

Validação de metodologia para a determinação de ácido fólico em margarina enriquecida e avaliação da estabilidade da vitamina durante estocagem

Validation of methodology for determination of folic acid enriched margarine and evaluation of the stability of the vitamin during stockage

RIALA6/968

Juliana. A. LIMA, Rodrigo R. CATHARINO, Helena T. GODOY*

* Endereço para correspondência: Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

* e-mail: helenat@fea.unicamp.br Telefone: +55-19-37884024 FAX: +55-19-37882159

RESUMO

Com a finalidade de amenizar os problemas relacionados à carência de ácido fólico, muitos produtos alimentícios estão sendo submetidos ao processo de enriquecimento. Portanto, tornam-se necessárias metodologias analíticas capazes de avaliar o comportamento dessa vitamina, quando adicionada a esses produtos. O objetivo deste trabalho foi a validação de uma metodologia para a determinação de ácido fólico adicionado à margarina, utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. A vitamina foi extraída da matriz com solução de KOH, seguida por etapa de limpeza com ácido tricloroacético. O ácido fólico foi separado utilizando-se coluna de C₁₈ e solução acidificada e acetonitrila. A detecção foi feita a 290nm e a quantificação por padronização externa. A metodologia mostrou-se eficiente com taxas de recuperação entre 94 e 97%, boa repetibilidade (CV de 0,5 a 1,4) e limites de detecção e quantificação de 1,3ng/g e 2,6ng/g, respectivamente. No estudo de vida-de-prateleira realizado, durante 4 meses de estocagem, resultou em perda de grande parte da vitamina, aproximadamente 55%.

Palavras-Chave. ácido fólico, cromatografia líquida de alta eficiência, estabilidade, margarina.

ABSTRACT

With the purpose to brighten up the problems related to the folic acid deficiency, many foods are being enriched. Analytical methodologies are necessary to evaluate the behavior of this vitamin when added into these products. The aim of the work was the validation of methodology for folic acid analysis in enriched margarine. The vitamin was extracted from enriched margarine using KOH solution and the extract was cleaned with trichloroacetic acid. The vitamin was separated in a C₁₈ column, with acid solution and acetonitrile as mobile phase. The ultraviolet detection was at 290nm and the quantification was by external standardization. The methodology was efficient showed recovery rates among 94 and 97%, good repeatability (V.C. 0.5 to 1.4%) and detection and quantification limits were 1.3ng/g and 2.6ng/g, respectively. Shelf life study, during 4 storage months, resulted in loss of great portion about vitamin, approached 55%.

Key Words. folic acid, high performance liquid chromatography, stability, margarine.

INTRODUÇÃO

A indústria brasileira de alimentos vem promovendo um grande aumento do emprego de vitaminas para o enriquecimento de vários produtos⁴, entre elas o ácido fólico, uma vitamina do complexo B, que atua bioquimicamente em importantes reações de transporte de carbono⁷ essenciais para o bom funcionamento do organismo. Atualmente, os pesquisadores, estão convencidos que o ácido fólico é indispensável à dieta humana

e animal, sendo considerado como a “vitamina do futuro”.

Os possíveis efeitos adversos diretamente ligados a dietas carentes de ácido fólico, e que tem surtido repercussão mundial, são as malformações congênitas, os defeitos no tubo neural de fetos e a espinha bífida, entre outros^{6,7}. Além disso, muitos estudos apresentam evidências de que o ácido fólico previne o câncer, a anemia e as doenças cardíacas^{6,11,13,18}.

A preocupação com a carência de ácido fólico na alimentação de gestantes é tão grande nos EUA, que em 1998

foi criada uma campanha nacional de incentivo à ingestão de ácido fólico, cujo principal objetivo é a redução das malformações congênitas¹⁵.

O processo de enriquecimento aumenta a qualidade dos alimentos e pode vir a ser uma das soluções para a ingestão insuficiente de ácido fólico^{1,14,17,19}. No Brasil, o leite, produtos lácteos, cereais, biscoitos, farinhas, entre outros, são os alimentos preferencialmente escolhidos para o enriquecimento com esta vitamina. Muitos desses alimentos são destinados ao público infantil, além de gestantes que têm suas necessidades de ingestão da vitamina aumentadas. Outro produto que está sendo enriquecido com ácido fólico é a margarina, bastante consumida pela população em geral, entretanto, com características muito diferentes dos alimentos até então enriquecidos com essa vitamina.

Embora cada vez mais aumente o número de alimentos que estão sendo enriquecidos com ácido fólico, o controle desses produtos é bastante dificultado pela ausência de metodologias confiáveis destinadas a esse fim. A metodologia desenvolvida e validada por Catharino e Godoy⁵ parece ser bastante promissora, no sentido de tentar solucionar esse problema.

A avaliação da qualidade dos produtos enriquecidos com ácido fólico, inclui também a averiguação da estabilidade dessa vitamina durante o processamento e estocagem dos alimentos. Essa pesquisa é de grande importância, também para a indústria, pois pode proporcionar o conhecimento da viabilidade da adição das vitaminas a determinados produtos. Uma fonte alimentar a ser enriquecida, deve apresentar consumo significativo e homogêneo pelas diversas camadas da população e os nutrientes adicionados devem ser estáveis e biodisponíveis após o processamento e durante o período de estocagem³.

Na literatura são descritos poucos trabalhos que avaliam a estabilidade do ácido fólico adicionado a alimentos, em geral. Essas pesquisas mostram, em sua maioria, dados sobre a resistência de folatos, naturalmente presentes em determinados alimentos e submetidos a alguns tipos de processamentos.

Os objetivos do presente trabalho foram a validação de um método para a determinação de ácido fólico em margarina enriquecida e sua aplicação em teste de estabilidade da vitamina nesse tipo de alimento, durante estocagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Produto avaliado

No Brasil, apenas uma empresa fabrica margarina enriquecida com ácido fólico. Três diferentes amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas-SP, com a preocupação de se obter lotes com data de fabricação o mais recente possível, para um posterior estudo de vida de prateleira. Cada lote foi composto por duas embalagens de 250g, que tiveram o seu conteúdo homogeneizado antes da retirada de

amostra para análise. As determinações foram realizadas em duplicatas.

Reagentes

O padrão de ácido fólico foi gentilmente cedido pela M.Cassab Comércio e Indústria LTDA, (SIGMA cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila grau cromatográfico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. O ácido tricloroacético, grau analítico foi obtido da Synth. A água utilizada para o preparo das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis, antes de serem utilizadas, foram filtradas em filtros MILLIPORE (HAWP e HVLPO4700), com poros de 0.45µm de diâmetro.

Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático com de 1 a 100µL de capacidade, degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos. O sistema é controlado pelo software HP-Chemstation, que permitiu análise da pureza do pico de interesse e o melhor tratamento dos dados. A coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 150X4,6mm d.i. (Raimin Instrument Company) foi utilizada para o processo cromatográfico, protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5µm, 10X4,6mm d.i (Varian).

Determinação de ácido fólico

Para a análise do ácido fólico em margarina enriquecida, seguida do estudo de vida-de-prateleira, utilizou-se a metodologia desenvolvida por Catharino e Godoy⁵, validada para produtos lácteos e cereais.

O conteúdo de duas embalagens (250g) foi fundido em forno de microondas convencional, por aproximadamente 15 segundos e tomado 1,0g de margarina, após homogeneização total da amostra. O ácido fólico foi extraído com 3,0mL de solução de hidróxido de potássio (0,1mol/L) em banho ultra-sônico por 10 minutos. O extrato foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 10mL, adicionando-se 3,0mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 2,0mL de tampão fosfato, composto por Na₂HPO₄ (0,25mol/L)/KH₂PO₄ (0,37mol/L), 350µL de ácido tricloroacético (TCA), aferindo-se o volume final com tampão fosfato. Seguiram-se então as etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a outra em membrana Durapore (HAWP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45µm. O filtrado foi injetado, imediatamente, no cromatógrafo a líquido (100µL).

O ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com 90% de solução acidificada (SA:0,166mol/L de ácido acético e 0,01mol/L de hidróxido de potássio, a pH 2,8), e 10% de acetonitrila (ACN)(v/v) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de SA e 24% de ACN, mantendo-se essa proporção até 9,0 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 10 minutos, antes da próxima injeção. A detecção foi feita em detector de arranjo

de diodos (DAD), utilizando-se o comprimento de onda de leitura a 290nm. A identificação da vitamina foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, co-cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção obtidos no DAD. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação do ácido fólico foi feita por padronização externa, através da curva analítica construída com 7 níveis de concentração (0,01; 0,05; 0,10; 0,15;

0,30; 0,50; 1µg/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

Validação da metodologia

Testes de recuperação e repetibilidade foram realizados com as amostras analisadas neste trabalho, uma vez que a metodologia sofreu algumas modificações em relação ao método original. Limites de detecção e quantificação também foram determinados para essa nova matriz.

Tabela 1. Taxas de recuperação do padrão de ácido fólico adicionado em dois diferentes níveis de concentração à margarina.

Produto	Nível I (µg/g)	Recuperação (%)	Nível II (µg/g)	Recuperação (%)
Margarina	0,8	94 ± 1	1,5	97 ± 2

Os resultados são médias de 5 determinações para cada nível avaliado.

Tabela 2. Repetibilidade do ácido fólico adicionado a pão, farinha e margarina, em 2 diferentes níveis de concentração.

Alimento	Concentração Nível I (µg/g)	Repetibilidade (r)	Concentração Nível II (µg/g)	Repetibilidade (r)
Margarina	1,443	0,56	0,749	0,33
	1,433		0,759	
	1,433		0,766	
	1,472		0,761	
	1,461		0,766	
Média dos valores	1,45 ± 0,02		0,760 ± 0,007	
Limite de confiança de 95% (t= 2,78),				

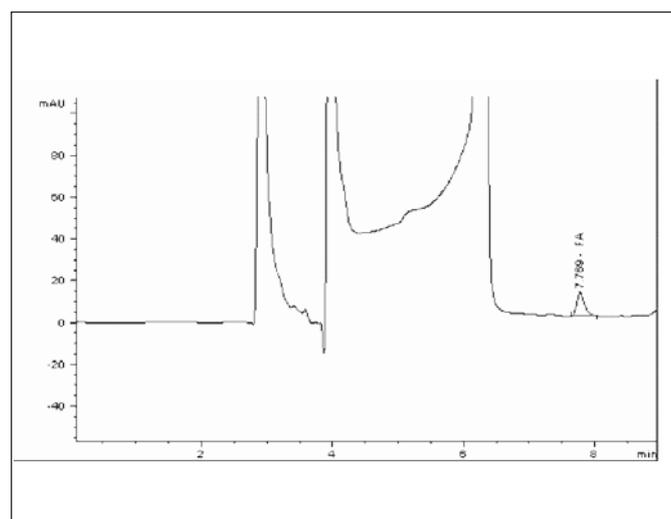


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato de margarina enriquecida com ácido fólico. Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5mm, 150X4.6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de solução acidificada no início da corrida, chegando em 8.5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de solução acidificada (v/v), mantendo-se as condições até 9.0 minutos. Vazão de 0.5 mL/ minuto. Detecção a 290nm.

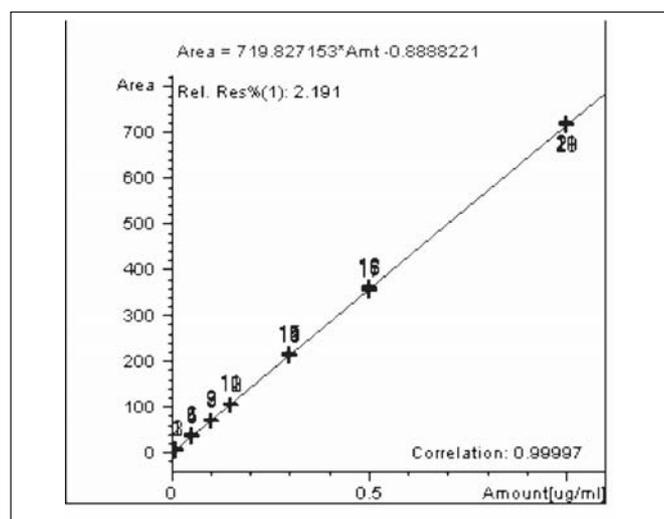


Figura 2. Curva analítica do ácido fólico, obtida por padronização externa, traçada com média de triplicatas.

Tabela 3. Teores de ácido fólico em margarina enriquecida durante estocagem.

Lotes/Data de fabricação	Concentração de ácido fólico(µg/g)			
	Após a fabricação		Após estocagem	
	M±DP	CV(%)	M±P	CV(%)
1	0,91±0,01	1	0,44±0,01	6
2	0,84±0,02	2	0,39±0,01	2
3	0,79±0,01	1	0,45±0,03	2
M ± DP	0,85±0,06	7	0,43±0,05	13

M ± DP – média e estimativa do desvio padrão das determinações em duplicatas. CV – coeficiente de variação.

Recuperação de Padrões

Para a avaliação da exatidão do método, foram realizados testes de recuperação de padrões adicionados aos produtos não enriquecidos, em dois níveis diferentes de concentração 1,5 e 0,8µg/g. Esses valores foram escolhidos de acordo com o teor de ácido fólico declarado no rótulo 1,12µg/g. Para as análises foi utilizado 1,0g de margarina.

Repetibilidade

A avaliação desse parâmetro foi realizada através de dez determinações, nos dois níveis de concentração de ácido fólico adicionado à matriz. A repetibilidade foi calculada de acordo com Caucutt e Boddy² através da equação:

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

r = repetibilidade
sr = estimativa do desvio padrão
t = t de Student

Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção foram estimados pela adição de quantidades conhecidas de padrão às amostras. Foi considerado o limite de detecção a menor quantidade detectável na matriz que produziu um sinal com uma amplitude três vezes maior que a do ruído (3S/R). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação da metodologia

A metodologia foi validada para a margarina, produto com alto teor de gordura, verificando-se as taxas de recuperação e repetibilidade para as amostras analisadas neste trabalho.

As taxas de recuperação obtidas estão apresentadas na Tabela 1. Os valores variaram entre 94 e 97% nos dois níveis de enriquecimento. As taxas de recuperação aqui obtidas são superiores aos relatados por Konings¹² e Osseyi et al.¹⁶ que obtiveram níveis de recuperação de ácido fólico de 90% para farinha e 93% para cereais. Esses valores indicam uma boa taxa de recuperação para os níveis vitamínicos presentes nos alimentos enriquecidos aqui analisados.

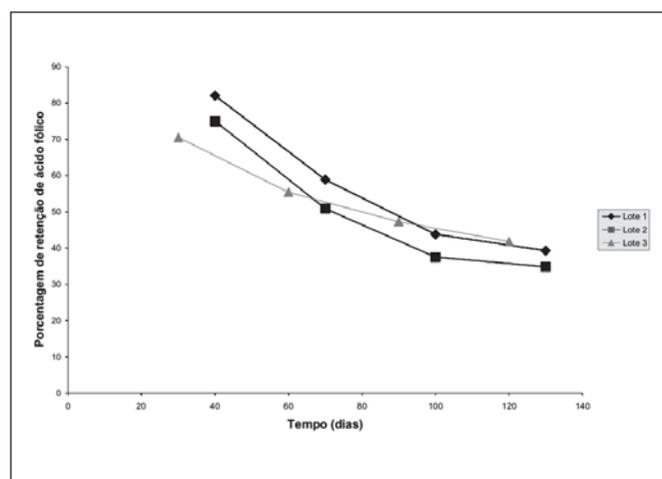


Figura 3. Perfil da degradação de ácido fólico em margarina enriquecida.

A Tabela 2 apresenta as faixas de repetibilidade esperadas entre cinco determinações, em duplicata, de ácido fólico, em dois diferentes níveis de concentração. Desta forma, espera-se que valores fornecidos por determinações em duplicata difiram dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada.

Observou-se que a maior diferença, entre os valores obtidos nas 5 determinações, nos dois níveis de enriquecimento, são menores que o valor de “r” calculado, comprovando a boa repetibilidade do método, quando aplicado à matriz estudada.

O limite de detecção obtido foi 1,3µg/g, sendo, portanto, considerado o limite de quantificação de 2,6µg/g. Os valores foram os mesmos obtidos por Catharino e Godoy⁵ e Konings¹² que determinaram esses parâmetros em leites enriquecidos.

Etapa Analítica

A Figura 1 apresenta o cromatograma referente à avaliação de ácido fólico em amostras de margarina. Nele, o pico do ácido fólico aparece isolado, com tempo de retenção de aproximadamente 8 minutos. A pureza dos picos foi verificada através dos parâmetros de pureza, fornecidos pelo software HP-Chemstation, que confirmou a eficiência do sistema cromatográfico.

Os teores de ácido fólico foram avaliados por padronização externa, tendo a curva analítica apresentado boa linearidade nas faixas de concentração pré-estabelecidas. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,99997 (Figura 2).

Na Tabela 3 estão os teores encontrados nas amostras de margarina recém fabricadas e após 4 meses de estocagem. Os valores iniciais (0,85µg/g, em média) já se apresentavam abaixo do declarado no rótulo do produto (1,12µg/g). Verificou-se que a taxa de retenção média ficou em torno de 39%. A Figura 2 ilustra a porcentagem de retenção do ácido fólico na margarina durante os 4 meses de estocagem. A instabilidade observada pode ser devida aos processos oxidativos decorrentes da matriz lipídica que, segundo, Gregory⁹ e Hawkes e Villota¹⁰, seriam os principais responsáveis pela degradação do ácido fólico. Não foi encontrado na literatura nenhum artigo a respeito da adição de ácido fólico em qualquer produto com altos teores de gordura, para fins de comparação.

CONCLUSÕES

O método avaliado mostrou-se apropriado para a determinação do ácido fólico em um alimento gorduroso como a margarina, como demonstram a alta recuperação e a repetibilidade, assim como, os limites de detecção e quantificação alcançados.

Os testes conduzidos com a margarina enriquecida durante a estocagem demonstraram que em um período de quatro meses, mais da metade da vitamina desapareceu, não sendo recomendado, portanto, esse alimento como um bom veículo para o enriquecimento.

REFERÊNCIAS

1. Augustin, J., Tassinari, P.D, Fellman, J.K., et al. B vitamin content of selected cereals and baked products. **Cer. Foods World**, 27(4): 159-161, 1982.
2. Calcutt, R., Brody, R. **Statistic for Analytical Chemists**. 1ed. Londres, 1983.
3. Carvalho, P. R. N. **Enriquecimento de Alimentos**. Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1-7, 1994.
4. Carvalho, P.R.N. **Estudos de vida-de-prateleira de Alimentos Enriquecidos**. Segundo seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 5-8, 1996.
5. Catharino, R. R., Visentainer, J.V., Godoy, H. T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciênc. Tecnol. Alimen.**, 23(3): 389-395, 2003.
6. Daly, S. et al. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet.**, 350(9092): 1666-1669, 1997.
7. Devlin, T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. Ed. Edgard Blücher, 1ed., 1997, 527p.
8. Green, J.M. 1996. A practical Guide to Analytical Method Validation. **Anal. Chem.**, 68, 1197-1203.
9. Gregory III, J. F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Adv. Food Nutr. Res.**, 33: 1-101, 1989.
10. Hawkes, J. G., Villota, R. Foliates in Foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. **Food Sci. Nutr.**, 28 (6): 439-538, 1989.
11. Katzung, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. São Paulo: Guanabara Koogans, 5ed, 1994, 295p.
12. Konings, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. **JAOAC Inter.**, 82(1): 119-127, 1999.
13. Malinow, M. R. et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary disease. **New Engl. J. Med.**, 338(15): 1009-1015, 1998.
14. Maxwell, D. P. E. Cost-control implications of nutrients fortification. **Prep. Food**, 87-88, 1990.
15. Moshfegh, A. J. et al. **Folate intakes**. Food Surv. Res. Group. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.
16. Osseyi, E. S., Wehling, R. L., Albrecht, J. A. Liquid chromatographic method for determination added folic acid in fortified cereal products. **J. Chromatogr. A**, 826(2): 235-240, 1998.
17. Ranum, P. **Cereal enrichment**. In: Handbook of Cereals Science and Technology. Ed. Lowrenz, New York, 882, 1991.
18. Tsai, M. Y. et al. Genetic cause of mild hiperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery disease. **Atherosc.**, 143: 163-165, 1999.
19. Walter, P. Vitamin requirements and enrichment of foods. **Food Chem.**, 49: 113-117, 1994.