadas na extração da vitamina (CATHARINO *et al.*, 2006; LEENHEER *et al.*, 2000).

A troca iônica reside na troca estequiométrica de ânions ou cátions de uma fase líquida por ânions ou cátions de uma resina trocadora de íons. A adsorção e troca iônica são processos de separação baseados na velocidade de transferência de massa, com ou sem reação química, envolvendo o contato íntimo entre duas fases (sólido-líquido ou sólido-gás) entre as quais os constituintes se distribuem indiferentemente. O objetivo da utilização do SAX é a separação do ácido fólico presente na matriz dos outros compostos interferentes, mediante a interação entre o composto ácido e a resina trocadora básica de amina quaternária (RUTHVEN *et al.*, 1984).

### 2.3.2 Método QuEChERS

ANASTASSIADES *et al.* publicaram em 2003 um método provido com resultados de alta qualidade com um número mínimo de etapas e um baixo consumo de solvente. Ao método foi atribuída a sigla QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), a qual reflete as suas maiores vantagens: rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro. Foi do nosso

interesse utilizar as premissas do método QuEChERS como base para desenvolver um método para determinação de ácido fólico em farinhas enriquecidas neste trabalho, com etapas rápidas, fáceis e seguras, e ter baixo custo.

## **2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência**

A cromatografia líquida de alta eficiência é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, que emprega um conjunto de equipamentos especiais. Esta técnica consegue separar um vasto conjunto de compostos similares. Com a demanda atual de análises, esse tipo de técnica cromatográfica vem sendo indispensável em laboratórios de química analítica (COLLINS *et al*, 2006; CIOLA, 1998)

Existem basicamente sete diferentes mecanismos que governam as separações em HPLC. Através da troca da fase estacionária e da fase móvel é possível utilizar cada um deles com o mesmo equipamento (COLLINS *et al.*, 2006). Neste trabalho, nos deteremos à cromatografia líquido-sólido ou por adsorção e a cromatografia líquida com fase ligada.

### **2.4.1 Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção**

A separação na cromatografia líquido-sólido ou por adsorção se baseia na competição entre moléculas da amostra e as da fase móvel, para ocupar os sítios ativos na superfície de um sólido (fase estacionária) (COLLINS *et al.*, 2006). A molécula do soluto passa a ser adsorvida na fase estacionária assim que uma molécula da fase móvel for deslocada da superfície. Se o adsorvente possuir uma superfície polar (por exemplo, sílica ou alumina), grupos apolares (por exemplo, hidrocarbonetos) terão pouca afinidade com essa superfície e não irão deslocar a molécula da fase móvel, ou seja, terão pouca interação com a fase estacionária. Já os componentes mais solúveis na fase estacionária serão seletivamente retidos. Grupos funcionais polares, capazes de formar

ligações de hidrogênio, terão fortes afinidades com a superfície polar e serão fortemente retidos. Moléculas polarizáveis (por exemplo, moléculas aromáticas) irão apresentar interação dipolo induzido-dipolo com a superfície do adsorvente e, portanto, também serão retidas; o grau de retenção depende das propriedades de polarização de cada molécula ou grupo funcional. Dessa forma, pode-se estabelecer que compostos mais polares sejam eluídos depois dos compostos menos polares. Basicamente, os componentes serão adsorvidos se forem capazes de deslocar as moléculas da fase móvel da estacionária (COLLINS *et al.*, 2006; CIOLA, 1998).

É importante que as partículas da fase estacionária apresentem uma grande área de superfície, isto é, um grande número de sítios ativos. Frequentemente a atividade da superfície de alguns tipos de sólidos (por exemplo sílica e alumina) se encontra afetada pela forte retenção de moléculas de alta polaridade, como álcoois, fenóis, água etc., o que acaba comprometendo a reprodução adequada de métodos de separação em algumas ocasiões, devido a mudanças nas propriedades da superfície da fase estacionária. Portanto, a superfície da sílica empregada na HPLC é comumente submetida a determinados processos de desativação com o propósito de diminuir a retenção de moléculas muito polares e, assim, manter a superfície em condições uniformes, o que contribuirá para melhorar a reprodutibilidade dos métodos (COLLINS *et al.*, 2006).

A fase móvel é relativamente apolar (hexano, heptano, diclorometano ou tetraidrofurano). As extensões diferentes nas quais os vários tipos de compostos na mistura são adsorvidos resultam na separação. Em alguns casos, em que temos uma forte retenção de alguns componentes da amostra na fase estacionária (sólido ativo), é necessário aumentar a polaridade da fase móvel de uma maneira constante e uniforme, durante a corrida cromatográfica, e dessa forma se consegue um incremento da solubilidade dos componentes da amostra na fase móvel. Consequentemente esses componentes antes fortemente retidos na fase estacionária exibirão outro comportamento durante a corrida cromatográfica, com maiores interações com a fase móvel. A essa variação dá-se o nome de eluição por gradiente ou programação da fase móvel (COLLINS *et al.*, 2006; CIOLA, 1998).

#### 2.4.2 Cromatografia líquida com fase ligada

O mecanismo principal dessa técnica baseia-se na partição, ocasionando alguns autores considerá-la uma cromatografia líquido-líquido. Entretanto, como este tipo de fase estacionária também apresenta influência de grupos ativos (polares) da própria fase estacionária, ou da superfície do suporte, também ocorre o mecanismo de adsorção. Assim, a maioria dos pesquisadores considera essa técnica um método separado (COLLINS *et al.*, 2006).

A grande vantagem desta técnica é que a variação da natureza dos grupos funcionais da fase estacionária promove diferentes tipos de seletividade e opções para as separações cromatográficas. Tais grupos podem ser de natureza polar, como o grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ), ou o grupo nitrilo ( $-\text{CN}$ ), ou o grupo diol [ $-\text{CH}_2(\text{OH})_2$ ], que, funcionando similarmente às fases polares da cromatografia líquido-sólido, são chamados de fase normal (NP, do inglês *Normal Phase*). Os grupos também podem ser de natureza apolar, como os grupos octil ( $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ ), octadecil ( $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ), fenil ( $-\text{C}_6\text{H}_5$ ) etc., que representam as fases reversas (RP, do inglês *Reverse Phase*). As fases reversas são mais comumente empregadas em HPLC, sendo que nos últimos 20 anos, tem sido comumente a primeira escolha na análise de moléculas de interesse biológico (aminoácidos, proteínas, fármacos humanos e veterinários), alimentos (vitaminas etc.) e muitos outros campos de aplicação em que se deseja a separação e análise de compostos de baixa ou média polaridade. Essa técnica que utiliza as fases estacionárias apolares tem inúmeras aplicações, tendo resolvido vários problemas, cujas soluções até então eram consideradas muito difíceis. (COLLINS *et al.*, 2006; LANÇAS, 2010). Neste trabalho, foi empregada a técnica de HPLC-RP.

Compostos fracamente iônicos (ácidos e bases) também podem ser separados usando-se essa técnica, se a dissociação for suprimida pelo uso de ácido, base ou solução-tampão, adicionados na fase móvel na escala de pH 2 a 8, fazendo que o equilíbrio seja deslocado no sentido da forma não-iônica (COLLINS *et al.*, 2006).

### 2.4.3 Detector

O detector é o componente mais caro e sofisticado do sistema cromatográfico, no caso deste trabalho, foi utilizada a detecção por arranjo de diodos (DAD, do inglês, *Diode Array Detection*). Basicamente, ele é o “olho” do sistema cromatográfico, medindo as mudanças na concentração ou a massa dos compostos da amostra que está deixando a coluna. Mede (transduz) de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da amostra, ou da solução que a contém, e envia um sinal para registro, geralmente, diretamente proporcional à concentração do componente na amostra. Esse sinal é gerado assim que o efluente sai da coluna e chega ao detector, produzindo, assim dados qualitativos e/ou quantitativos sobre a amostra e seus constituintes (COLLINS *et al.*, 2006; CIOLA, 1998; LANÇAS, 2010).

O ruído do detector é a variação do sinal do detector que não é causada pela amostra, e, sim, pela variação de voltagem, temperatura, flutuações dos sinais elétricos, bolhas de ar ou aterramento inadequado. Ele pode ser de curto alcance ou alta frequência. O desvio da linha de base está, normalmente, associado ao aquecimento do detector na primeira. Contudo, se o desvio persistir, pode ser atribuído à mudança de índice de refração da fase móvel em eluição por gradiente, mudança na composição da fase móvel ou mudança na temperatura (COLLINS *et al.*, 2007).

Detectores ópticos por absorvância no ultravioleta-visível (os mais empregados em HPLC) e infravermelho, por fluorescência e por índice refração são classificados como não-destrutivos e permitem recolher a amostra para posterior caracterização. Podem ainda ser acoplados a outros detectores com a finalidade de se obter informações qualitativas de vários compostos presentes na amostra. Já os detectores eletroquímicos e espectrômetros de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) são exemplos de detectores destrutivos (COLLINS *et al.*, 2006).

Os detectores são classificados em duas categorias: Detectores sensíveis à concentração produzem um sinal,  $S$ , que é proporcional à concentração,  $c$ , da amostra no efluente [ $S \propto c$  (g mL<sup>-1</sup>)]. Os detectores sensíveis à massa produzem um sinal que é proporcional à velocidade do fluxo de massa, ou seja, ao número de moléculas ou íons da amostra,  $n$ , por

unidade de tempo,  $\Delta t$ , no efluente [ $S \propto n/\Delta t$  ( $\text{g s}^{-1}$ )]. Os detectores eletroquímicos, de espalhamento da luz, condutividade e fotocondutividade são sensíveis à massa. Os detectores de absorvância de luz no ultravioleta-visível e infravermelho, bem como o detector por fluorescência, são sensíveis à concentração (COLLINS *et al.*, 2006).

O DAD detecta vários comprimentos de onda simultaneamente, sendo de onda variável no UV-Vis, cobrindo uma ampla faixa de comprimentos de onda (190 a 800 nm) através de um monocromador, que seleciona o comprimento de onda desejado do feixe de luz (fonte luminosa) emitido por lâmpadas de deutério (UV, permitem uma maior sensibilidade) ou tungstênio (Vis). Toda a luz da fonte passa pela cela do detector. A luz emergente é dispersa por uma grade holográfica, sendo os comprimentos de onda resultantes focalizados sobre uma fila de fotodiodos (de 256 até 1024 nm). Com isso, todo espectro pode ser armazenado, usando-se um microcomputador, eliminando-se a necessidade de deter o fluxo da fase móvel para registrar um espectro de um dado componente. Pela lei de Beer-Lambert:  $A = \epsilon bc$ , onde  $\epsilon$  é a absorvidade do soluto e  $b$  é o caminho óptico, sendo absorvância a forma mais conveniente de medição (COLLINS *et al.*, 2006; CIOLA, 1998).

## 2.5 Validação de métodos cromatográficos

As técnicas de separação, tais como GC e HPLC, vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI *et al.*, 2004).

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida (RIBANI *et al.*, 2004). Para garantir que um método analítico novo assegure informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento (RIBANI *et al.*, 2004). Conseqüentemente, antes de um método analítico ser implementado para análises de rotina, ele deve primeiramente ser validado para demonstrar que é adequado para seu uso pretendido (ROZET *et al.*, 2007).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais e internacionais (RIBANI *et al.*, 2004). Infelizmente, algumas definições são diferentes entre as diversas organizações (RIBANI *et al.*, 2004), sendo assim, um grande esforço no sentido de harmonizar guias para recuperação de informação em medidas analíticas foi efetuado por intermédio de trabalho em conjunto entre grupos do sistema ISO (do inglês *International Standardization Organization*), IUPAC (do inglês *International Union of Pure Applied Chemistry*) e AOAC (do inglês *Association of Official Analytical Chemists*) (LANÇAS, 2004).

Neste trabalho, os parâmetros utilizados para a validação de método analítico foram: curva analítica e linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão, os quais foram avaliados seguindo as orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos estabelecidos segundo o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica (2011).

### 2.5.1 Curva analítica e linearidade

A resposta para um procedimento analítico corresponde à relação, dentro de uma faixa específica, entre a resposta (sinal, área, altura do pico, absorção) e a concentração (quantidade) do analito na amostra (ROZET *et al.*, 2007). Neste trabalho a resposta adotada será a área do pico.

Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse, deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática muitas vezes, pode ser expressa por uma equação de reta chamada curva de analítica, a qual é

geralmente aceita com um mínimo de 5 pontos (NETO *et al.*, 2002; LANÇAS, 2004).

A linearidade refere-se à relação entre a quantidade introduzida no instrumento e a quantidade calculada a partir da curva de analítica, a qual relaciona a resposta instrumental e a concentração (ROZET *et al.*, 2007). A equação de regressão linear (Equação 1) que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad \text{Equação (1)}$$

onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0

Além dos coeficientes a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r, o qual fornece uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida (CHUI *et al.*, 2001). A regressão linear deve ter alto coeficiente de determinação ( $r^2 > 0,999$ ) (PIMENTEL & NETO, 1996), ou de correlação ( $r > 0,99$ ) (ANVISA, 2003) ou  $> 0,9$  (INMETRO, 2003), o que evidencia um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

### 2.5.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Em análises onde são realizadas determinações na faixa de concentração de traços e ultra-traços de analitos é imprescindível que, medidas sejam feitas na região do LOD e LOQ (RIBANI *et al.*, 2004).

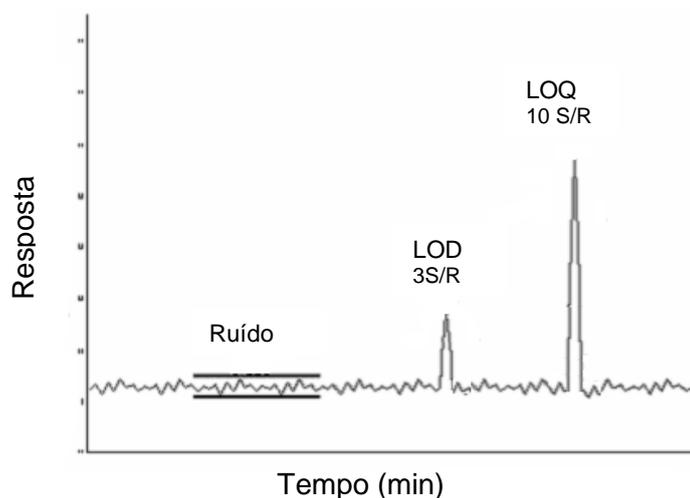
O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento

experimental (ICH, 1995; INMETRO, 2003). O LOD pode ser calculado por diferentes métodos, sendo o método baseado na relação sinal:ruído mais comumente utilizado, porém este método somente pode ser aplicado em sistemas analíticos que apresentam ruído para a linha base (RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) é o menor valor de concentração em que o analito pode ser quantificado com certo limite de confiança, ou seja, abaixo deste valor medições não apresentam suficiente confiança para quantificação (THOMPSON *et al.*, 2002). O método para determinação do LOQ deve ser considerado com a incerteza da medida de um componente dentro de um intervalo linear (RIBANI *et al.*, 2004).

Estes limites são estabelecidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração (BRASIL, 2003; FRANCOFFE *et al.*, 1996).

O LOD e o LOQ foram estabelecidos com base na Figura 2, onde o LOD corresponde a 3 vezes o ruído da linha de base e o LOQ corresponde à concentração que produz uma relação sinal:ruído superior a 10.



**Figura 2. Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ**

### 2.5.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2003). A precisão em validação de métodos pode ser considerada em três níveis diferentes: repetitividade (medidas em um mesmo dia), precisão intermediária (medidas realizadas ao longo de vários dias) e reprodutibilidade (medidas realizadas em laboratórios diferentes) (RIBANI *et al.*, 2004).

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; com repetições efetuadas em um curto intervalo de tempo (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou analistas, ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (ICH, 1995). Recomenda-se, para o cálculo da precisão intermediária, um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003). O objetivo da precisão intermediária na validação é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004).

Ambas repetitividade e precisão intermediária podem ser expressas através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) (RIBANI *et al.*, 2004), sendo que, em métodos de análises de traços, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (HUBER, 1998).

O valor numérico usado para avaliar a precisão, RSD, pode ser calculado através da Equação (2) (CAUSON, 1997; GARP, 1999).

$$\text{RSD} = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto

$$s = \{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$$

$x_i$  = valores individuais

$x_m$  = média das medidas em replicatas

N = número de medidas.

#### 2.5.4 Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência, aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência) (INMETRO, 2003).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

Quando materiais de referência não estão disponíveis, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de recuperação (CODEX ALIMENTARIUS, 2001), os quais são geralmente expressos em percentual.

A recuperação dos analitos pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas desta. As amostras devem ser fortificadas com os analitos em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação desse procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que se apresenta na amostra (INMETRO, 2003).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental consistiu no desenvolvimento, otimização e validação de um método rápido para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida. A quantificação do ácido fólico foi realizada por HPLC-DAD, onde se avaliou o tempo de corrida e interferentes, assim como a escolha do melhor comprimento de onda e gradiente da fase móvel.

Os parâmetros analíticos avaliados na etapa de validação foram: linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção e de quantificação, citados na revisão bibliográfica.

#### 3.1 Instrumentação

- Sistema HPLC-DAD:
  - Bomba ternária Varian 9010 (Varian, EUA);
  - Detector Varian ProStar 325 DAD (Varian, Australia);
  - Coluna Fase Reversa C8, Eclipse XDB-C8 5 µm, 4,6 x 150 mm (Agilent, EUA);
  - Coluna Fase Reversa C18, Phenomenex, Synergi 4 µm Fusion RP-80, 4,6 x 250 mm (Phenomenex, EUA);
  - Sistema de aquisição de dados: Star 4.5 Chromatography Workstation (Varian, EUA);
- Sistema purificador de água Milli-Q, Millipore, Direct-Q® 3 UV (França);
- Balança analítica HR-120 (AND, Japão);
- Vortex(Equipar LTDA, Brasil);
- pHmetro, pH 500 series (Cole Parmer, Cingapura);
- Centrífuga refrigerada, NT825 (Nova Técnica, Brasil);
- Centrífuga (Gemmy Industrial, Taiwan).

### 3.2 Materiais

- Seringa de plástico 1000  $\mu\text{L}$  (Henke Sass Wolf, Alemanha);
- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha).
- Cartucho SPE, Strata SAX (55  $\mu\text{m}$ , 70  $\text{\AA}$ ), 500 mg / 3 mL, (Phenomenex, EUA).
- Filtros de membrana nylon 13mm, 0,2  $\mu\text{m}$  (Vertical<sup>®</sup>, Tailândia).

### 3.3 Solventes e Reagentes

- Acetato de sódio P.A(México);
- Sulfato de magnésio anidro (Japão);
- Fosfato de potássio dibásico (México);
- PSA, Bondesil, 40  $\mu\text{m}$  (EUA);
- C18, Bondesil, 40  $\mu\text{m}$ (EUA);
- Tetraborato de sódio (Merck, Alemanha);
- Hidróxido de potássio (Synth, Brasil);
- Ácido tricloroacético (Synth, Brasil);
- Ácido acético glacial (EUA).
- Acetonitrila – Grau HPLC (EUA);
- Água ultrapurificada em sistema Milli-Q.

### 3.4 Preparo das Soluções Analíticas

Para o preparo das soluções estoque, efetuou-se o cálculo para determinar a quantidade de padrão sólido puro de ácido fólico a ser pesado e o preparo da solução aquosa de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Foram preparados 500 mL de solução aquosa de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> pesando-se 2,80 g de KOH em pastilha e dissolvendo-se estas em água ultrapurificada em um balão volumétrico de 500 mL. Essa solução foi estocada em vidro âmbar.

A solução estoque na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> foi preparada a partir da dissolução do padrão sólido de ácido fólicopesado em solução aquosa de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A partir desta solução estoque, mediante diluição, preparou-se as soluções analíticas estoque de 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>.

Estas soluções estoque foram armazenadas em geladeira à temperatura de 4 °C. Por precaução, soluções estoque novas foram preparadas mensalmente (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2005). Antes de serem utilizadas, foram retiradas da geladeira e deixadas na bancada para atingir a temperatura ambiente.

### **3.5 Parâmetros de otimização do sistema HPLC-DAD**

Baseado nos trabalhos de ALABURDA *et al.* (2008), BOEN *et al.*, (2008) e LEENHEER *et al.*(2000), foram testadas dois tipos de colunas cromatográficas, ambas utilizadas em Cromatografia Líquida de fase reversa: C18 e C8. As seguintes condições cromatográficas foram testadas.

#### **3.5.1 Ensaio 1 – pH da fase móvel aquosa**

Neste ensaio, foi definido qual o melhor pH para a “fase móvel A” (aquosa) dentre valores de pH 2,5; 2,8 e 3,0. O pH da água ultrapura foi ajustado com ácido acético glacial.

### 3.5.2 Ensaio 2 – Coluna de C18

Neste ensaio o gradiente de eluição foi ajustado de acordo com a Tabela 1, abaixo:

**Tabela 1. Gradiente da fase móvel para o ensaio 2**

Fase móvel A	Fase móvel B	Tempo (min)
Água (pH 2,8) (%)	ACN (%)	
85	15	0,00
85	15	15,01
40	60	20,00
85	15	20,01
85	15	23,00

Vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

Comprimento de onda: 290 nm.

### 3.5.3 Ensaio 3 – Coluna de C18

Neste ensaio o gradiente de eluição foi ajustado de acordo com a Tabela 2, abaixo:

**Tabela 2. Gradiente da fase móvel para o ensaio 3**

Fase móvel A	Fase móvel B	Tempo (min)
Água (pH 2,8) (%)	ACN (%)	
85	15	0,00
85	15	8,00
50	50	8,01
50	50	13,00
85	15	13,01
85	15	18,00

Vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

Comprimento de onda: 290 nm.

### 3.5.4 Ensaio 4 – Coluna C18

Neste ensaio o gradiente de eluição foi ajustado de acordo com a Tabela 3, abaixo:

**Tabela 3. Gradiente da fase móvel para o ensaio 4**

Fase móvel A	Fase móvel B	Tempo (min)
Água (pH 2,8) (%)	ACN (%)	
90	10	0,00
76	24	8,00
76	24	12,00
50	50	14,00
50	50	21,00
90	10	23,00
90	10	30,00

Vazão: 0,7 mL min<sup>-1</sup>.

Comprimento de onda: 290 nm.

### 3.5.5 Ensaio 5 – Coluna C18

Neste ensaio o gradiente de eluição foi ajustado de acordo com a Tabela 4, abaixo:

**Tabela 4. Gradiente da fase móvel para o ensaio 5**

Fase móvel A	Fase móvel B	Tempo (min)
Água (pH 2,8) (%)	ACN (%)	
87	13	0,0
87	13	8,0
50	50	9,0
50	50	14,0
87	13	15,0
87	13	20,0

Vazão: 0,7 mL min<sup>-1</sup>.

Comprimento de onda: 290 nm.

## 3.5.6 Ensaio 6 – Coluna C18

Neste ensaio o gradiente de eluição foi ajustado de acordo com a Tabela 5, abaixo:

**Tabela 5. Gradiente da fase móvel para o ensaio 6**

Fase móvel A	Fase móvel B	Tempo (min)
Água (pH 2,8) (%)	ACN (%)	
85	15	0,0
85	15	5,0
85	15	16,0
20	80	17,0
20	80	24,0
85	15	25,0
85	15	30,0

Vazão: 0,7 mL min<sup>-1</sup>.

Comprimento de onda: 290 nm.

## 3.5.7 Ensaio 7 – Coluna C18

Neste ensaio o gradiente de eluição foi ajustado de acordo com a Tabela 6, abaixo:

**Tabela 6. Gradiente da fase móvel para o ensaio 7**

Fase móvel A	Fase móvel B	Tempo (min)
Água (pH 2,8) (%)	ACN (%)	
87	13	0,0
87	13	7,0
20	80	8,0
20	80	15,0
87	13	16,0
87	13	23,0

Vazão: 0,7 mL min<sup>-1</sup>.

Comprimento de onda: 290 nm.

### 3.5.8 Ensaio 8 – Coluna C8

Neste ensaio, para o ajuste do gradiente de acordo com a coluna de C8, com a finalidade de diminuir o tempo total da corrida cromatográfica, o gradiente de eluição foi ajustado de acordo com a tabela 7:

**Tabela 7. Gradiente da fase móvel para o ensaio 8**

Fase móvel A	Fase móvel B	Tempo (min)
Água (pH 2,8) (%)	ACN (%)	
88	12	0,00
88	12	6,00
50	50	7,00
50	50	12,00
88	12	13,00
88	12	18,00

Vazão: 1,4 mL min<sup>-1</sup>.

Comprimento de onda: 290 nm.

### 3.6 Amostras para etapa de validação

As amostras utilizadas no processo de validação do método devem ser isentas de ácido fólico, a fim de que não haja interferência no processo, pois com estas amostras foram preparadas as curvas analíticas (no extrato da matriz) e foram realizadas as fortificações para a avaliação do grau de exatidão e precisão do método de extração. Para esse tipo de amostra, dá-se o nome “branco”.

A amostra “branco” de farinha de trigo foi obtida de um engenho de trigo da cidade de Santa Maria/RS, Brasil. Esta foi denominada como livre da adição de ácido fólico e a massa adquirida na quantidade de 1 kg, armazenada em potes plásticos. A amostra foi armazenada em freezer a -18 °C até o momento de sua utilização.

### 3.7 Desenvolvimento do método para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida

Para que fique mais bem exemplificada a pesquisa, os testes tanto para limpeza do extrato da amostra, quanto para extração da amostra foram realizados intercaladamente de acordo com os resultados que foram sendo obtidos. Dessa forma, primeiramente serão relatados abaixo os testes realizados para a etapa de limpeza do extrato da amostra e após os testes realizados para extração da amostra.

#### 3.7.1 Testes para limpeza do extrato da amostra com C18, PSA e $\text{MgSO}_4$

No procedimento para limpeza do extrato, 20 g de farinha de trigo amostra branco em um balão de 100 mL foram fortificados com padrão de ácido fólico a fim de que a resposta no detector apresentasse uma concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . A amostra branca foi extraída com 50 mL de  $\text{KOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e 50 mL de solução de tetraborato de sódio  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ . Após, uma alíquota de 2 mL é retirada para cada ensaio.

##### 3.7.1.1 Ensaio com C18

Adaptado de KOLBERG *et al.* (2008), que desenvolveu um trabalho sobre análise de resíduos de pesticidas em farinha de trigo, foi utilizado 500 mg de C18 para 4 mL de extrato para a limpeza do extrato das amostras.

A partir da alíquota de 2 mL, extraída conforme item 3.8.1, foi realizado o teste com 250 mg de C18 para limpeza do extrato da amostra. Assim, também com outra alíquota de 2 mL foi realizado teste de limpeza do extrato com 250 mg de C18 e 300 mg  $\text{MgSO}_4$ . Deste modo, avaliou-se a limpeza do extrato da amostra.

### 3.7.1.2 Ensaio com PSA

O ensaio utilizando o adsorvente amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) foi estabelecido baseado no trabalho de KOLBERG *et al.* (2008).

A partir da alíquota de 2 mL, extraída conforme item 3.8.1, foi realizado o teste com 50 mg de PSA para limpeza do extrato da amostra. Assim, também com outra alíquota de 2 mL foi realizado teste de limpeza do extrato com 50 mg PSA e 300 mg MgSO<sub>4</sub>. Deste modo, avaliou-se a limpeza do extrato da amostra.

### 3.7.1.3 Ensaio com MgSO<sub>4</sub>

Adaptado de KOLBERG *et al.* (2008), avaliou-se a eficiência do MgSO<sub>4</sub> para a limpeza do extrato da amostra. Foram utilizados 600 mg de MgSO<sub>4</sub> para 4 mL de extrato.

A partir da alíquota de 2 mL, extraída conforme item 3.8.1, foi realizado o teste com 300 mg de MgSO<sub>4</sub> para limpeza do extrato da amostra. Deste modo, avaliou-se a limpeza do extrato da amostra.

## 3.7.2 Ensaios com SPE – Cartuchos de SAX

De acordo com ALABURDA *et al.* (2008), a utilização de SPE (SAX) se mostrou adequada para a etapa de limpeza do extrato da amostra de farinha de trigo.

### 3.7.2.1 Teste da capacidade de percolação pelo cartucho de SPE

Na realização do primeiro teste, foram extraídos 5 g de farinha de trigo com 5 mL de ACN e 5 mL de solução de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Após, o

procedimento envolvia eluir 2, 3, 5 e 8 mL do extrato por cartuchos de SAX para verificar o volume adequado de extrato que o cartucho poderia suportar.

No segundo teste, foram extraídos 2 g de farinha de trigo com 5 mL de ACN e 5 mL de solução de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Após, o procedimento envolvia eluir 2, 3, 5 e 8 mL do extrato por cartuchos de SAX para verificar o volume adequado de extrato que o cartucho poderia suportar.

No terceiro teste, foi extraído 1 g de farinha de trigo com 5 mL de ACN e 5 mL de solução de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Após, o procedimento envolvia eluir 2, 3, 5 e 8 mL do extrato por cartuchos de SAX para verificar o volume adequado de extrato que o cartucho poderia suportar.

No quarto teste, foram extraídos 2 g de farinha de trigo com 5 mL de solução aquosa de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e 5 mL de solução aquosa de tetraborato de sódio  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , com pH 8,5. Após, o procedimento envolvia eluir 2, 3, 5 e 8 mL do extrato por cartuchos de SAX para verificar o volume adequado de extrato que o cartucho poderia suportar.

No quinto teste, foi extraído 1 g de farinha de trigo com 5 mL de solução aquosa de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e 5 mL de solução aquosa de tetraborato de sódio  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , com pH 8,5. Após, o procedimento envolvia eluir 2, 3, 5 e 8 mL do extrato por cartuchos de SAX para verificar o volume adequado de extrato que o cartucho poderia suportar.

### 3.7.2.2 Teste com água para limpeza e soluções para eluição

Na realização do primeiro teste, foram utilizados 2 mL de água de pH 8,5 (ajustado com solução aquosa de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) para a limpeza após a percolação dos extratos pelos cartuchos. Após, foram eluídos em diferentes cartuchos de SAX (previamente percolados pelo extrato da amostra e pela água de limpeza) as diferentes soluções, respectivamente: acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com pH ajustado em 4,5 com ácido acético; acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com fosfato de potássio dibásico a 5% (m/v), com pH ajustado em 6,5 com ácido acético; e acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com fosfato de potássio dibásico a 5% (m/v), com pH ajustado em 4,5 com ácido acético. Essas soluções verificaram a capacidade de eluir o ácido fólico retido nos cartuchos de SAX.

Na realização do segundo teste, foram utilizados 2 mL de água de pH 7,0 para a limpeza após a eluição dos extratos pelos cartuchos. Após, foram percolados em diferentes cartuchos de SAX (previamente percolados pelo extrato da amostra e pela água de limpeza) as diferentes soluções, respectivamente: Acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com pH ajustado em 4,5 com ácido acético; Acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com fosfato de potássio dibásico a 5% (m/v), com pH ajustado em 6,5 com ácido acético; e acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com fosfato de potássio dibásico a 5% (m/v), com pH ajustado em 4,5 com ácido acético. Essas soluções verificaram a capacidade de eluir o ácido fólico retido nos cartuchos de SAX.

### 3.7.3 Teste de extração com acetonitrila, hidróxido de potássio e tetraborato de sódio

De acordo com os trabalhos de ALABURDA *et al.* (2008), BOEN *et al.* (2008) e ANASTASSIADES *et al.* (2003), os seguintes procedimentos de extrações foram testados, a fim de se obter a melhor solução extratora para o método desenvolvido:

No teste A, foram adicionados 5 mL de acetonitrila a 1 g de farinha de trigo pesada em tubo de polipropileno de 50 mL, com tampa rosqueada. Em seguida, o tubo foi agitado em vortex por 2 min. Adicionou-se 5 mL de solução aquosa de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ao tubo, que foi novamente agitado por 2 min em vortex.

Após, o tubo foi centrifugado a 3500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi repassado para um tubo de 15 mL de polipropileno com tampas rosqueadas, esse foi centrifugado a 7500 rpm por 5 min. O passo seguinte foi a limpeza do extrato.

No teste B, foram adicionados 5 mL de acetonitrila a 1 g de farinha de trigo pesada em tubo de polipropileno de 50 mL, com tampa rosqueada. Em seguida, o tubo foi agitado em vortex por 2 min. Adicionou-se 5 mL de solução aquosa de tetraborato de sódio  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  ao tubo, que foi novamente agitado por 2 min em vortex. Seguiu-se a sequência do teste A.

No teste C, foram adicionados 5 mL de solução aquosa de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> a 1 g de farinha de trigo pesada em tubo de polipropileno de 50 mL, com tampa rosqueada. Em seguida, o tubo foi agitado em vortex por 2 min. Adicionou-se 5 mL de solução aquosa de tetraborato de sódio 0,04 mol L<sup>-1</sup> ao tubo, que foi novamente agitado por 2 min em vortex. Seguiu-se a sequência do teste A.

### **3.8 Validação do método desenvolvido para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida**

Depois de definidas as melhores condições de extração e de análise, o próximo passo foi realizar a validação do método, segundo os parâmetros que serão descritos a seguir.

#### **3.8.1 Curvas analíticas e linearidade**

A confecção das curvas analíticas do composto em estudo foi obtida com o preparo de soluções analíticas no extrato branco de farinha de trigo, nas concentrações de 0,15; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Cada solução analítica foi injetada 6 vezes.

#### **3.8.2 Determinação da estimativa de LOD e LOQ, do instrumento e do método**

Neste trabalho, injetaram-se soluções padrão de ácido fólico no extrato da matriz na concentração de 0,2 mg L<sup>-1</sup> e mediu-se a altura do ruído próximo ao tempo de retenção do composto. Em seguida, determinou-se a concentração que correspondeu a 3 e 10 vezes essa altura, sendo que estas correspondem ao LOD e LOQ respectivamente.

### 3.8.3 Ensaios de fortificação para avaliação da exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Neste trabalho, o estudo da precisão do instrumento foi realizado efetuando-se 6 injeções de cada concentração das soluções analíticas de padrão no sistema HPLC-DAD.

A precisão do método, em termos de repetitividade ( $RSD_r$ ) foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Cada nível de fortificação foi extraído seis vezes e cada extrato injetado uma vez.

Para avaliar a precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ), utilizaram-se 2 dias e 2 operadores diferentes para a análise.

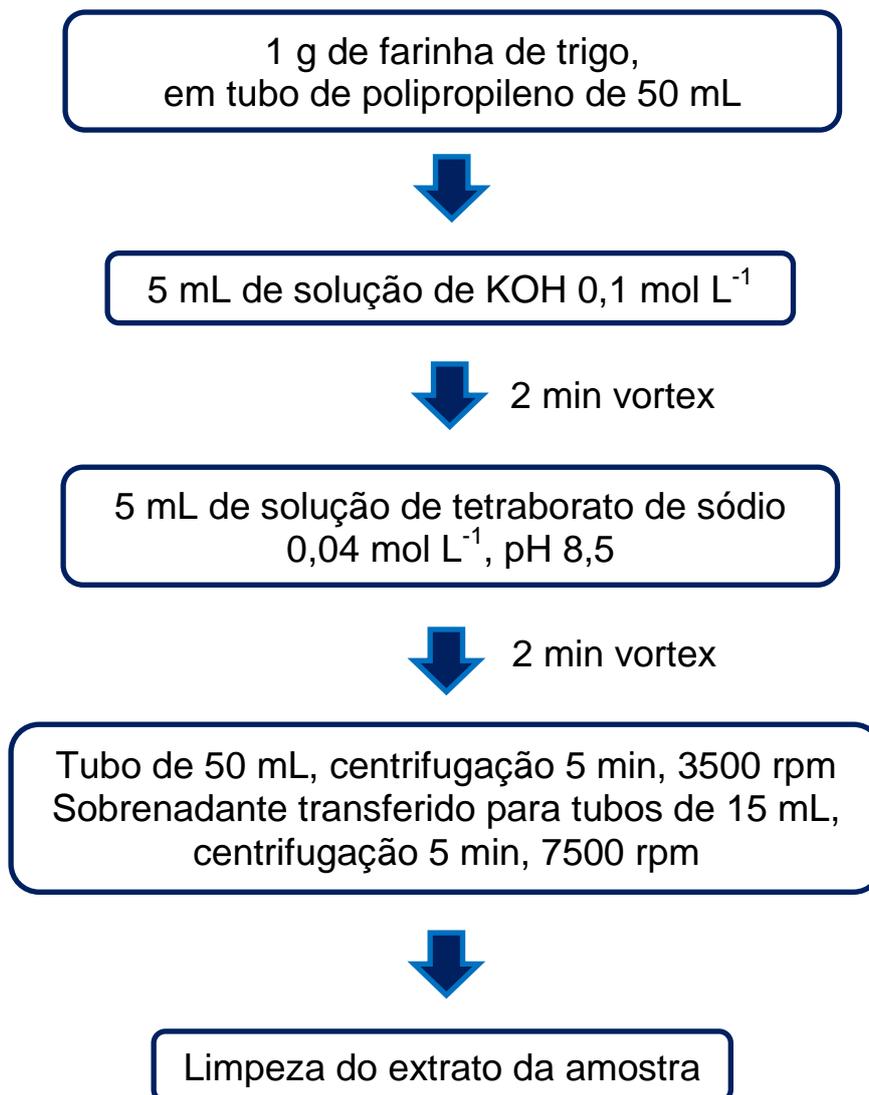
Os ensaios de fortificação e de recuperação têm por objetivo a avaliação da exatidão do método como um todo, uma vez que se calcula a concentração real medida, no final de todo o procedimento, em comparação com a concentração conhecida adicionada inicialmente na matriz. Assim, através das recuperações obtidas de ácido fólico, pode-se avaliar a exatidão do método, e através dos RSDs calculados, obtêm-se informações acerca da repetitividade (precisão) dos dados obtidos.

O procedimento de fortificação foi realizado 6 vezes ( $n = 6$ ), para cada nível de fortificação (3 níveis), sendo eles nas concentrações de 1,25, 1,87 e 2,5 mg kg<sup>-1</sup>. A fim de se obter os valores dos níveis de fortificação mencionados, porções de 1 g de amostras branco de farinha de trigo foram pesadas, em tubos de polipropileno com tampas rosqueadas, e fortificadas, respectivamente, com 12,5, 18,75 e 25 µL de uma solução analítica contendo 100 mg L<sup>-1</sup>, de ácido fólico.

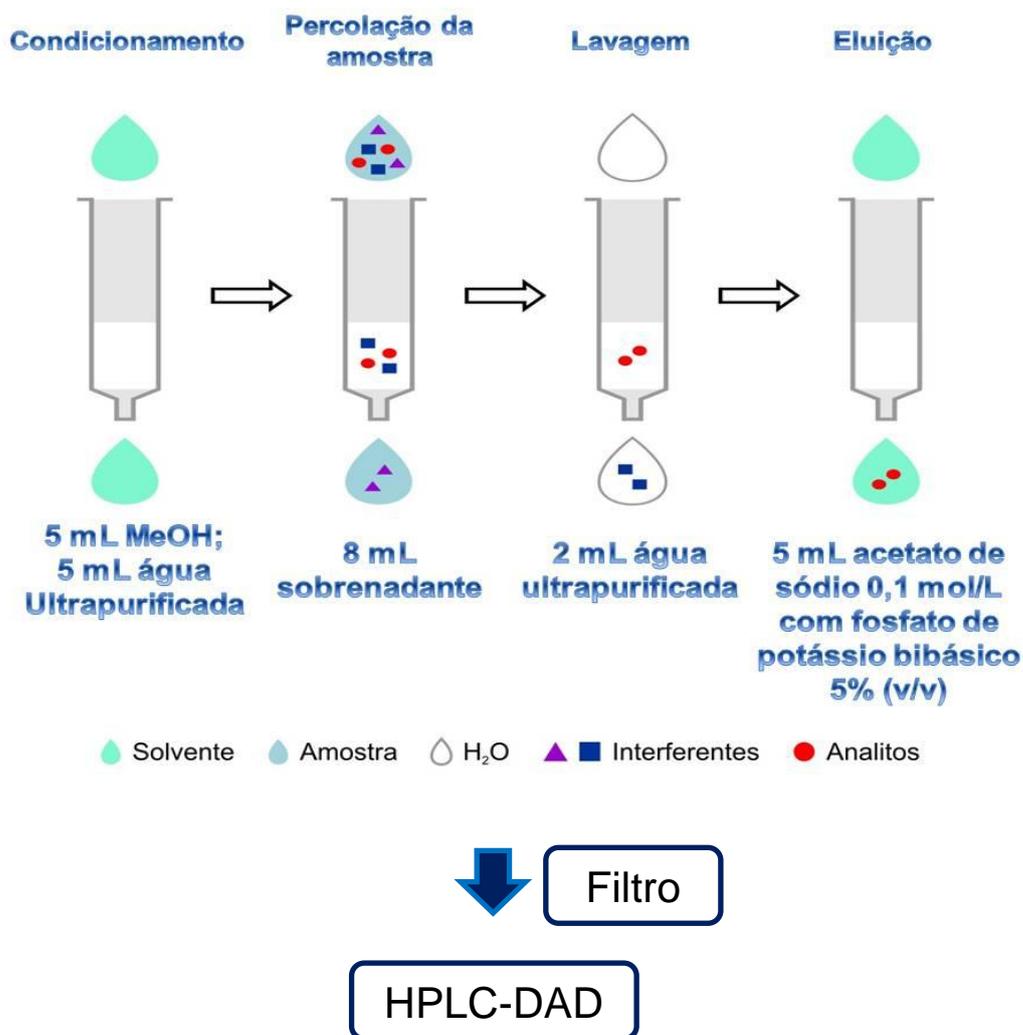
Após a fortificação, 5 mL de solução de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados às amostras e os tubos agitados em vortex por 2 min. Em seguida, 5 mL de solução de tetraborato de sódio 0,04 mol L<sup>-1</sup>, com pH ajustado em 8,5, também foi adicionada as amostras, e estas foram agitadas por 2 min, em vortex. Na sequência do processo, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 min, repassadas para tubos de polipropileno de 15 mL e novamente centrifugadas a 7500 rpm por 5 min. Ao fim da centrifugação, 8 mL de cada amostra foram eluídos em cartuchos de SAX previamente condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água. Após eluição do extrato, 2 mL de água Milli-Q

foram utilizados para limpeza do cartucho. Para eluição do ácido fólico retido no cartucho de SAX, foram utilizados 5 mL de solução tampão de acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com fosfato de potássio dibásico 5% (m/v), pH 4,5 ajustado com ácido acético. Essa solução final foi, então, filtrada em membrana de disco de  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  e injetada no sistema HPLC-DAD nas condições cromatográficas otimizadas. A injeção manual consistiu em aspirar manualmente com uma seringa apropriada a solução a ser injetada. Cerca de  $100 \text{ }\mu\text{L}$  são suficientes para preencher a alça de injeção. Certificou-se de que não havia bolhas de ar presentes na seringa. Nos intervalos entre as injeções, a seringa foi lavada 5 vezes com ACN e 2 vezes com a solução que seria injetada.

As Figuras 3 e 4 mostram esquematicamente as etapas que foram definidas para o método desenvolvido. A Figura 3 esquematiza as etapas de extração da amostra, enquanto que a Figura 4 esquematiza as etapas de limpeza do extrato da amostra.



**FIGURA 3.** Etapas de extração do método desenvolvido para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida



**FIGURA 4.** Representação esquemática das etapas de limpeza do extrato da amostra do método desenvolvido.

### 3.9 Aplicação do procedimento em amostras reais

Depois de efetuada a validação do método, este foi aplicado em 5 amostras de farinha de trigo de marcas diferentes adquiridas em mercados da região de Santa Maria.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Condições do sistema HPLC-DAD

Abaixo estão apresentadas as condições utilizadas para o sistema HPLC-DAD, para determinação de ácido fólico adicionado a farinha de trigo. Dos ensaios realizados e avaliados, o que apresentou as melhores condições otimizadas para a análise das amostras e determinação de ácido fólico foi o ensaio número 8 (item 3.6.8) para as condições Cromatográficas. Assim como o pH da fase móvel aquosa 2,8 (ensaio 1, item 3.6.1) como sendo o mais adequado para o gradiente:

- Segundo o item 3.6.1, o pH escolhido para o gradiente de fase móvel aquosa (A) foi 2,8. A escolha foi baseada em critérios de outros autores como LEENHEER *et al.* (2000); PATRING *et al.* (2006); BOEN *et al.* (2008) e ALABURDA *et al.* (2008). Também se levou em consideração a capacidade da coluna de sustentar tal pH, para que não houvesse deterioração da estrutura química da fase estacionária, e o comportamento do ácido fólico em tal pH para uma separação adequada.
- Programação do gradiente da bomba, demonstrada pela Tabela 8, de acordo com o item 3.6.8:

**Tabela 8. Gradiente da fase móvel utilizada para o estudo**

Fase móvel A	Fase móvel B	Tempo (min)
Água (pH 2,8) (%)	ACN (%)	
88	12	0,00
88	12	6,00
50	50	7,00
50	50	12,00
88	12	13,00
88	12	18,00

Vazão: 1,4 mL min<sup>-1</sup>.

Comprimento de onda: 290 nm.

A possibilidade de diminuir consideravelmente o tempo da corrida cromatográfica, frente aos tempos encontrados nos ensaios com a coluna de C18 (mais longa e com maior retenção dos compostos), e uma separação adequada do analito de interesse dos compostos interferentes, acarretou na escolha da coluna C8.

- Volume da alça de injeção: 50  $\mu$ L;
- Tempo total de corrida de 18 min.

## **4.2 Desenvolvimento e otimização do método para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida**

### 4.2.1 Avaliação dos testes para limpeza do extrato da amostra com C18, PSA e $MgSO_4$

Na avaliação dos testes com C18, as recuperações de ácido fólico foram inferiores a 40%, demonstrando assim, uma possível interação e retenção de ácido fólico por parte do C18. Resultado semelhante também ocorreu na composição 250 mg de C18 e 300 mg de  $MgSO_4$ .

Na avaliação dos testes com PSA, ocorreram co-eluentes da matriz de farinha de trigo juntamente ao tempo de retenção do ácido fólico, e a baixa recuperação de ácido fólico (inferior a 20%), este procedimento foi descartado. Resultado semelhante também ocorreu na composição 50 mg de PSA e 300 mg de  $MgSO_4$ .

A utilização de  $MgSO_4$  nesta etapa não foi adequada para a etapa de limpeza do extrato da amostra.

#### 4.2.2 Avaliação da utilização de SPE – Cartuchos de SAX

A utilização de SPE para limpeza do extrato das amostras se mostrou a mais viável das alternativas. Já largamente estudada em pesquisas com ácido fólico e folatos, o SAX demonstrou uma ótima retenção do ácido fólico adicionado em farinha de trigo e baixa retenção de componentes extraídos da matriz.

As avaliações dos cartuchos de SAX ocorreram em vários tipos de testes com resultados descritos abaixo.

##### 4.2.2.1 Avaliação da capacidade de percolação pelo cartucho de SPE

Foram realizados 5 testes para se avaliar a capacidade de volume de extrato a ser eluído pelo cartucho de SAX. Dentre eles o que apresentou os resultados mais adequados aos propósitos do método desenvolvido foi o quinto ensaio, que utilizava 1 g de amostra de farinha de trigo. O volume de extrato de 8 mL pôde ser adequadamente percolado pelo cartucho, e assim proporcionou uma maior concentração de ácido fólico no cartucho.

O contrário ocorreu com os testes em que uma quantidade maior de matriz foi utilizada (2 e 5 g). Os extratos dessas matrizes não percolavam corretamente, diminuindo a vazão ao longo do tempo em que percorriam os cartuchos, até o ponto de saturação dos cartuchos, em que a vazão cessava (entupia). Os volumes (2, 3, 5 e 8 mL) daqueles extratos ou não passavam completamente pelo cartucho, ou quando passavam vagorosamente (volume mínimo, 2 mL) comprometiam a etapa seguinte de limpeza do cartucho com água.

Inclusive na maioria dos ensaios em que se utilizou ACN para extração, a percolação do extrato foi comprometida. Isto se deve provavelmente ao fato da acetone nitrila extrair visivelmente mais componentes da matriz que as soluções aquosas de KOH e tetraborato de sódio, provocando a saturação do cartucho com componentes da matriz e conseqüente entupimento do cartucho.

#### 4.2.2.2 Avaliação da água de limpeza e soluções para eluição

A fim de se verificar se o tipo de água de limpeza, pós-eluição do extrato pelo cartucho, influenciava na recuperação de ácido fólico, foram realizados ensaios relativos a isso. Assim, também foram realizados ensaios sobre a capacidade das soluções de eluírem o ácido fólico do cartucho de SAX.

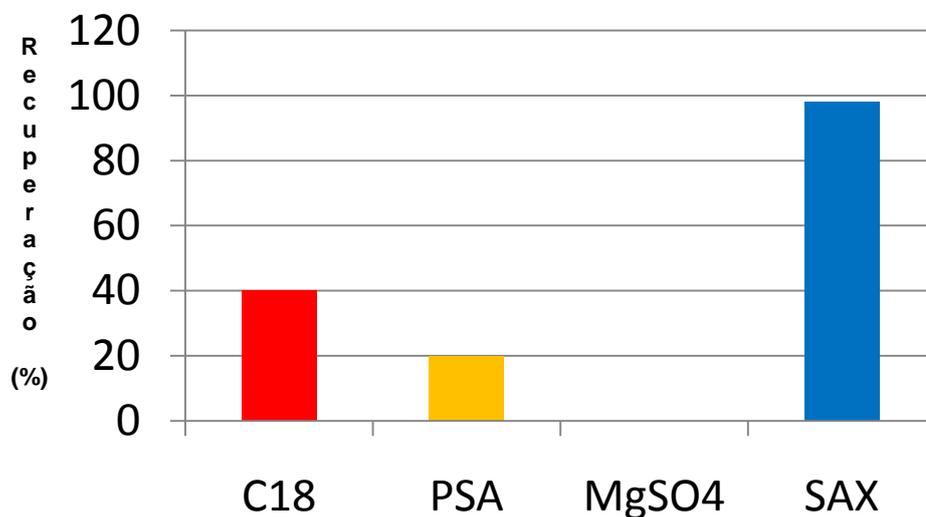
As águas de limpeza, a água de pH 7,0 e a água de pH 8,5 utilizadas apresentaram resultados semelhantes. Ambas lavaram adequadamente o cartucho após a eluição do extrato, sem que eluissem o ácido fólico retido. Porém, a água de pH 7,0 apresentou ligeira eficiência em termos de recuperação do ácido fólico, em relação a água de pH 8,5. Além do mais, a água de pH 7,0 apresentou a vantagem de ser utilizada logo após sua retirada do sistema de purificação, promovendo economia tanto em tempo de preparo de uma solução básica, assim como no gasto com reagente.

Dentre as 3 soluções utilizadas para eluir o ácido fólico do cartucho avaliadas, a que apresentou os melhores resultados de recuperação foi a solução de acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com fosfato de potássio dibásico 5% (m/v), e ajuste de pH 4,5 com ácido acético. A mesma solução, porém com pH 6,5, apresentou ligeira diminuição na recuperação do ácido fólico. A solução de acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  sem fosfato de potássio dibásico, com pH 4,5, não apresentou recuperação do ácido fólico. Consequentemente, o emprego do fosfato de potássio dibásico adicionado, na concentração de 5% (m/v), favorece o deslocamento do ácido fólico do cartucho para a solução de eluição (OSSEYI *et al.*, 1998).

#### 4.2.3 Avaliação da extração com acetonitrila, KOH e tetraborato de sódio

Após os testes com as diferentes soluções extratoras de acordo com o item 3.8.3, as melhores soluções extratoras encontradas foram as soluções aquosas de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e tetraborato de sódio  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,5 (ajustado com TCA), de acordo com teste C. Além de obterem a melhor recuperação de ácido fólico, também extraem menos componentes da matriz, com as vantagens citadas nos tópicos anteriores.

A Figura 5, abaixo, mostra o gráfico dos valores de recuperação encontrados para cada um dos compostos testados segundo os itens 3.8.1 e 3.8.2.



**FIGURA 5. Gráfico dos valores de recuperação de ácido fólico**

### 4.3 Validação do método rápido para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida

#### 4.3.1 Curvas analíticas e linearidade

A tabela 9 apresenta as médias das curvas analíticas na matriz que foram injetadas segundo item 3.9.1.

**Tabela 9. Equação da reta, coeficiente de determinação e intervalo linear**

Equação da reta ( $y = ax + b$ )	$r^2$	Intervalo linear ( $\text{mg L}^{-1}$ )
$y = 84,607x - 6,4343$	0,9923	0,15 – 0,5

A partir desses resultados pode-se concluir que a faixa linear obtida por HPLC-DAD foi de 2 ordens de grandeza, sendo que o primeiro ponto da curva corresponde ao limite de quantificação do equipamento.

Analisando-se as equações das retas obtidas, pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado já que os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) foram todos maiores que 0,99 o que segundo a literatura é satisfatório (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

#### 4.3.2 Determinação do LOD e LOQ do instrumento e do método

Os valores para LOD e LOQ são, respectivamente, 0,045 e 0,15 mg L<sup>-1</sup> para o instrumento; 0,28 e 0,937 mg kg<sup>-1</sup> para o método, os quais foram obtidos conforme descrito no item 3.9.2. Os valores são considerados satisfatórios, pois permitem determinar concentrações abaixo do limite mínimo estabelecido pela ANVISA, de 150 µg de ácido fólico por 100 g de farinha de trigo (1,5 mg kg<sup>-1</sup>).

#### 4.3.3 Ensaio de fortificação, para avaliar exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária) do método

Os resultados de precisão para o método estão demonstrados juntamente com os resultados de recuperação, na Tabela 9. A precisão intermediária foi realizada empregando-se dias e operadores diferentes daqueles dos estudos de repetitividade. Para validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a precisão deve apresentar RSD ≤ 30%, segundo o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica (2011).

Portanto, todos os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos, inclusive dentre os resultados sugeridos por RIBANI *et al.* (2004), com o RSD ≤ 20%.

A Tabela 10 apresenta os valores de recuperação obtidos para as fortificações, em diferentes níveis de concentração, utilizando-se o procedimento descrito no item 3.9.3.

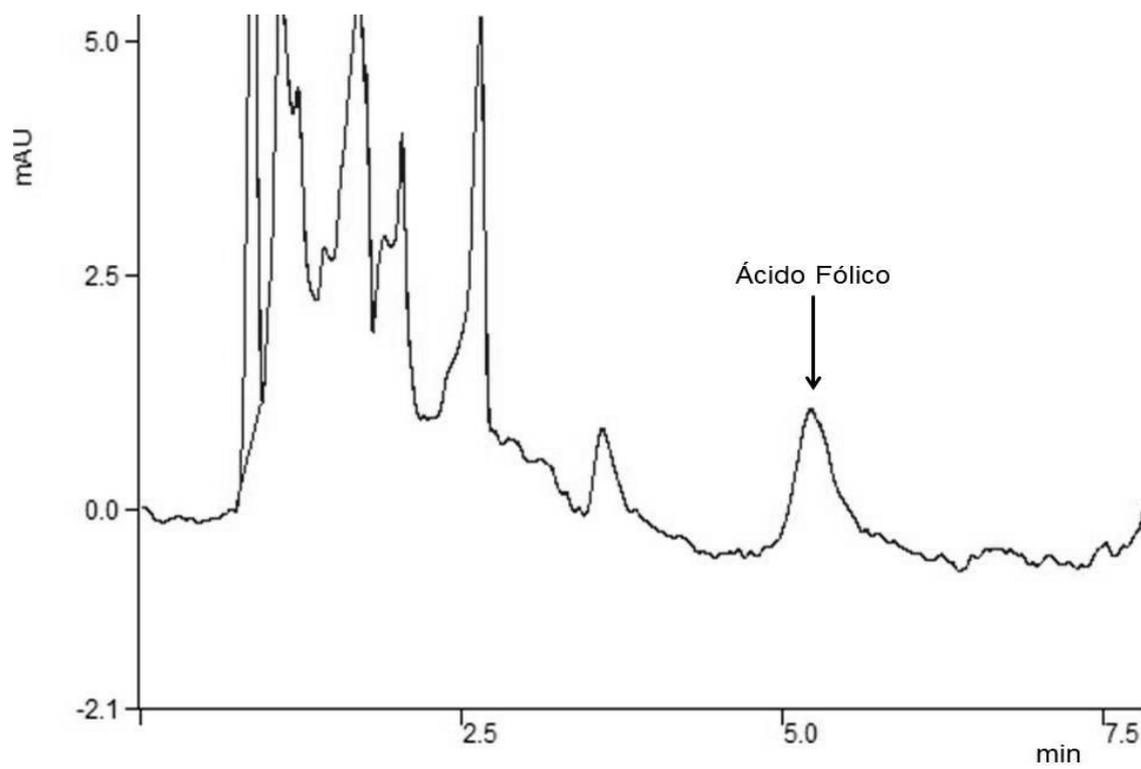
A recuperação depende da amostra, do procedimento de extração e da concentração do analito. Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de que, para validação de métodos cromatográficos, as recuperações devem estar entre 80 e 110% segundo o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica (2011). Todos os valores obtidos apresentaram-se dentro desse intervalo e, portanto, o método está de acordo com os parâmetros exigidos.

A Figura 6 apresenta um cromatograma obtido por HPLC-DAD da fortificação da matriz no nível de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , segundo o item 3.9.3.

A Figura 7 apresenta os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD A) de uma solução analítica na concentração de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido fólico adicionada ao extrato “branco”, B) da fortificação da matriz no nível de  $1,25 \text{ mg kg}^{-1}$ , C) para o extrato “branco” de farinha de trigo, utilizada para avaliar a precisão intermediária do método. Ambas fortificações foram preparadas de acordo com o item 3.9.3.

**Tabela 10. Recuperação,  $RSD_r$  e  $RSD_{pi}$  do método**

Nível de fortificação ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Repetitividade	
	Recuperação (%)	$RSD_r$ (%)
1,25	96,7	3,8
1,87	97,8	2,8
2,5	99,2	1,3
	Precisão Intermediária	
	Recuperação (%)	$RSD_{pi}$ (%)
1,87	98,4	1,8



**Figura 6. Cromatograma obtido por HPLC-DAD da fortificação da matriz no nível de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$**

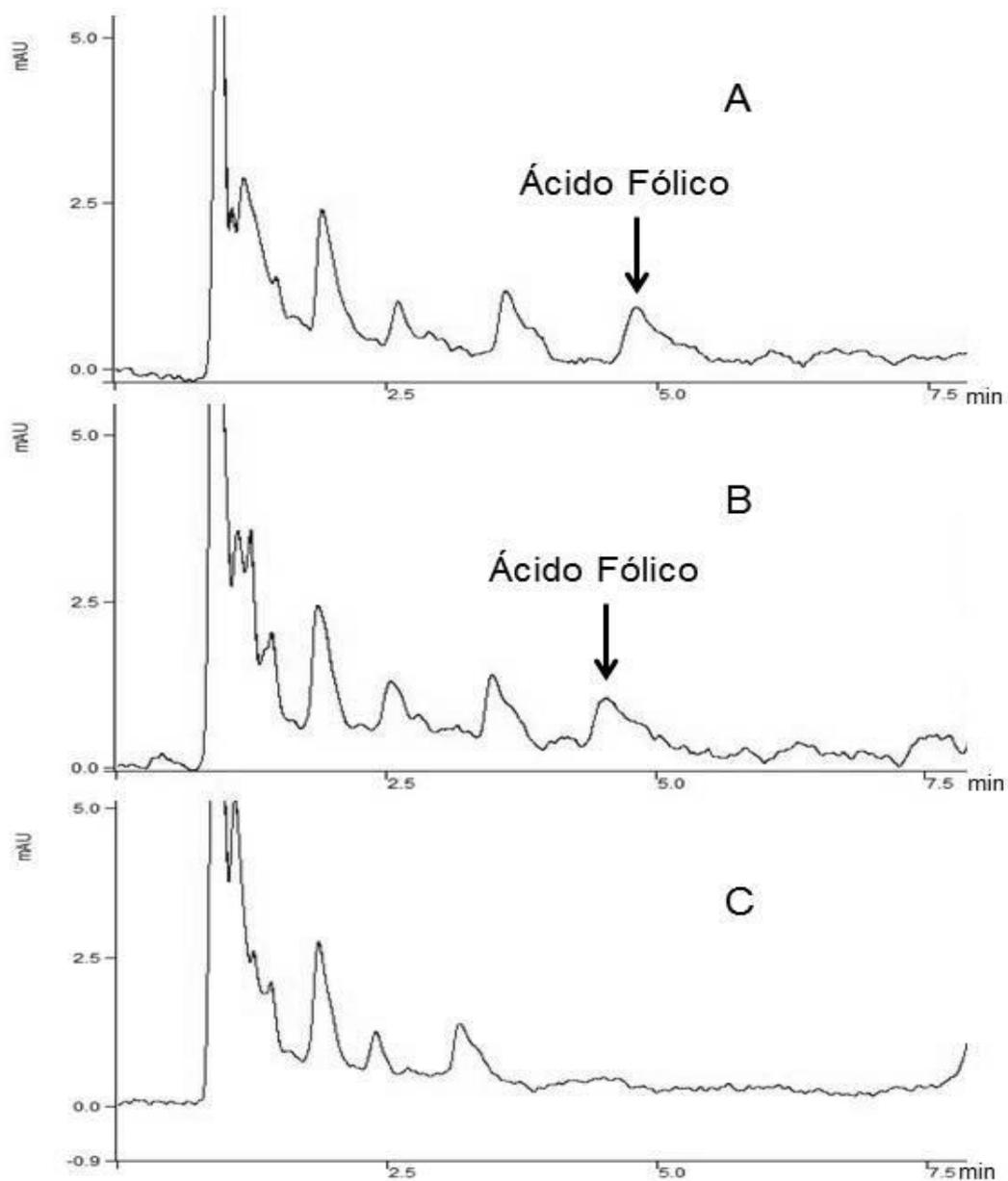


Figura 7. Cromatograma obtido por HPLC-DAD: A) de uma solução analítica na concentração de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido fólico adicionada ao extrato “branco”, B) da fortificação da matriz no nível de  $1,25 \text{ mg kg}^{-1}$ , C) para o extrato “branco” de farinha de trigo

#### 4.3.4 Aplicação do procedimento em amostras reais

Após a avaliação das fortificações (recuperações) e das precisões (repetitividade e precisão intermediária), foram extraídas 5 amostras de farinha de trigo enriquecidas com ácido fólico de marcas diferentes, adquiridas no comércio local.

Das cinco marcas analisadas, apenas 1 apresentou nível de ácido fólico acima do mínimo indicado pela legislação brasileira, de 150  $\mu\text{g}$  por 100 g de farinha de trigo ( $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (ANVISA, 2002). A concentração determinada de ácido fólico foi de  $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ . Outra marca apresentou concentração de ácido fólico na faixa entre o LOD e LOQ do método. As demais amostras não apresentaram ácido fólico. Estes resultados estão de acordo com os resultados das análises das mesmas amostras reais utilizando-se o método desenvolvido por ALABURDA *et al.* (2008).

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado o desenvolvimento, avaliação e aplicação de um método para a determinação de ácido fólico adicionado à farinha de trigo. O objetivo de propor um método de análise de rotina com redução nos custos e tempo de análise foi alcançado, uma vez que métodos anteriores envolviam a utilização de grandes volumes de solventes e reagentes, assim como apresentavam diversas e longas etapas para extração e limpeza do extrato da amostra.

Para a avaliação dos itens ensaiados foi utilizado um sistema HPLC-DAD, o qual possibilitou a determinação do ácido fólico ao nível de concentração de 0,937 mg kg<sup>-1</sup> (nível de LOQ), e sua detecção a nível de 0,28 mg kg<sup>-1</sup> (nível de LOD).

A faixa linear situou-se entre 0,15 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>, com coeficiente de determinação ( $r^2$ ) médio igual a 0,9923 para as concentrações analíticas utilizadas para confecção das curvas, injetadas repetidamente (n= 6), o que mostra a possibilidade da utilização deste sistema para determinação de ácido fólico.

Os resultados obtidos nas avaliações para o novo método desenvolvido mostraram que a extração do ácido fólico da matriz de farinha de trigo utilizando solução aquosa de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e solução aquosa de tetraborato de sódio 0,04 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,5, (1:1; v/v) foi adequado. Assim como a extração, limpeza do extrato da amostra também foi adequada, utilizando-se da técnica de SPE com cartuchos de SAX. Os valores encontrados para recuperação de ácido fólico dentre de 96,7 e 99,2%, nos níveis de 1,25; 1,87 e 2,5 mg kg<sup>-1</sup>, com boa precisão (RSD < 3,8%), demonstraram que o desempenho do novo método desenvolvido é satisfatório.

A aplicação do método em amostras reais de farinha de trigo comerciais e os resultados obtidos destas análises sugerem o quanto importante deve ser o controle destes produtos alimentícios.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Desenvolvimento e validação de métodos utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, visando níveis mais baixos de concentração e a análise simultânea de outras vitaminas do complexo B.

## REFERÊNCIAS

ALABURDA, J., ALMEIDA, A. P., SHUNDO, L., RUVIERI, V., SABINO, M. Determination of folic acid in fortified wheat flours. **J. Food Comp. Anal.**, v. 21, p. 336-342, 2008.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) Brasília. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm\\_pesquisa\\_ingrediente.asp](http://www.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_ingrediente.asp)>. Acesso em 28 julho de 2011.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Consulta pública nº 51, de 10 de junho de 2002. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/consulta/2002/51\\_2002.htm](http://www.anvisa.gov.br/divulga/consulta/2002/51_2002.htm)>. Acesso em 13 de outubro de 2011.

BOEN, T. R., SOEIRO, B. T., PEREIRA-FILHO, E. R., LIMA-PALLONE, J. A. Folic acid and iron evaluation in brazilian enriched corn and wheat flours. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, p. 53-59, 2008.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em 1 de outubro de 2011.

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

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho – HPLC**, Editora Edgard Blücher LTDA., Brasil: 1998. 192 p.

CODEX ALIMENTARIUS METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, **Codex on methods of analysis and sampling**, Budapeste, 2001.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**, Editora Unicamp, Campinas, Brasil: 2006. 453 p.

EUROPEAN PHARMACOPEIA 5.0. 01/2005:0067, 1630-1632.

FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **Journal of Chromatography B**, v. 686, p. 77-83, 1996.

GARP (ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS). **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos** (Apostila), p. 66-73, 1999.

GUIA DE VALIDAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICA, Fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários. **CGAL/DAS**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2011, 73 p.

GUJSKA, E., KUNCEWICZ, A. Determination of folate in some cereals and commercial cereal-grain products consumed in Poland using trienzyme extraction and high performance liquid chromatography methods. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 221, p. 208-213, 2005.

HUBER, L. Validation of analytical methods: Review and strategy. **LC-GC Europe**, v. 11, p. 96-105, 1998.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2003. 35p.

International Conference on Harmonization (ICH); **Validation of analytical procedures: methodology, Q2B** (CPMP/ICH/281/95), 1995.

KAMEI, M., ITO, Y., ANDO, N., AWAYA, T., YAMADA, T., NAKAGAWA, M., YAMAGUCHI, A., OHUCHI, M., YAZAKI, M., TOGARI, H. Brain atrophy caused by vitamin B12 - deficient anemia in an infant. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 33, p. 556-558, 2011.

LANÇAS, F. M. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 51-60, 2009.

LANÇAS, F. M. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 49-70, 2010.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, São Carlos: RiMa, 2004, 62p.

LEENHEER, A. P., LAMBERT, W. E., BOCXLAER, J. F. **Modern Chromatographic Analysis of Vitamins**. Third Edition, Ghent, Belgium: 2000. 616 p.

LIMA, J. A., CATHARINO, R. R., GODOY, H. T. Ácido fólico em leite e bebida láctea enriquecidos – estudo da vida-de-prateleira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, p. 82-87, 2004.

MARTINS-JÚNIOR, H. A., WANG, A. Y., ALABOURDA, J., PIRES, M. A. F., VEGA, O. B., LEBRE, D. T. A validated method to quantify folic acid in wheat flour samples using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, p. 971-977, 2008.

NDAW, S., BERGAENTZLÉ, M., AOUDÉ-WERNER, D., LAHÉLY, S., HASSELMANN, C. Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates. **Journal of Chromatography A**, v. 928, p. 77-90, 2001.

NETO, B. B. *et al.* Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, p. 856-865, 2002.

OSSEYI, E. S., WHELING, R. L., ALBRETCH, J. A. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, v. 826, p. 235-240, 1998.

PATRING, J. D. M., LANINA S. A., JESTREBOVA J. A. Applicability of alkyl-bonded ultra-pure silica stationary phases for gradient reversed-phase HPLC of folates with conventional and volatile buffers under highly aqueous conditions. **Journal Separation Science**, v. 29, p. 889-904, 2006.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. Calibration: A review for analytical chemists. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

RIBANI, M., BOTOLLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROZET, E. *et al.* Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

RUTHVEN, D.M., **Principles of adsorption and adsorption processes**, John Wiley & Sons, 1984.

THOMAS, P. M., FLANAGAN, V. P., PAWLOSKEY, R. J. Determination of 5-Methyltetrahydrofolic acid and folic acid in citrus juices using stable isotope dilution – mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 1293-1296, 2003.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, p. 835-855, 2002.

ZARE, H. R., SHISHEHBORE, M. R., NEMATOLLAHI, D. A high sensitive and selective sensor on the basis of 4-hydroxy-2-(triphenylphosphonio)phenolate and multi-wall carbon nanotubes for electrocatalytic determination of folic acid in presence of ascorbic acid and uric acid. **Electrochimica Acta**, v. 58, p. 654-661, 2011.