UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e
avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos

Elaine Cristina Pinto Moreschi

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof.Dra. Lígia B. de Almeida Muradian

São Paulo
2006

Elaine Cristina Pinto Moreschi

Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e
avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Lígia Bicudo de Almeida Muradian
orientador/presidente

Profa. Dra. Myrna Sabino

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho

São Paulo, 05 de outubro de 2006.

Às minhas filhas Nathalia e Ana Luiza
Aos meus pais Clóvis e Marlene

Agradecimentos

À Prof^a Dr^a Ligia Bicudo de Almeida-Muradian, pela orientação segura, apoio e amizade durante todo o percurso do desenvolvimento deste trabalho.

À Nestlé Brasil Ltda. pela disponibilização da infra-estrutura necessária às análises realizadas, em especial à Rosângela Gorni e Donizeti Cezari.

À amiga Sonia Salcedo pelo apoio.

À Meire e Érika que sempre estiveram presentes nas necessidades.

À Ana Elisa, que caminhou comigo durante todo este trabalho.

À minha irmã Érica, sempre pronta a me auxiliar nos levantamentos bibliográficos.

Aos amigos e colegas do Centro Nestlé de Garantia da Qualidade que, de uma forma ou de outra, participaram deste trabalho.

**“Tudo o que temos que decidir é o que fazer com o
tempo que nos é dado”.**

J.R.R.Tolkien

SUMÁRIO

Resumo.....	XIX
Abstract.....	XX
Introdução.....	1

Capítulo 1: Validação de Métodos Analíticos

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO.....	9
2.1. Campo de Aplicação.....	9
2.2. Especificidade e Seletividade.....	9
2.3. Faixa de Trabalho e Faixa Linear de Trabalho.....	10
2.4. Linearidade.....	10
2.5. Sensibilidade.....	11
2.6. Limite de Detecção.....	11
2.7. Limite de Quantificação.....	12
2.8. Exatidão e Tendência.....	12
2.9. Precisão.....	13
2.10. Robustez.....	14
2.11. Incerteza de Medição.....	15
3. OBJETIVO.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Material.....	16
4.2. Métodos.....	16
4.2.1. Campo de aplicação.....	17
4.2.2. Linearidade.....	17
4.2.3. Faixa de trabalho.....	17
4.2.4. Sensibilidade.....	17
4.2.5. Precisão.....	17
4.2.6. Exatidão.....	18
4.2.7. Limite de detecção e quantificação.....	18

4.2.8. Especificidade e seletividade.....	18
4.2.9. Robustez.....	19
4.2.10. Incerteza da Medida.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

Capítulo 2: Vitaminas B1, B2, B6 e PP

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	26
3. FUNÇÕES BIOQUÍMICAS.....	30
4. INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA.....	34
5. DEFICIÊNCIA.....	37
6. FONTES NATURAIS.....	41
7. MÉTODOS DE ANÁLISE DE VITAMINAS EM ALIMENTOS.....	44
8. OBJETIVO.....	55
9. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
9.1. Material.....	55
9.1.1. Amostras.....	55
9.1.2. Reagentes e Outros Materiais.....	55
9.1.3. Equipamentos.....	56
9.2. Métodos.....	57
9.2.1. Preparação da amostra.....	57
9.2.2. Extração das vitaminas.....	58
9.2.2.1. Métodos cromatográficos.....	58
9.2.2.2. Métodos microbiológicos.....	58
9.2.3. Condições experimentais.....	59
9.2.3.1. Métodos cromatográficos.....	59
9.2.3.2. Métodos microbiológicos.....	62
10. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
10.1. Campo de aplicação.....	68
10.2. Linearidade.....	68

10.3. Faixa de Trabalho e Faixa Linear de Trabalho.....	72
10.4. Sensibilidade.....	73
10.5. Precisão.....	74
10.6. Exatidão.....	76
10.7. Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	79
10.8. Especificidade e Seletividade.....	79
10.9. Robustez.....	87
10.10. Incerteza da medida.....	93
10.10.1. Vitamina B ₁	98
10.10.2. Vitamina B ₂	107
10.10.3. Vitamina B ₆	115
10.10.4. Vitamina PP.....	123
11. CONCLUSÕES.....	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133

Capítulo 3: Estabilidade de Vitaminas nos Alimentos

1. INTRODUÇÃO.....	137
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	139
3. OBJETIVO.....	141
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	141
4.1. Material.....	141
4.2. Métodos.....	142
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	143
5.1. Vitamina B ₁	143
5.2. Vitamina B ₂	149
5.3. Vitamina B ₆	155
5.4. Vitamina PP.....	160
6. CONCLUSÕES.....	165
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167

Capítulo 4: Ácido Pantotênico

1.	INTRODUÇÃO.....	169
2.	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	169
3.	FUNÇÕES BIOQUÍMICAS.....	171
4.	INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA.....	174
5.	DEFICIÊNCIA.....	175
6.	FONTES NATURAIS.....	176
7.	MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÁCIDO PANTOTÊNICO EM ALIMENTOS.....	177
8.	OBJETIVO.....	181
9.	MATERIAL E MÉTODOS.....	181
9.1.	Material.....	181
9.1.1.	Amostras.....	181
9.1.2.	Reagentes e Outros Materiais.....	181
9.1.3.	Equipamentos.....	182
9.2.	Métodos.....	182
9.2.1.	Preparação da amostra.....	182
9.2.2.	Extração da vitamina.....	182
9.2.2.1.	Método cromatográfico.....	182
9.2.2.2.	Método microbiológico.....	183
9.2.3.	Condições experimentais.....	183
9.2.3.1.	Condições cromatográficas.....	183
9.2.3.2.	Método microbiológico.....	183
10.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	184
10.1.	Campo de aplicação.....	185
10.2.	Linearidade.....	185
10.3.	Faixa de trabalho e Faixa Linear de Trabalho.....	187
10.4.	Sensibilidade.....	187
10.5.	Precisão.....	187
10.6.	Exatidão.....	188
10.7.	Limite de detecção e quantificação.....	189
10.8.	Especificidade e Seletividade.....	189

11. CONCLUSÕES.....	191
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	192

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Validação de Métodos Analíticos

Tabela 1.1: Parâmetros de validação de métodos normalizados e não normalizados.....	8
Tabela 1.2: Exemplo de tabela para cálculo da incerteza.....	20

Capítulo 2: Vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP

Tabela 2.1: Resumo das características físico-químicas das vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP.....	29
Tabela 2.2: Resumo das formas ativas e funções bioquímicas das vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP.....	33
Tabela 2.3: Valores de IDR em alguns países desenvolvidos.....	35
Tabela 2.4: Valores de IDR utilizados para declaração nutricional pela Legislação Brasileira.....	36
Tabela 2.5: Resumo das doenças e principais sintomas associados à deficiência de vitaminas.....	40
Tabela 2.6: Teor de vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP em alimentos.....	43
Tabela 2.7: Microrganismos utilizados nas análises de vitaminas por método microbiológico.....	45
Tabela 2.8: Métodos por CLAE para determinação de vitaminas em alimentos.....	50
Tabela 2.9: Condições cromatográficas para determinação de vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP.....	61
Tabela 2.10: Dados médios obtidos no estudo de linearidade das vitaminas B ₁ e B ₂	68
Tabela 2.11: Dados obtidos no estudo de linearidade dos vitâmeros da vitamina B ₆	69

Tabela 2.12: Dados obtidos no estudo de linearidade para niacina e niacinamida	70
Tabela 2.13: Faixa de trabalho para vitamina B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP.....	73
Tabela 2.14: Valores de sensibilidade obtidos para cada vitâmero.....	73
Tabela 2.15: Desvio padrão e limite de repetibilidade para as vitaminas analisadas em cereais.....	74
Tabela 2.16: Desvio padrão e limite de repetibilidade para as vitaminas analisadas.....	75
Tabela 2.17: Resultados obtidos em análise de materiais de referência.....	76
Tabela 2.18: Resultados de recuperação de padrão em cereais para vitaminas B ₁ e B ₂	77
Tabela 2.19: Resultados de recuperação de padrão em cereais para vitâmeros da vitamina B ₆	78
Tabela 2.20: Resultados de recuperação de padrão em cereais para vitamina PP (niacinamida).....	78
Tabela 2.20: Limite de detecção e quantificação do método para as vitaminas estudadas.....	79
Tabela 2.21: Resultados de vitamina B ₁ e B ₂ obtidos por dois métodos cromatográficos.....	80
Tabela 2.22: Resultados de vitamina B ₆ e PP obtidos pelo método cromatográfico e microbiológico.....	84
Tabela 2.23: Resultados da avaliação de especificidade do método proposto.....	87
Tabela 2.24: Fatores e respectivos valores utilizados para determinação da robustez do método para leite em pó/fórmulas infantis e bebidas instantâneas.....	87
Tabela 2.25: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método para leite em pó/fórmulas infantis e valores obtidos para cada combinação estudada.....	88
Tabela 2.26: Efeitos calculados para cada fator estudado na matriz de leite em pó/fórmulas infantis para as vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP.....	88
Tabela 2.27: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método para bebidas instantâneas e valores obtidos para cada combinação estudada.....	89

Tabela 2.28: Efeitos calculados para cada fator estudado na matriz de bebida instantânea para as vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP.....	89
Tabela 2.29: Fatores e respectivos valores utilizados para determinação da robustez do método para cereais.....	90
Tabela 2.30: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método para cereais e valores obtidos para cada combinação estudada.....	91
Tabela 2.31: Efeitos calculados para cada fator estudado na matriz de cereais para as vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP.....	92
Tabela 2.32: Incerteza proveniente da preparação das soluções de calibração.....	98
Tabela 2.33: Valores de incerteza da exatidão para as matrizes estudadas nos diferentes níveis de concentração.....	100
Tabela 2.34: Cálculo da incerteza da vitamina B ₁ para leite em pó/fórmula infantil no nível 1 de concentração.....	101
Tabela 2.35: Cálculo da incerteza da vitamina B ₁ para leite em pó/fórmula infantil no nível 2 de concentração.....	102
Tabela 2.36: Cálculo da incerteza da vitamina B ₁ para bebida instantânea no nível 1 de concentração.....	103
Tabela 2.37: Cálculo da incerteza da vitamina B ₁ para bebida instantânea no nível 2 de concentração.....	104
Tabela 2.38: Cálculo da incerteza da vitamina B ₁ para cereais no nível 1 de concentração.....	105
Tabela 2.39: Cálculo da incerteza da vitamina B ₁ para cereais no nível 2 de concentração.....	106
Tabela 2.40: Resumo dos valores de incerteza encontrados para vitamina B ₁ nas diferentes matrizes em diferentes níveis de concentração estudados.....	107
Tabela 2.41: Incerteza proveniente da preparação das soluções de calibração.....	108
Tabela 2.42: Valores de incerteza da exatidão para as matrizes estudadas nos diferentes níveis de concentração.....	108
Tabela 2.43: Cálculo da incerteza da vitamina B ₂ para leite em pó/fórmula infantil no nível 1 de concentração.....	109

Tabela 2.44: Cálculo da incerteza da vitamina B ₂ para leite em pó/fórmula infantil no nível 2 de concentração.....	110
Tabela 2.45: Cálculo da incerteza da vitamina B ₂ para bebida instantânea no nível 1 de concentração.....	111
Tabela 2.46: Cálculo da incerteza da vitamina B ₂ para bebida instantânea no nível 2 de concentração.....	112
Tabela 2.47: Cálculo da incerteza da vitamina B ₂ para cereais no nível 1 de concentração.....	113
Tabela 2.48: Cálculo da incerteza da vitamina B ₂ para cereais no nível 2 de concentração.....	114
Tabela 2.49: Resumo dos valores de incerteza encontrados para vitamina B ₂ nas diferentes matrizes em diferentes níveis de concentração estudados.....	115
Tabela 2.50: Incerteza proveniente da preparação das soluções de calibração.....	116
Tabela 2.51: Valores de incerteza da exatidão para as matrizes estudadas nos diferentes níveis de concentração.....	116
Tabela 2.52: Cálculo da incerteza da vitamina B ₆ para leite em pó/fórmula infantil no nível 1 de concentração.....	117
Tabela 2.53: Cálculo da incerteza da vitamina B ₆ para leite em pó/fórmula infantil no nível 2 de concentração.....	118
Tabela 2.54: Cálculo da incerteza da vitamina B ₆ para bebida instantânea no nível 1 de concentração.....	119
Tabela 2.55: Cálculo da incerteza da vitamina B ₆ para bebida instantânea no nível 2 de concentração.....	120
Tabela 2.56: Cálculo da incerteza da vitamina B ₆ para cereais no nível 1 de concentração.....	121
Tabela 2.57: Cálculo da incerteza da vitamina B ₆ para cereais no nível 2 de concentração.....	122
Tabela 2.58: Resumo dos valores de incerteza encontrados para vitamina B ₆ nas diferentes matrizes em diferentes níveis de concentração estudados.....	123
Tabela 2.59: Incerteza proveniente da preparação das soluções de calibração.....	124

Tabela 2.60: Valores de incerteza da exatidão para as matrizes estudadas nos diferentes níveis de concentração.....	124
Tabela 2.61: Cálculo da incerteza da vitamina PP para leite em pó/fórmula infantil no nível 1 de concentração.....	125
Tabela 2.62: Cálculo da incerteza da vitamina PP para leite em pó/fórmula infantil no nível 2 de concentração.....	126
Tabela 2.63: Cálculo da incerteza da vitamina PP para bebida instantânea no nível 1 de concentração.....	127
Tabela 2.64: Cálculo da incerteza da vitamina PP para bebida instantânea no nível 2 de concentração.....	128
Tabela 2.65: Cálculo da incerteza da vitamina PP para cereais no nível 1 de concentração.....	129
Tabela 2.66: Cálculo da incerteza da vitamina PP para cereais no nível 2 de concentração.....	130
Tabela 2.67: Resumo dos valores de incerteza encontrados para vitamina PP nas diferentes matrizes em diferentes níveis de concentração estudados.....	131

Capítulo 3: Estabilidade de Vitaminas nos Alimentos

Tabela 3.1: Resumo da estabilidade de vitaminas.....	138
Tabela 3.2: Condições de armazenagem das amostras para estudo de estabilidade das vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ , PP e ácido pantotênico.....	142
Tabela 3.3: Resultados de vitamina B ₁ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para leite em pó/fórmulas infantis.....	143
Tabela 3.4: Resultados da vitamina B ₁ durante o período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para bebida instantânea.....	145

Tabela 3.5: Resultados da vitamina B ₁ durante o período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para cereais.....	146
Tabela 3.6: Resumo dos resultados obtidos para as diferentes matrizes estudadas nas diferentes condições de estocagem.....	148
Tabela 3.7: Resultados de vitamina B ₂ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para leite em pó/fórmulas infantis.....	149
Tabela 3.8: Resultados da vitamina B ₂ durante o período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para bebida instantânea.....	151
Tabela 3.9: Resultados da vitamina B ₂ durante o período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para cereais.....	152
Tabela 3.10: Resumo dos resultados de vitamina B ₂ obtidos para as diferentes matrizes estudadas nas diferentes condições de estocagem.....	154
Tabela 3.11: Resultados de vitamina B ₆ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para leite em pó/fórmulas infantis.....	155
Tabela 3.12: Resultados de vitamina B ₆ durante o período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para bebida instantânea.....	156
Tabela 3.13: Resultados de vitamina B ₆ durante o período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para cereais.....	158
Tabela 3.14: Resumo dos resultados de vitamina B ₆ obtidos para as diferentes matrizes estudadas nas diferentes condições de estocagem.....	159
Tabela 3.15: Resultados de vitamina PP durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para leite em pó/fórmulas infantis.....	160

Tabela 3.16: Resultados de vitamina PP durante o período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para bebida instantânea.....	161
Tabela 3.17: Resultados de vitamina PP durante o período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para cereais.....	163
Tabela 3.18: Resumo dos resultados de vitamina PP obtidos para as diferentes matrizes estudadas nas diferentes condições de estocagem.....	164

Capítulo 4: Ácido Pantotênico

Tabela 4.1: Teor de ácido pantotênico em alimentos.....	176
Tabela 4.2: Métodos de determinação de ácido pantotênico por CLAE.....	179
Tabela 4.3: Condições cromatográficas para determinação de ácido pantotênico.....	183
Tabela 4.4: Gradiente utilizado para determinação de ácido pantotênico por CLAE.....	184
Tabela 4.5: Resultados médios obtidos no estudo de linearidade do método de análise de ácido pantotênico.....	185
Tabela 4.6: Desvio padrão e limite de repetibilidade para leite/fórmula infantil em pó.....	187
Tabela 4.7: Resultados obtidos em análise de materiais de referência.....	188
Tabela 4.8: Resultados de ácido pantotênico pelo método CLAE e microbiológico.....	190
Tabela 4.9: Resultados da avaliação de especificidade do método proposto.....	190

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2: Vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP

Figura 2.1: Estrutura dos vitâmeros das vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP.....	27
Figura 2.2: Evolução do quadro de deficiência de vitaminas	38
Figura 2.3: Sistema cromatográfico utilizado para determinação simultânea das vitaminas B ₁ e B ₂	57
Figura 2.4: Sistema cromatográfico utilizado para determinação de vitamina PP.....	57
Figura 2.5: Cromatogramas característicos da vitamina B ₁	64
Figura 2.6: Cromatogramas característicos da vitamina B ₂	65
Figura 2.7: Cromatogramas característicos da vitamina B ₆	66
Figura 2.8: Cromatogramas característicos da vitamina PP.....	67
Figura 2.9: Gráficos de linearidade e variação de resposta com a massa injetada das vitaminas B ₁ e B ₂	71
Figura 2.10: Gráfico de linearidade e variação de resposta com a massa injetada dos vitâmeros da vitamina B ₆	71
Figura 2.11: Gráfico de linearidade e variação de resposta com a massa injetada dos vitâmeros da vitamina PP.....	72
Figura 2.12: Representação gráfica dos valores de z-Score obtidos para média dos resultados dos materiais de referência para cada vitamina estudada.....	77
Figura 2.13: Gráficos mostrando os dados de comparação de métodos para vitamina B ₁	81
Figura 2.14: Gráficos mostrando os dados de comparação de métodos para vitamina B ₂	82
Figura 2.15: Gráficos mostrando os dados de comparação de métodos para vitamina B ₆	85
Figura 2.16: Gráficos mostrando os dados de comparação de métodos para vitamina PP.....	86

Figura 2.17: Fluxograma do método de análise de vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP por cromatografia a líquido de alta eficiência.....	93
Figura 2.18: Diagrama de causa e efeito baseado na equação de cálculo dos teores de vitamina pelo método cromatográfico proposto.....	95
Figura 2.19: Diagrama de causa e efeito refinado.....	97
Figura 2.20: Gráfico representando a incerteza relativa da vitamina B ₁ para leite/fórmula infantil em pó, nível de concentração 0,37mg/100g.....	101
Figura 2.21: Gráfico representando a incerteza relativa da vitamina B ₁ para leite/fórmula infantil em pó, nível de concentração 0,77mg/100g.....	102
Figura 2.22: Gráfico representando a incerteza relativa da vitamina B ₁ para bebida instantânea no nível de concentração 1,21mg/100g.....	103
Figura 2.23: Gráfico representando a incerteza relativa da vitamina B ₁ para bebida instantânea no nível de concentração 2,49mg/100g.....	104
Figura 2.24: Gráfico representando a incerteza relativa da vitamina B ₁ para cereais no nível de concentração 0,49mg/100g.....	105
Figura 2.25: Gráfico representando a incerteza relativa da vitamina B ₁ para cereais no nível de concentração 1,63mg/100g.....	106
Figura 2.26: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₂ para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 1,28 mg/100g.....	109
Figura 2.27: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₂ para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 1,41 mg/100g.....	110
Figura 2.28: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₂ para bebida instantânea no nível de concentração de 2,23 mg/100g.....	111
Figura 2.29: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₂ para bebida instantânea no nível de concentração de 3,81 mg/100g.....	112
Figura 2.30: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₂ para cereais no nível de concentração de 0,49 mg/100g.....	113

Figura 2.31: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₂ para cereais no nível de concentração de 1,63 mg/100g.....	114
Figura 2.32: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₆ para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 0,40 mg/100g.....	117
Figura 2.33: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₆ para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 0,77 mg/100g.....	118
Figura 2.34: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₆ para bebida instantânea no nível de concentração de 3,09 mg/100g.....	119
Figura 2.35: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₆ para bebida instantânea no nível de concentração de 4,13 mg/100g.....	120
Figura 2.36: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₆ para cereais no nível de concentração de 0,84 mg/100g.....	121
Figura 2.37: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₆ para cereais no nível de concentração de 1,87 mg/100g.....	122
Figura 2.38: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 3,86 mg/100g.....	125
Figura 2.39: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 6,30 mg/100g.....	126
Figura 2.40: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para bebida instantânea no nível de concentração de 18,88 mg/100g.....	127
Figura 2.41: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para bebida instantânea no nível de concentração de 28,40 mg/100g.....	128

Figura 2.42: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para cereais no nível de concentração de 10,40 mg/100g.....	129
Figura 2.43: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para cereais no nível de concentração de 17,58 mg/100g.....	130
Figura 2.31: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B ₂ para cereais no nível de concentração de 1,63 mg/100g.....	114

Capítulo 3: Estabilidade de Vitaminas nos Alimentos

Figura 3.1: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₁ durante a vida de prateleira de leite em pó/fórmula infantil em diferentes condições de estocagem.....	144
Figura 3.2: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₁ durante a vida de prateleira de bebida instantânea em diferentes condições de estocagem.....	145
Figura 3.3: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₁ durante a vida de prateleira de cereais em diferentes condições de estocagem.....	147
Figura 3.4: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₂ durante a vida de prateleira de leite em pó/fórmula infantil em diferentes condições de estocagem.....	150
Figura 3.5: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₂ durante a vida de prateleira de bebida instantânea em diferentes condições de estocagem.....	151
Figura 3.6: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₂ durante a vida de prateleira de cereal em diferentes condições de estocagem.....	153

Figura 3.7: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₆ durante a vida de prateleira de leite em pó/fórmula infantil em diferentes condições de estocagem.....	156
Figura 3.8: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₆ durante a vida de prateleira de bebida instantânea em diferentes condições de estocagem.....	157
Figura 3.9: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₆ durante a vida de prateleira de cereal em diferentes condições de estocagem.....	158
Figura 3.10: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina PP durante a vida de prateleira de leite em pó/fórmula infantil em diferentes condições de estocagem.....	161
Figura 3.11: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina PP durante a vida de prateleira de bebida instantânea em diferentes condições de estocagem.....	162
Figura 3.12: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina PP durante a vida de prateleira de cereal em diferentes condições de estocagem.....	163

Capítulo 4: Ácido Pantotênico

Figura 4.1: Estrutura química do ácido pantotênico.....	169
Figura 4.2: Estrutura do pantotenato de cálcio.....	170
Figura 4.3: Síntese da CoA a partir do ácido pantotênico.....	173
Figura 4.4: Gráficos de linearidade e variação de resposta com a massa injetada de pantotenato de cálcio em unidades de área e altura.....	186
Figura 4.5: Variação da dispersão dos dados de resposta de padrão em área e altura de pico.....	186
Figura 4.6: Gráfico dos valores de z-Score dos resultados obtidos em materiais de referência para ácido pantotênico.....	188

Figura 4.7: Gráfico das diferenças e da correlação entre resultados de ácido pantotênico obtidos pelo método microbiológico e CLAE.....191

Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos

Resumo

A adição de vitaminas aos produtos industrializados tornou-se prática comum para as indústrias de alimentos e os teores adicionados devem obedecer à legislação brasileira durante toda a vida de prateleira dos produtos. Sabendo da sensibilidade das vitaminas a fatores como oxigênio, luz e calor, é essencial conhecer o comportamento destes compostos no alimento frente aos fatores críticos. Informações confiáveis sobre teores de vitaminas somente podem ser obtidas com métodos analíticos validados. Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método de análise para vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP em leite em pó/fórmulas infantis, cereais e bebidas instantâneas por cromatografia líquida de alta eficiência com uma única etapa de extração que apresentou recuperações de 90 a 120% dependendo do teor e da matriz analisada. Após a validação do método analítico, foi avaliada a estabilidade das vitaminas em amostras submetidas a diferentes condições de estocagem durante 10 meses. Os resultados mostram que a principal causa de perda das vitaminas B₂ e B₆ é a exposição à luz, que pode ser agravada pela temperatura e/ou presença de oxigênio no meio, enquanto as vitaminas PP e B₁ mostraram-se bem estáveis sob as diferentes condições e no tempo estudado.

Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos

Abstract

Food fortification with vitamins is a very common practice in food industry and the added content must be in compliance with Brazilian Legislation during the whole product shelf life. Due to the vitamins sensibility to light, temperature and oxygen it's necessary to know the behavior of these compounds when submitted to these critical conditions. Trustful information about the vitamins content just can be obtained from validated analytical methods. In this work it was developed and validated a HPLC method for determination of vitamins B₁, B₂, B₆ e PP in milk/infant formula, cereals and beverage powders with the same extract which presented recoveries within 90 and 120% depending on the matrix and the vitamins level. After method validation, the vitamins stability in different samples was evaluated during 10 months under different storage conditions. The results showed the high sensitivity of vitamins B₂ and B₆ to light exposure that can become worse when samples were exposed to high temperature and oxygen. Vitamins PP and B₁ had very stable behavior under the studied conditions and for the period of this study.

INTRODUÇÃO

Por muito tempo, o valor nutritivo dos alimentos foi determinado pela proporção de gordura, proteína, carboidratos e sais minerais. Essa idéia manteve-se até aproximadamente o início do século XX, quando se percebeu que a introdução de determinados alimentos na dieta eliminava diversos sintomas de doenças (BOBBIO, 1989).

Os primeiros estudos relacionaram o escorbuto à falta de frutas e vegetais frescos, a presença do beribéri à ausência de arroz integral na dieta de frangos e a ingestão de óleo de fígado de bacalhau à cura do raquitismo. Esses estudos também mostraram que a presença de determinadas substâncias químicas nesses alimentos era responsável pela cura de várias doenças; essas substâncias foram denominadas, de maneira geral, de vitaminas (BOBBIO, 1989).

Vários compostos com atividade vitamínica são hoje conhecidos e poucas são as semelhanças entre eles, embora de forma geral estejam divididos em dois grupos de acordo com sua solubilidade: vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e vitaminas hidrossolúveis (C, B₁, B₂, B₅ ou ácido pantotênico, B₆, B₁₂, PP ou niacina, ácido fólico, biotina, inositol e colina). A solubilidade das vitaminas é muito importante, pois afeta sua absorção no intestino e nos tecidos (BALL, 1998; BOBBIO, 1989).

A atividade biológica de cada vitamina pode ser atribuída a um ou vários compostos diferentes conhecidos como vitâmeros. Além dos vitâmeros, algumas vitaminas apresentam precursores ou pró-vitaminas, que são substâncias naturais convertidas em vitaminas pelo metabolismo normal do organismo (BALL, 1998).

Com exceção das vitaminas D, K e niacina, todas as demais devem ser ingeridas na dieta, pois não são sintetizadas pelo organismo. Mesmo para aquelas que o organismo é capaz de sintetizar, a ingestão é essencial, pois a quantidade sintetizada não é suficiente para atingir os teores necessários para seu bom funcionamento (BALL, 1998).

Devido à grande importância das vitaminas no metabolismo humano e ao aumento do consumo de alimentos processados, a adição de vitaminas aos

alimentos ganhou grande impulso. Cinco são os objetivos desta adição (BALL, 1998):

1. Restauração: recolocação total ou parcial de uma ou mais vitaminas perdidas durante o processamento;
2. Fortificação: adição a alimentos considerados carreadores ideais para cada vitamina;
3. Padronização: adição para compensar flutuações dos teores naturais do alimento;
4. Nutrificação: formulação e fabricação de alimentos para substituir refeições;
5. Tecnológicos: adição de vitaminas por funções de processamento específicos.

A Legislação Brasileira, pela Resolução RDC no. 360 de 23 de dezembro de 2003, define como optativa a declaração de vitaminas no rótulo dos produtos comercializados no país. Entretanto, só é permitida a declaração nutricional para vitaminas em quantidade igual ou superior a 5% da ingestão diária recomendada (IDR) por porção indicada no rótulo (BRASIL, 2003).

A indústria alimentícia, buscando atender a demanda dos consumidores por produtos mais saudáveis e nutricionalmente adequados utiliza a adição de vitaminas e sais minerais aos seus produtos para conquistar estes consumidores.

A fim de garantir que os produtos oferecidos aos consumidores atendam a legislação vigente, torna-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos analíticos a fim de determinar o teor natural de vitaminas nos alimentos, eventuais perdas durante o processamento, controle do teor em alimentos adicionados bem como o conhecimento destes teores durante toda vida de prateleira do produto. Os métodos de análise de vitaminas devem ser confiáveis e robustos, reprodutíveis, seletivos e exatos, além de serem capazes de extrair e identificar todos os seus vitâmeros (SHARPLESS, 2000).

Os métodos clássicos de análise de vitaminas são microbiológicos, os quais dependem do crescimento específico de microrganismos selecionados, normalmente bactérias lácticas. Estes métodos baseiam-se na diluição do extrato da amostra em um meio basal contendo todos os requisitos para o

crescimento do microrganismo teste, exceto a vitamina a ser determinada. Após a esterilização do meio contendo a amostra é feita a inoculação com o microrganismo específico e incubação. Completada a incubação, o crescimento do microrganismo é proporcional ao teor de vitamina no extrato e a medida deste crescimento pode ser feita por turbidimetria, densidade óptica, teor de ácido láctico, entre outras, e a quantificação é realizada contra padrão externo (OTTAWAY, 1993).

Os métodos microbiológicos podem ser utilizados para todos os alimentos e podem responder a todos os vitâmeros, dependendo do microrganismo utilizado. Entretanto, é tedioso, demorado e necessita de analistas treinados em análises microbiológicas (OTTAWAY, 1993).

Outras técnicas foram utilizadas para quantificação de vitaminas, como a cromatografia gasosa, cromatografia líquida, eletroforese capilar e métodos bioespecíficos. Dentre estas técnicas, a que mais se destaca é a cromatografia líquida de alta eficiência, também conhecida como CLAE ou HPLC (BALL, 1998).

Para laboratórios de controle de qualidade, responsáveis por verificar o teor de vitaminas nos produtos adicionados disponíveis no mercado, é essencial que os métodos, além de confiáveis e robustos, sejam rápidos e produtivos. Na literatura, encontram-se vários métodos cromatográficos para vitaminas, entretanto, a maioria deles apresenta uma preparação de amostra para cada vitamina a ser analisada, aumentando em muito o tempo para obtenção do resultado de um produto adicionado de várias vitaminas.

Assim sendo, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver, implementar e validar um método analítico para determinação das vitaminas B₁, B₂, B₆, PP e ácido pantotênico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para estudo do comportamento destas vitaminas durante a vida de prateleira em produtos adicionados, expostos a diferentes condições de estocagem. Validou-se um método para determinação de vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP que apresenta etapa única de extração para as quatro vitaminas e determinação cromatográfica simultânea para as vitaminas B₁ e B₂ e que separa e quantifica os três vitâmeros da vitamina B₆ (piridoxol, piridoxal e piridoxamina) e os dois vitâmeros da vitamina PP (ácido nicotínico e nicotinamida).

O ácido pantotênico foi determinado por um método distinto devido às diferentes condições de extração e quantificação desta vitamina.

Este trabalho foi organizado em capítulos para melhor compreensão e avaliação dos resultados obtidos. Os capítulos foram organizados da seguinte maneira:

- Capítulo 1: Validação de métodos analíticos (conceitos e parâmetros de validação de metodologia analítica e o método de validação utilizado no presente trabalho);
- Capítulo 2: Vitaminas B₁, B₂, B₆, PP (revisão de literatura sobre vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP, descrição da metodologia analítica desenvolvida e adaptada a estas vitaminas e dados de validação);
- Capítulo 3: Estabilidade das Vitaminas nos Alimentos (estabilidade das vitaminas B₁, B₂, B₆, PP durante a estocagem de alimentos);
- Capítulo 4: Ácido Pantotênico (revisão de literatura, descrição da metodologia analítica adaptada a esta vitamina e dados de validação).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALL, G. Bioavailability and analysis of vitamins in foods. 1.ed. London: Chapman & Hall, 1998. 416p.

BOBBIO, F.; BOBBIO, P. Introdução à química de alimentos. 2.ed. São Paulo, SP: Varela, 1989. 223p.

BRASIL. Resolução RDC no. 360 de 23 de dezembro de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova regulamento técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília.

OTTAWAY, P.B. The Technology of vitamins in food, 1.ed. London; New York, NY : Blackie Academic & Professional, 1993. 265p.

SHARPLESS, K; MARGOLIS, S.T.J., Determination of vitamins in food-matrix standard reference materials. *Journal of Chromatography A*, v.881, p.171-181, 2000.

CAPÍTULO 1

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

1. INTRODUÇÃO

Com a introdução da norma NBR ISO/IEC 17025, utilizada para acreditação de laboratórios de ensaio, torna-se essencial a demonstração de que os métodos de análise utilizados em um laboratório são apropriados para uso e são validados (ILAC, 2002).

Segundo o dicionário Houaiss, validar significa tornar ou declarar válido, conforme aos preceitos vigentes. Validação é definida como o ato de validar (HOUAISS, 2001).

A validação de um método analítico deve mostrar as características do método e provar que ele é adequado ao seu fim. Conforme definido no documento orientativo do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), validação é a “comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos” (INMETRO, 2003a).

Durante o processo de validação de um método analítico, devem ser estabelecidas suas características de desempenho, suas limitações, possíveis interferentes e para quais matrizes ele pode ser aplicado e com qual desempenho (EURACHEM, 1998).

As características de desempenho de um método são obtidas através da determinação dos parâmetros de validação citados a seguir (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a):

- Campo de aplicação
- Especificidade e seletividade
- Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho
- Linearidade
- Sensibilidade
- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Exatidão e tendência
- Precisão
- Robustez
- Incerteza de medição

Dependendo do método escolhido para uso, não é necessário avaliar todos os parâmetros acima. Para um método normalizado, que é aquele desenvolvido por organismos de normalização ou organizações aceitas tecnicamente, é necessário somente verificar se os dados de validação são adequados ao propósito do laboratório. Os demais métodos, definidos como não normalizados, devem passar por um procedimento de validação integral. A Tabela 1.1 mostra um resumo orientativo para validação dos diferentes tipos de métodos (INMETRO, 2003a).

Tabela 1.1: Parâmetros de validação para métodos normalizados e não normalizados.

Parâmetros	Métodos	
	Normalizados	Não normalizados
Campo de aplicação		X
Especificidade e seletividade	X	X
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	X	X
Linearidade		X
Sensibilidade		X
Limite de detecção	X	X
Limite de quantificação	X	X
Exatidão e tendência	X	X
Precisão	X	X
Robustez		X
Incerteza da medida	X	X

Fonte: INMETRO, 2003a

O processo de validação deve ser efetuado para um novo método, métodos já existentes e revistos para incorporar melhorias ou resolver problemas analíticos e métodos estabelecidos e que passam a ser utilizados por novos analistas, equipamentos ou laboratórios. A extensão da validação depende da natureza da alteração (EURACHEM, 1998).

2. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

2.1. CAMPO DE APLICAÇÃO

Deve ser especificada e provada a validade do método para o grupo de matrizes e a faixa de concentração que ele se propõe a medir. Métodos validados para uma matriz não podem ser utilizados para análise de outros produtos sem prévia validação (NESTLÉ, 2002a).

2.2. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

Os termos especificidade e seletividade relacionam-se ao evento de detecção e à confirmação de identidade de um composto. De maneira geral, tanto a especificidade quanto a seletividade demonstram a habilidade de um método responder somente ao analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. A especificidade está relacionada à determinação de somente um analito e a seletividade é a capacidade de um método responder e distinguir vários analitos presentes na matriz (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

Várias são as formas de se provar a especificidade e seletividade de um método (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a):

- Cálculo de resolução, retenção relativa, fator de capacidade e fator de simetria;
- Análise de pureza do sinal;
- Comparação de resultados obtidos em diferentes condições de medições;
- Comparação de resultados obtidos por diferentes métodos de análise;
- Análise de amostra sem analito;
- Análise por método de adição de padrão e comparação da inclinação da reta obtida com a inclinação da curva de padrões;
- Análise de amostras contendo vários supostos interferentes;
- Análise de amostras de referência.

2.3. FAIXA DE TRABALHO E FAIXA LINEAR DE TRABALHO

A definição do International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) para faixa de trabalho é o conjunto de valores do mensurando para os quais espera-se que o erro do instrumento de medida esteja dentro dos limites especificados. Na prática, é definida como a faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado, cujo limite inferior é o próprio limite de detecção ou quantificação do método e o limite superior depende do equipamento de medição (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a).

Inserida na faixa de trabalho do método pode existir uma faixa na qual a relação entre concentração do analito e a resposta medida é linear e a sensibilidade é praticamente constante (INMETRO, 2003a).

Para determinação da faixa de trabalho, deve-se analisar um branco de reagentes ou amostra branco fortificadas em pelo menos 6 níveis de concentração, ou ainda, amostras de referência em, pelo menos, 6 níveis de concentração. Construir um gráfico de concentração por resposta e verificar visualmente a faixa linear de resposta. Analisar amostras de referência ou branco de amostra fortificado em pelo menos 6 níveis de concentração e três medidas em cada nível, dentro da faixa linear identificada e verificar a relação da resposta com a concentração do analito (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

2.4. LINEARIDADE

Entende-se por linearidade, a habilidade de um método analítico produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Esta habilidade pode ser representada pela equação de reta $y = ax + b$, sendo y a resposta medida, x a concentração do analito e a inclinação da reta é dada por a , sendo b a sua intersecção.

O coeficiente de correlação linear r pode ser utilizado como indicativo da linearidade do método, mas não deve ser utilizado como prova de adequação ao modelo linear. Deve-se construir um gráfico mostrando a relação entre concentração do analito e a resposta; a razão área/concentração deve se

manter constante com a variação da concentração e isto pode ser verificado graficamente (NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a).

2.5. SENSIBILIDADE

A sensibilidade mostra a variação da resposta com a concentração do analito e depende, essencialmente, da técnica de detecção utilizada, sendo expressa como a inclinação da reta de regressão (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

2.6. LIMITE DE DETECÇÃO

Entende-se por limite de detecção, o menor valor de concentração do analito que pode, com alguma certeza estatística, ser detectado, mas não necessariamente quantificado pelo método. Este é um parâmetro fundamental para medidas obtidas em níveis muito baixos, como análise de resíduos. (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

Durante a validação, principalmente para análise de componentes do alimento e não de resíduos, normalmente é suficiente uma indicação do nível em que a detecção torna-se problemática. Como este é um valor que depende da matriz analisada, é necessário estudá-lo para cada tipo de matriz (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a).

O limite de detecção é normalmente calculado como teor do branco analisado mais três vezes o desvio padrão de medidas obtidas nas condições descritas abaixo (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a):

- 6-10 medidas independentes do branco da amostra;
- 6-10 medidas independentes do branco da amostra fortificado na menor concentração aceitável do analito.

2.7. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os conceitos de limite de detecção e quantificação são praticamente idênticos, mudando somente as ordens de grandeza das incertezas associadas aos resultados obtidos nestes níveis de concentração (INMETRO, 2003a).

Limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis. Como o limite de detecção, este é um valor indicativo e não deve ser utilizado em tomadas de decisão (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

Para a determinação do limite de quantificação, pode-se utilizar os dados de desvio padrão obtidos no cálculo do limite de detecção, alterando o fator de multiplicação de 3 para 5, 6 ou 10, dependendo da incerteza desejada (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a).

Pode-se, também, analisar alíquotas de uma amostra branco fortificada em vários níveis de concentração do analito próximos ao limite de quantificação. Realizar 10 medidas em cada concentração e calcular o desvio padrão destas medidas; determinar o limite de quantificação como a menor concentração que apresentar incerteza aceitável (EURACHEM, 1998).

2.8. EXATIDÃO E TENDÊNCIA

Exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Quando a avaliação é realizada com a média de uma série de resultados, envolvendo a variação destes dados, obtém-se a veracidade de um método, o que é normalmente determinado durante a validação (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

A determinação da exatidão pode ser realizada através de análises de material de referência, participação em comparações interlaboratoriais, comparações de resultados obtidos por diferentes métodos e ensaios de recuperação realizados em pelo menos três níveis de concentração (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a).

Normalmente, realizam-se de 6 a 10 determinações de material de referência ou de amostras adicionadas e um número estatisticamente

significativo (no mínimo 6) quando a comparação entre métodos é utilizada para o cálculo da exatidão (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

A técnica de recuperação do analito adicionado pode ser utilizada para mostrar a eficácia da etapa extrativa do método, mesmo sabendo que este padrão adicionado não está ligado tão fortemente à matriz quanto o teor natural presente no alimento. Assim sendo, a eficácia da extração, determinada desta maneira pode estar superestimada (EURACHEM, 1998).

2.9. PRECISÃO

A precisão é uma medida da dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes em condições definidas. Dependendo das condições definidas durante a validação, a precisão pode ser expressa como repetitividade, ou repetibilidade, reprodutibilidade ou precisão intermediária do método (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

Expressa-se a precisão através do desvio padrão ou desvio padrão relativo dos resultados obtidos. A precisão, como a exatidão, depende da concentração do analito e, portanto, deve ser determinada em diferentes níveis de concentração (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

Quando os resultados analíticos (no mínimo 6) são obtidos utilizando-se o mesmo procedimento efetuado por um mesmo operador em um laboratório, com o mesmo equipamento em curto espaço de tempo, o desvio padrão obtido entre estes resultados é chamado de desvio padrão da repetibilidade e esta situação é conhecida como condições de repetibilidade. O desvio padrão da reprodutibilidade é determinado a partir de resultados (no mínimo 6) obtidos com o mesmo método em laboratórios, equipamentos e analistas diferentes, em um espaço de tempo maior (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a).

A partir da definição das condições de repetibilidade e reprodutibilidade, conclui-se que estas são condições extremas e a precisão indicada em termos de repetibilidade é a menor diferença possível entre resultados, enquanto a reprodutibilidade é a maior diferença que pode ser obtida pelo método utilizado. Entre estes dois extremos está a precisão intermediária, na qual pode-se alterar uma ou mais condições da repetibilidade sempre no mesmo laboratório:

equipamento, analista e/ou tempo (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a).

A precisão intermediária é a melhor indicação da variabilidade de resultados dentro do laboratório e, as condições em que foi determinada devem estar adequadamente documentadas (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a).

Uma vez obtidos os desvios padrão da repetibilidade (s_r) e reprodutibilidade (s_R), pode-se calcular os limites de repetibilidade r e reprodutibilidade (R) através das equações :

$$\text{Limite de repetibilidade: } r = 2,8 \cdot s_r$$

$$\text{Limite de reprodutibilidade: } R = 2,8 \cdot s_R$$

Estes limites representam a diferença máxima permitida entre dois resultados obtidos na mesma amostra em condições de repetibilidade e reprodutibilidade, respectivamente, com 95% de confiança (EURACHEM, 1998; NESTLÉ, 2002a; INMETRO, 2003a).

2.10. ROBUSTEZ

A sensibilidade que um método apresenta em face de pequenas variações deliberadas em seus parâmetros ou a capacidade deste método não alterar seus resultados frente a estas pequenas alterações é a definição de robustez (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

Durante a utilização de um método, na rotina de um laboratório de análises, a sua execução não mantém o mesmo rigor que o utilizado durante o desenvolvimento e validação; desta forma, as variáveis que podem afetar significativamente o desempenho do método devem ser identificadas durante o processo de validação. O objetivo do teste de robustez é avaliar as potenciais fontes de variação de resultados do método (EURACHEM, 1998; HEYDEN, 2001).

Para a determinação da robustez de um método analítico devem ser analisadas amostras de referência ou amostras com teor conhecido do analito, submetidas a alterações em parâmetros analíticos e verificar o impacto gerado

por estas alterações nos resultados. Deve-se determinar os pontos críticos do método como os fatores que provocaram alterações significativas no resultado. Pode-se também utilizar o método de Youden, descrito detalhadamente no procedimento de validação do INMETRO (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003a).

Os passos necessários para a avaliação da robustez são os seguintes (HEYDEN, 2001):

- Identificação dos fatores a serem testados;
- Definição dos níveis a serem avaliados para cada fator;
- Escolha do modelo experimental;
- Definição do protocolo do experimento;
- Definição das respostas a serem determinadas;
- Execução do experimento e definição das respostas do método;
- Cálculo dos efeitos;
- Avaliação dos dados e definição dos pontos críticos e limites de variação para cada fator.

2.11. INCERTEZA DE MEDIÇÃO

A incerteza da medida é um parâmetro único que engloba todos os fatores que afetam o resultado e associa uma faixa de valores possíveis deste resultado. O cálculo da incerteza leva em conta a precisão total do método, tendências existentes e incertezas da calibração (EURACHEM, 1998).

O parâmetro que indica a incerteza pode ser um desvio padrão ou múltiplo dele ou ainda ser calculado a partir de um intervalo de confiança e deve compreender todas ou as mais importantes fontes de erro de um resultado (EURACHEM, 2002).

O processo de cálculo da incerteza é simples e compreende quatro etapas (EURACHEM, 2002; NESTLÉ, 2002b; INMETRO, 2003b):

1. Especificação do mensurando: definir a relação entre o mesurando e as variáveis utilizadas em sua determinação, escrevendo a equação de cálculo deste mensurando;

2. Identificação das incertezas: identificar, para cada variável citada na equação de cálculo, todas as fontes de incerteza possíveis;
3. Quantificação dos componentes da incerteza: quantificar todas as fontes de incertezas associadas a cada variável citada na equação de cálculo;
4. Cálculo da incerteza combinada: expressar todas as incertezas quantificadas em termos de desvio padrão e combiná-las segundo as regras de operações de variâncias.

Os dados de desempenho do método obtidos durante a validação são muito úteis no cálculo da incerteza, uma vez que englobam várias fontes de incerteza (EURACHEM, 2002; NESTLÉ, 2002b; INMETRO, 2003b).

Uma vez calculada a incerteza para um procedimento analítico e um tipo específico de amostra, ela pode ser aplicada a todas as determinações realizadas por este procedimento neste tipo de amostra (EURACHEM, 2002).

3. OBJETIVO

O objetivo deste capítulo é especificar um procedimento de validação adequado para demonstrar as características de desempenho de um método analítico para análise de vitaminas em alimentos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Para a validação dos métodos foram utilizadas amostras de referência de fórmula infantil em pó e bebida instantânea em pó, fornecida pelo “Centré des Researches Nestlé” (CRN). Para validação da matriz cereal foram utilizadas amostras adicionadas ou não das vitaminas estudadas.

4.2. MÉTODOS

O procedimento de validação adotado, considerando as orientações do INMETRO sobre este assunto, está descrito a seguir.

4.2.1. Campo de aplicação

Definir no início do procedimento para quais grupos de alimentos e faixa de concentração o método será validado. Produtos similares podem ser agrupados para otimizar o procedimento de validação.

4.2.2. Linearidade

Medir, no mínimo 6 níveis de concentrações diferentes, pelo menos 3 vezes.

Construir o gráfico de concentração padrão x resposta, calcular a regressão linear utilizando todos os dados obtidos e avaliar seu resultado.

Construir o gráfico de concentração do padrão x resposta/concentração e verificar se há dependência entre eles.

4.2.3. Faixa de trabalho

Identificar a faixa de trabalho dentro da faixa linear a partir da curva de calibração traçada para o estudo da linearidade.

4.2.4. Sensibilidade

A inclinação da curva de calibração construída no estudo da linearidade é o valor de sensibilidade do método. Ele pode ser utilizado como parâmetro de controle do desempenho do método ao longo do tempo.

4.2.5. Precisão

Realizar 6 determinações de amostra ou material de referência em condições de repetibilidade, em pelo menos dois níveis de concentração. Quando possível, determinar a precisão intermediária através de resultados de material de referência analisada ao longo de um período de tempo.

Calcular o desvio padrão dos resultados obtidos e então o limite de repetibilidade para cada nível de concentração. Verificar se estes parâmetros

são constantes em valor absoluto ou relativo em função da concentração do analito na amostra.

4.2.6. Exatidão

Realizar 6 determinações de material de referência em condições de repetibilidade em pelo menos dois níveis de concentração. Na ausência de material de referência adequado à matriz, realizar 6 determinações de recuperação de padrão adicionado em pelo menos dois níveis de concentração.

Calcular a recuperação média e seu desvio padrão, que poderá ser utilizado para calcular os limites de cartas de controle da metodologia analítica.

4.2.7. Limite de detecção e quantificação

Medir a amplitude da linha de base e a altura do pico do padrão no mesmo cromatograma. Calcular o limite de detecção como 3 vezes a medida da linha de base e o limite de quantificação como 10 vezes essa mesma medida. Os valores obtidos são comparados com a altura do pico do padrão e calculados em concentração de padrão que é convertido em concentração do analito na amostra, considerando a sua massa e diluições realizadas.

Quando houver branco de amostra disponível ou analisando amostras com teores próximos ao limite de detecção e quantificação, analisar 6 tomadas de ensaio da amostra e calcular esses limites como resultado do branco da amostra mais 3 ou 10 vezes o desvio padrão dos resultados, respectivamente.

4.2.8. Especificidade e seletividade

Utilizar os resultados de análise de materiais de referência para comprovação da especificidade do método.

Na ausência de material de referência, mudar o sistema de detecção ou realizar análise em comprimentos de onda diferentes. Quando possível, fazer comparação de resultados entre o método proposto e um outro método, como microbiológico que pode ser considerado método de referência. Calcular e

avaliar estatisticamente a diferença média e a correlação existente entre os resultados.

4.2.9. Robustez

Aplicar o teste de Youden e determinar os pontos críticos do método analítico. Segundo o documento orientativo do INMETRO (2003b), listar os fatores a serem estudados com seus valores nominais e a variação proposta e, a partir desta tabela criar uma matriz dos fatores para a determinação da robustez do método. Realizar os ensaios previstos por esta matriz e avaliar os dados obtidos com a variação dos fatores estudados, comparando-os com a precisão do método.

Fatores que apresentarem variações significativas nos resultados devem ser estudados e controlados rigorosamente.

4.2.10. Incerteza da Medida

Segundo o EURACHEM (2002) pode-se calcular um valor de incerteza para cada nível de concentração estudado durante a validação e considerar este valor como a incerteza global do método.

Para facilitar este cálculo, seguiu-se o procedimento proposto em NESTLÉ (2002b), que consiste em:

- Criar um fluxograma do método analítico;
- Escrever a equação de cálculo do analito, reduzindo aos termos mais simples, como massa e volume. Incluir nesta equação, multiplicando, o termo $1/R$, sendo R a recuperação do método;
- Construir um diagrama de causa e efeito considerando como eixo principal o analito quantificado, cada seta lateral a este eixo representa um termo da equação e nestas setas são indicados os fatores que contribuem para a incerteza deste termo. Para determinação dos fatores que contribuem para incerteza de cada termo, utilizar as seguintes regras:

1. Toda massa é afetada pela repetibilidade e não-linearidade da balança, além da repetibilidade da operação de pesagem.
 2. Os volumes são afetados pela repetibilidade da operação, tolerância do material volumétrico e temperatura do ambiente, sendo que este último fator é desconsiderado devido à sua pouca influência quando comparado com os dois primeiros.
 3. Para a intersecção e inclinação da curva padrão, considerar o desvio padrão de cada termo e a preparação das soluções de calibração.
- Reescrever o diagrama de causa e efeito, agrupando a repetibilidade de todas as operações que são realizadas em paralelo durante a análise e os itens inclinação e intersecção da curva de calibração sob o termo calibração, considerando dois fatores de incerteza, o erro do modelo linear e a preparação das soluções de calibração.
 - Construir uma tabela conforme mostrado na Tabela 1.2, onde cada linha corresponde a uma seta lateral do diagrama de causa e efeito.

Tabela 1.2: Exemplo de tabela para cálculo da incerteza.

Variável	Valor	Unidade	Incerteza Padrão	
			Absoluta $u(x)$	Relativa $u(x)/x$
Precisão				
Recuperação				
Calibração				
Massa da amostra				
Volume da amostra				
Volume injetado				
Incerteza				
Incerteza Expandida				

- Quantificar as incertezas considerando para cada nível de concentração:
 1. Para repetibilidade utilizar o desvio padrão obtido no item precisão da validação;
 2. A partir dos dados de exatidão do método, verificar estatisticamente a existência de tendência, utilizando a equação abaixo:

$$SD(Rec) = R_{media} \times \sqrt{1/n + (SD(C_{observ})/C_{observ})^2 + (SD(C_{ref})/C_{ref})^2}$$

Onde:

SD(Rec): desvio padrão total da recuperação do método;

R_{media} : recuperação média obtida durante a validação;

n: número de dados obtidos;

SD(C_{observ}): desvio padrão dos resultados obtidos;

C_{observ} : média dos resultados obtidos;

SD(C_{ref}): desvio padrão do valor de referência;

C_{ref} : valor de referência

Após o cálculo do SD(Rec), realizar um teste estatístico para verificação de existência de tendência no método:

$$t_{calc} = \frac{|1 - R_{media}|}{SD(Rec)}$$

Comparar o valor t_{calc} com t_{crit} considerando uma distribuição bicaudal e 95% de confiança, para n-1 dados. Se $t_{calc} < t_{crit}$, o método não apresenta tendência e a incerteza da exatidão deve ser calculada como:

$$u(Rec) = \frac{t_{crit} \times SD(Rec)}{1,96}$$

Se $t_{\text{calc}} > t_{\text{crit}}$ o método apresenta tendência estatística e a incerteza da recuperação deve ser ampliada para abranger o 100%. A equação utilizada encontra-se abaixo:

$$SD(\text{Rec})^* = \sqrt{((1 - R_{\text{media}})/k)^2 + (SD(\text{Rec}))^2} \quad ; \text{ com } k=2$$

Utilizar o valor obtido de $SD(\text{Rec})^*$ como incerteza da recuperação do método.

3. O erro do modelo linear é obtido a partir dos dados de linearidade. Utilizar as equações abaixo e calcular a incerteza para cada ponto da curva de calibração:

$$SD(y_i) = SD(\text{Res}) \times \sqrt{1 + (1/n) + ((x_i - x_{\text{medio}})^2 / ((n-1) \times (SD(x_{\text{medio}}))^2))}$$

Onde:

$SD(y_i)$: desvio padrão da resposta (u.área);

$SD(\text{Res})$: desvio padrão residual da curva de calibração;

n : número de pontos utilizados na construção da curva de calibração;

x_i : nível do analito (concentração do padrão);

x_{medio} : média das concentrações das soluções utilizadas na curva de calibração;

$SD(x_{\text{medio}})$: desvio padrão de x_{medio}

Os valores obtidos com a equação acima são muito próximos de $SD(\text{Res})$ e para fins de cálculo a incerteza proveniente do modelo linear será calculada segundo a equação abaixo:

$$u(x_i) \sim \frac{SD(\text{Res})}{\text{inclinação da curva de calibração}}$$

4. Para a incerteza das soluções de calibração, utilizar as regras de cálculo de propagação de erro para as diluições

necessárias na preparação das soluções de calibração. Na tabela do cálculo de incerteza, utilizar a média das incertezas da concentração das soluções de calibração;

5. A incerteza da massa do padrão deve compreender o erro relativo à pesagem e à pureza do padrão. Este valor é obtido do certificado do fornecedor, como faixa de tolerância e deve ser convertido a desvio padrão dividindo este valor por $\sqrt{6}$;
6. As fontes de incerteza restantes da massa e volume da amostra, volume injetado devem ser calculadas a partir dos valores obtidos dos fornecedores dos equipamentos e tolerância dos materiais volumétricos.

- Combinar as incertezas calculadas para cada parâmetro, obtendo a incerteza para cada nível de concentração estudado;
- Calcular a incerteza expandida multiplicando o valor da incerteza pelo fator de cobertura $k=2$.

Os valores obtidos são as incertezas aproximadas, considerando cada nível de concentração estudado durante a validação do método. Sabendo que a incerteza é uma característica do resultado e não do método, o procedimento descrito acima deve ser realizado a cada análise e para cada resultado.

Neste trabalho foram calculadas as incertezas de resultados obtidos durante a validação e comparados com os valores aproximados obtidos por nível de concentração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante a validação da metodologia analítica das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP estão apresentados no capítulo 2 e os do ácido pantotênico, no capítulo 4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics, Eurachem Guide, 1998.

EURACHEM/CITAC. Guia Determinando a Incerteza na Medição Analítica, 2.ed. , Eurachem Guide, 2002.

HOUAISS , A. Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa, 1.ed., São Paulo: Objetiva, 2001. 2922p.

ILAC. Introducing the concept of uncertainty of measurement in testing in association with the application of the standard ISO/IEC 17025, Ilac, 2002.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaio químicos, INMETRO, 2003a.

INMETRO. Expressão da incerteza da medição, INMETRO, 2003b.

NESTLÉ. Guidelines for validation of reference methods of analysis, Nestlé Ltd., 2002a.

NESTLÉ. Measurement uncertainty estimation in chemical methods of analysis, Nestlé Ltd., 2002b.

CAPÍTULO 2

VITAMINAS B₁, B₂, B₆, PP

1. INTRODUÇÃO

Tiamina, também conhecida como vitamina B₁ ou aneurina, foi a primeira vitamina a ser descoberta, no início do século XX. Em 1885, a Marinha japonesa aumentou a proporção de carnes e vegetais na dieta de sua tripulação com o objetivo de eliminar o beribéri, doença prevalente no século XIX no sudoeste da Ásia (GUBLER, 1991; BALL, 1998).

A partir do estudo do beribéri, descobriu-se a existência de uma amina essencial ao organismo denominada “fator anti-beribéri”. Surgiu assim o termo vitamina, que significa amina essencial à vida e passou a ser utilizado como termo genérico para outros micronutrientes orgânicos essenciais (GUBLER, 1991; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Riboflavina ou vitamina B₂ foi descoberta na década de 1920 como fator de crescimento resistente a altas temperaturas presente em extrato de levedura. No início dessa década, este composto foi isolado da clara do ovo e, doze anos depois, a ovoflavina foi obtida desta matriz. Em 1932 Wagner-Jauregg isolou vitamina B₂ no leite e Warburg e Christian isolaram uma enzima amarela, contendo flavina na estrutura, a partir de extrato de levedura, que posteriormente foi identificada como a forma fosforilada da riboflavina (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

O termo vitamina B₂ engloba três compostos com mesma atividade vitamínica: riboflavina, flavina mononucleotídeo ou riboflavina 5-fosfato (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo ou riboflavina 5'- adenosildifosfato (FAD) (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

Vitamina B₆ é o termo genérico para um grupo de seis compostos intercambiáveis metabolicamente que atuam como coenzima para diversas enzimas envolvidas em reações como gliconeogêneses, metabolismo de ácidos graxos e lipídeos e síntese de neurotransmissores. O primeiro composto a ser identificado foi o piridoxol ou piridoxina, em 1934 e, em 1944, Snell anunciou a existência de duas outras formas ativas da vitamina: o piridoxal e a piridoxamina que foram sintetizadas e tiveram suas estruturas elucidadas no mesmo ano por Harris e colaboradores (DRISKELL, 1991; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Niacina, ou vitamina PP, é uma das raras vitaminas que podem ser sintetizadas no organismo e apresenta duas formas ativas: o ácido nicotínico e a nicotinamida que são a parte ativa das coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) e atuam como carreadores de prótons e elétrons em várias reações de óxido-redução (HANKES, 1991; OTTAWAY, 1993; SANT'ANA, 2003).

2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

As fórmulas estruturais das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP e seus vitâmeros encontram-se na Figura 2.1.

A fórmula empírica do cloridrato de tiamina é C₁₂H₁₇N₄OSCl.HCl com nome químico, cloridrato de 3-(4'-amino-2'- metilpirimidina-5'- ilmetil-5-(2-hidróxietil)-4-metiltiazólio e sua molécula, é formada por uma pirimidina substituída ligada a um anel de tiazol por uma ponte de metileno. Duas são as formas comerciais da vitamina B₁: cloridrato de tiamina e mononitrato de tiamina, com características físico-químicas parecidas (GUBLER, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Em soluções fortemente alcalinas e na presença de agentes oxidantes, como ferricianeto, cloreto de mercúrio II e brometo cianogênico, a tiamina é convertida a tiocromo, um composto que apresenta fluorescência azul característica. Esta reação permite a análise de tiamina por fluorescência, após sua transformação a tiocromo (GUBLER, 1991; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003).

A riboflavina é composta por uma molécula de isoaloxazina com cadeia lateral de ribitol, com nome sistemático 7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol)isoaloxazina e peso molecular 376,36, com fórmula empírica C₁₇H₂ON₄O₆. As outras formas ativas da vitamina B₂, FMN e FAD, apresentam características físico-químicas semelhantes às da riboflavina (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

Figura 2.1: Estrutura dos vitâmeros das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP.

Devido à baixa solubilidade da riboflavina em água, utiliza-se a riboflavina-5-fosfato de sódio para adição de vitamina B₂ ao alimento. Este composto apresenta fórmula empírica C₁₇H₂₀O₉N₄PNa, com peso molecular 478,4 (ROCHE, 1976).

São conhecidos seis vitâmeros da vitamina B₆, todos derivados do 3-hidróxi-2-metilpiridina e com a mesma atividade biológica, diferenciando-se pelo grupo substituinte do carbono 4 (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Quando o grupo substituinte for um álcool, obtém-se a piridoxina ou piridoxol (PN) e seu fosfato correspondente, o piridoxol fosfato (PNP). O piridoxal (PL) e piridoxal fosfato (PLP) apresentam um grupo aldeído ligado ao carbono 4 do anel de piridina, enquanto a piridoxamina (PM) e a piridoxamina fosfato (PMP) tem um grupo amina nesta posição. Comercialmente estão disponíveis os sais cloridrato de piridoxina (PN. HCl), cloridrato de piridoxal e dicloridrato de piridoxamina (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

O cloridrato de piridoxol, única forma utilizada na fortificação de alimentos, é um pó cristalino branco, inodoro, com sabor salgado e ponto de fusão entre 204 e 206°C, solúvel em água, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em clorofórmio e éter. Sua fórmula empírica é C₈H₁₁O₃N.HCl, com peso molecular 205,65 (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

O ácido nicotínico, 3-ácido carboxílico piridina, de fórmula empírica C₆H₅O₂N, tem peso molecular 123,11 e a nicotinamida, cujo nome sistêmico é 3-carboxiamida tem peso molecular 122,12 e fórmula empírica C₆H₆ON₂. Ambos vitâmeros apresentam propriedades básicas e formam sais de amônia quaternária em soluções ácidas e, devido ao seu caráter anfótero, o ácido nicotínico, em solução básica, forma sais de ácido carboxílico (BALL, 1998; SANT'ANA, 2003).

A Tabela 2.1 traz um resumo das características físico-químicas das vitaminas em questão.

Tabela 2.1: Resumo das características físico-químicas das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP.

	Vitamina B ₁		Vitamina B ₂		Vitamina B ₆			Vitamina PP	
	Cloridrato Tiamina	Mononitrato Tiamina	Riboflavina	Riboflavina 5-fosfato sódio	Piridoxol	Piridoxal	Piridoxamina	Niacina	Niacinamida
Fórmula empírica	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OSCl.HCl	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ N ₅ S	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	C ₁₇ H ₂₀ O ₉ N ₄ PNa	C ₈ H ₁₁ O ₃ N.HCl	C ₈ H ₉ O ₃ N.HCl	C ₈ H ₁₂ O ₂ N ₂ .2HCl	C ₆ H ₅ O ₂ N	C ₆ H ₆ ON ₂
Peso molecular(g/Mol)	337,28	327,4	376,36	478,4	205,65	203,63	259,13	123,11	122,12
Características	Cristal incolor em forma de agulha, higroscópico.	Pó cristalino branco, não higroscópico.	Pó cristalino amarelo-alaranjado		Pó cristalino branco			Agulhas incolores	
Odor	Característico		Característico		Inodoro			Inodoro	
Sabor	Amargo		-		Salgado			Ácido	Amargo
Solubilidade	Solúvel: água (1g/mL) Pouco solúvel: álcool, acetona, glicerol. Insolúvel: éter, benzeno, hexano, clorofórmio.	Pouco solúvel: água (1g/44mL), álcool, clorofórmio.	Levemente solúvel: água (100-2337 µg/mL) Pouco solúvel: etanol Insolúvel: acetona, éter dietílico, clorofórmio, benzeno.	Solúvel: água Levemente solúvel: álcool Insolúvel: éter e clorofórmio.	Solúvel: água Levemente solúvel: etanol Pouco solúvel: éter dietílico, clorofórmio.	Solúvel: água Pouco solúvel: etanol		Solúvel: água Levemente solúvel: etanol Insolúvel: acetona, éter dietílico	Solúvel: água, etanol. Pouco solúvel: acetona, clorofórmio, éter dietílico
Estabilidade	Sal: estável até 100°C Solução: estável em pH ~ 3,5		Sal: estável Solução: instável sob radiação UV e visível		Sal: estável ao calor e oxigênio. Solução: degradado pela luz em meio alcalino e, em menor extensão, em meio ácido.			Sal e solução: estáveis ao oxigênio, luz e aquecimento.	
Absorção UV	Soluções em pH 5,0: dois comprimentos de onda máximo 235 e 267 nm Soluções com pH < 3: um comprimento de onda máximo em 247 nm		Solução aquosa: quatro picos de máxima absorvância em 223, 266, 373 e 445 nm		Fortemente dependente pH da solução: 1,8 => 290nm 4,5 => 324nm 7,0 => 316nm			Absortividade fortemente afetada pelo pH da solução, mas comprimento de onda máximo permanece inalterado em 261 nm	
Fluorescência	-	-	Sol. Aquosa: intensa fluorescência com máximo em pH 3-8		Fluorescência natural com intensidade dependente pH			-	-

Fonte: BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a, b e c; COOPERMAN, 1990; DRISKELL, 1990; GUBLER, 1990; HANKES, 1990; OTTAWAY, 1993; ROCHE, 1996; SANT'ANA, 2003

3. FUNÇÕES BIOQUÍMICAS

A maioria das vitaminas do complexo B atua como coenzima de enzimas envolvidas no catabolismo dos alimentos para produção de energia. Coenzimas são compostos formados por uma proteína, a apoenzima, ligada à vitamina, que é responsável pela ligação da enzima ao substrato (BALL, 1998).

Ocorrendo falta de vitamina, a coenzima não pode ser formada bloqueando a via metabólica com conseqüente acúmulo de substrato e utilização de via metabólica alternativa, provocando desequilíbrio do metabolismo (BALL, 1998).

As formas ativas conhecidas da tiamina são o éster difosfato e o trifosfato de tiamina. Estes compostos são formados por fosforilação da tiamina pela adenina tri-fosfato (ATP) em uma reação catalisada pela enzima tiamina pirofosfoquinase (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993).

Os fosfatos de tiamina, com exceção do monofosfato que é biologicamente inativo são cofatores em pelo menos 20 diferentes reações enzimáticas envolvidas no metabolismo de carboidratos, gordura e álcoois (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993).

A absorção da tiamina ocorre no intestino por dois processos distintos: transporte ativo e difusão passiva. O estoque de tiamina não é grande e ocorre em vários órgãos, sendo que metade do teor encontra-se nos músculos esqueléticos seguido de fígado, coração, rins e cérebro. A maior parte da tiamina estocada, aproximadamente 80%, apresenta-se na forma de pirofosfato de tiamina e o excesso é rapidamente excretado pela urina e, em pequenas quantidades, pela bile (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

A tiamina apresenta baixa toxicidade quando administrada oralmente em humanos, devido à excreção do excesso pela urina. Entretanto, altas doses parenterais por longo período de tempo podem gerar manifestações clínicas e, em alguns casos, provocar até a morte devido à depressão centro respiratória. Apesar desta toxicidade, há uma larga margem entre teor terapêutico e doses tóxicas (GUBLER, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Na forma de suas coenzimas, FAD e FMN, a vitamina B₂ participa de reações de óxido-redução em várias vias metabólicas, atuando como

intermediários na transferência de elétrons (COOPERMAN, 1991; OTTAWAY, 1993; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

As formas ligadas de FAD e FMN são liberadas das proteínas nas condições ácidas do estômago e hidrolisadas enzimaticamente no intestino delgado à riboflavina livre, que é absorvida por processo de transporte ativo dependente de sódio. O fígado é o principal órgão de estocagem, com até um terço do total de flavinas do organismo, seguido dos rins e coração, com 70 a 90% da vitamina sendo estocada na forma de FAD. A excreção ocorre, principalmente, através da urina, podendo também ocorrer através da bile e do suor (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

Não há evidências de efeitos tóxicos causados por altas doses de riboflavina - até 20 mg/dia via oral - provavelmente devido a sua baixa solubilidade e limitada capacidade de absorção intestinal (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

A forma ativa da vitamina B₆ é o fosfato de piridoxal ou piridoxal-5-fosfato (PLP) e qualquer forma da vitamina é rapidamente convertida a PLP no organismo, resultando em atividade biológica semelhante para os seis vitâmeros (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998).

O PLP forma o grupo prostético dos sistemas enzima-coenzima nos processos metabólicos gerais e particularmente no metabolismo de proteínas, sendo necessário para formação de mais de 60 enzimas (OTTAWAY, 1993).

A vitamina ingerida é dissociada pelo ácido gástrico e, já no lúmen intestinal, após hidrolise enzimática, as formas livres da vitamina são absorvidas por processo de difusão passiva no jejuno. A estocagem da vitamina ocorre principalmente no músculo esquelético e o excesso é excretado pela urina como ácido 4-piridóxico, refletindo a utilização metabólica in vivo da vitamina B₆ (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Doses de 50 mg a 6g/dia de vitamina B₆ ingeridas durante vários meses podem levar a neuropatia periférica, perda de mielina e degeneração de fibras nervosas. Outros sintomas de toxicidade por vitamina B₆ são fotosensibilidade, náuseas e baixa sensibilidade ao toque (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

A importância da vitamina PP deve-se ao fato de seus dois vitâmeros serem convertidos no organismo a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e

nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP). Estes compostos atuam como carreadores de elétrons em grande número de reações de óxido-redução do metabolismo de geração de energia das células e ocorrem nas formas oxidadas e reduzidas (OTTAWAY, 1993; SANT'ANA, 2003).

De maneira geral, o NAD e NADP estão envolvidos em reações de liberação de energia dos carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, bem como na síntese de aminoácidos, ácidos graxos e pentoses e na síntese e reparo de DNA (OTTAWAY, 1993; SANT'ANA, 2003).

Várias enzimas utilizam as coenzimas da nicotinamida, entre elas a álcool desidrogenase, lactato desidrogenase, malato desidrogenase, esteróide redutase, diidrofolato redutase, aldeído desidrogenase e glutamato desidrogenase (OTTAWAY, 1993).

O organismo é capaz de sintetizar niacina a partir do triptofano, sendo necessário 60 mg de triptofano para obtenção de 1 mg de niacina. O triptofano é absorvido no intestino após digestão de proteínas (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998).

A maior parte da vitamina PP presente na dieta está na forma de nicotinamida nucleotídeos, que são hidrolisados no intestino delgado a nicotinamida, absorvida por difusão simples. Após absorção, a nicotinamida é levada ao fígado juntamente com ácido nicotínico e triptofano, onde parte é utilizada e o restante é hidrolisado a amida livre que é liberada na circulação junto com ácido nicotínico não metabolizado. Estes compostos são utilizados pelos tecidos, para síntese intracelular de NAD e NADP. O excesso de niacina é metilado no fígado e excretado pela urina (BALL, 1998; SANT'ANA, 2003).

Observou-se que doses de niacina próximas a 100 mg/dia provocam vasodilatação periférica e doses maiores competem com ácido úrico na excreção podendo aumentar incidência de artrite. Doses de 750 mg/dia durante três meses parece causar danos ao fígado e icterícia (BALL, 1998).

A Tabela 2.2 mostra um resumo das formas ativas das vitaminas e suas funções bioquímicas.

Tabela 2.2: Resumo das formas ativas e funções bioquímicas das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP.

VITAMINA	FORMA ATIVA	FUNÇÕES BIOQUÍMICAS
B₁	Éster difosfato ou Pirofosfato de tiamina Trifosfato de tiamina	<ul style="list-style-type: none"> • Reações de liberação de energia a partir de carboidratos • Decarboxilação de α-cetoácidos • Decarboxilação oxidativa do piruvato a acetil coenzima A • Reações de transcetolases
B₂	Flavina mononucleotídeo (FMN) Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo de carboidratos, gordura e lipídeos • Oxidação de aldeídos • Oxidação de cadeias alifáticas laterais • Oxidação do succinato a fumarato • Oxidação do ácido graxo saturado acil-coenzima A a ácido graxo α,β-insaturado • Reoxidação NADH • Conversão do piridoxol e ácido fólico a suas coenzimas
B₆	Piridoxal-5-fosfato	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo de aminoácidos • Formação de aminas biogênicas (dopamina, serotonina, histamina e ácido γ-aminobutírico) que atuam como neurotransmissores • Síntese de esfingosina • Conversão de triptofano a niacina • Metabolismo de ácido fólico e vitamina B₁₂
PP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP)	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo de geração de energia nas células • Síntese de aminoácidos e ácidos graxos • Síntese de pentoses para produção de ácidos nucleicos e nucleotídeos

FONTE: BALL, 1998;BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a, b e c; COOPERMAN, 1990; DRISKELL, 1990; GUBLER, 1990; HANKES, 1990; OTTAWAY, 1993; ROCHE, 1996; SANT'ANA, 2003

4. INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA

A ingestão diária recomendada (IDR) de cada nutriente refere-se à quantidade adequada deste nutriente que assegura as necessidades essenciais de pessoas saudáveis.

Nos Estados Unidos, utiliza-se os termos “recommended daily allowance” (RDA) e “recommended daily intake” (RDI) e já foram publicados dados para as vitaminas A, D, E, K, tiamina, riboflavina, niacina, B₆, folato, B₁₂ e C, enquanto o Reino Unido adota o termo “recommended nutrient intake” (RNI) (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998).

Em 1991, o Reino Unido publicou suas RNI's (reference nutrient intake) com duas diferenças significativas em relação a todas outras já existentes (OTTAWAY, 1993):

- RNI's elaboradas por um único comitê;
- Abordagem teórica das RNI's

Deste estudo ficou definido que a RDA está relacionada com provisão enquanto RDI com a necessidade de cada nutriente, e foram reconhecidos três níveis de referência, a partir da curva de distribuição normal que descreve o requerimento de cada nutriente de um grupo de indivíduos saudáveis. A média da curva normal foi definida como requerimento médio estimado (EAR - estimated average requirement) e é o valor mais apropriado para uso em declarações nutricionais. O percentil 2,5 representa a ingestão mínima de referência para evitar sinais clínicos de deficiência na população e a ingestão de referência do nutriente é definida como o percentil 97,5 e deve ser utilizado como base para RNI de populações. Estes três novos termos são identificados globalmente como “dietary reference value”. A Tabela 2.3 mostra os valores de referência definidos por alguns países desenvolvidos (OTTAWAY, 1993).

Tabela 2.3: Valores de IDR em alguns países desenvolvidos.

	Austrália		Estados Unidos		Inglaterra	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
Idade (anos)	19 – 64	19 – 54	18 – 35	18 – 35	23 – 50	23 – 50
Vitamina B ₁ (mg)	1,1	0,8	1,4	1,0	1,2	0,9
Vitamina B ₂ (mg)	1,7	1,2	1,6	1,2	1,6	1,3
Vitamina B ₆ (mg)	1,3-1,9	0,9-1,4	2,2	2,0	-	-
Vitamina PP (mgNE)	18-20	12-14	18	13	18	15

Fonte: OTTAWAY, 1993.

A Tabela 2.4 traz os valores de ingestão diária de referência (IDR) utilizados no Brasil para declaração nutricional voluntária de vitaminas, publicados na Resolução RDC no. 269, de 22 de setembro de 2005. As vitaminas estudadas neste capítulo e o ácido pantotênico, que será abordado no capítulo 3 deste trabalho, estão marcadas em negrito (BRASIL, 2005).

Pelo fato da tiamina e da riboflavina não serem estocadas em grande quantidade no organismo, é necessária a ingestão constante através da dieta. Como a tiamina está associada a reações de liberação de energia, o aumento do metabolismo aumenta a necessidade de vitamina B₁. Desta forma, a IDR pode ser expressa em função da ingestão calórica (COOPERMAN, 1991; GUBLER, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Devido ao envolvimento da PLP no metabolismo protéico, a necessidade de vitamina B₆ aumenta com o aumento da ingestão de proteínas. Considera-se nutricionalmente adequado a ingestão de 16µg de vitamina para 1g de proteína ingerida (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Tabela 2.4: Valores de IDR utilizados para declaração nutricional pela Legislação Brasileira.

Nutriente	Unidade	IDR
Vitamina A	µgRE	600
Vitamina D	µg	5
Vitamina C	mg	45
Vitamina E	mg	10
Tiamina	mg	1,2
Riboflavina	mg	1,3
Niacina	mg	16
Vitamina B₆	mg	1,3
Ácido Fólico	µg	240
Vitamina B ₁₂	µg	2,4
Biotina	µg	30
Ácido Pantotênico	mg	5
Cálcio	mg	1000
Ferro	mg	14
Magnésio	mg	260
Zinco	mg	7
Iodo	µg	130
Vitamina K	µg	65
Fósforo	mg	700
Flúor	mg	4
Cobre	µg	900
Selênio	µg	34
Molibdênio	µg	45
Cromo	µg	35
Manganês	mg	2,3
Colina	mg	550

Fonte: BRASIL, 2005.

5. DEFICIÊNCIA

Entende-se por deficiência um defeito bioquímico manifestado como doença com sintomas característicos, sendo precedida pela deficiência subclínica ou marginal, condição na qual o indivíduo não apresenta sintomas clínicos da deficiência (BALL, 1998).

Várias são as causas de deficiência de vitaminas, como ingestão, absorção e/ou utilização inadequada ou aumento no requerimento, excreção ou destruição do nutriente. São seis os estágios que marcam deficiência de vitaminas, conforme mostrado na Figura 2.2 (BALL, 1998).

A deficiência de vitamina B₁ afeta os tecidos com alto requerimento de energia, como sistema nervoso, coração e rins e ocorre devido à ingestão insuficiente de tiamina através da dieta ou pelo aumento no requerimento durante a gravidez, a lactação, o aumento no consumo de carboidratos e outros, ocorrendo, comumente, em indivíduos subnutridos, pacientes com doenças crônicas ou em quadros de anorexia e alcoolismo (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

A patologia clássica associada à deficiência de tiamina é o beribéri, prevalente no Oriente em populações cuja dieta é baseada em arroz polido. Os sintomas variam com as circunstâncias - idade, dieta, duração e severidade da deficiência - podendo o beribéri ser classificado em três tipos, seco ou neurítico, úmido ou edematoso e infantil ou agudo (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Atualmente, o tipo mais freqüente de deficiência de tiamina está associado ao alcoolismo e é conhecido como síndrome de Wernickie-Korsikoff ou encefalopatia de Wernickie e é devido ao baixo consumo de alimentos e conseqüentemente baixa ingestão de tiamina, e com a diminuição da atividade hepática ocorre impedimento na utilização da vitamina levando a oftalmoplegia, ataxia, sintomas nervosos como confusão mental, perda de memória e coma. A degeneração mental conseqüente da síndrome de Wernickie-Korikoff é resultante de lesões hemorrágicas no sistema nervoso central (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Figura 2.2: Evolução do quadro de deficiência de vitaminas.

A deficiência de riboflavina ocorre principalmente em indivíduos com dietas nutricionalmente pobres durante prolongado período de tempo, em casos de anorexia e alcoolismo crônico. Nestes casos, os sintomas podem não ser específicos da deficiência de riboflavina, mas da falta de vários nutrientes na

dieta (COOPERMAN, 1991; OTTAWAY, 1993; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

Sinais clínicos de deficiência de vitamina B₆ em humanos são raros, pois a vitamina está amplamente distribuída na natureza. Casos de deficiência estão associados a uso de drogas antagonistas, má absorção intestinal e alcoolismo e relacionados aos altos níveis de homocisteína plasmática (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Na década de 1950, crianças alimentadas com leite esterilizado apresentaram convulsões, provavelmente devido à diminuição da síntese do ácido γ -aminobutírico (GABA), síntese anormal de neurotransmissores e modelo encefalográfico anormal. Estes sintomas foram considerados consequência de deficiência de vitamina B₆ (BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

A deficiência marginal de vitamina B₆ causa poucos efeitos adversos à saúde e manifestações não específicas. Casos graves causam convulsões, neurite periférica, anemia, reações na pele similares às presentes em casos de deficiência de riboflavina e niacina, mal-estar e depressão (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998).

A pelagra é uma doença nutricional endêmica em comunidades pobres, cuja dieta é baseada em cereais como milho e sorgo, consequência da deficiência de niacina. O prognóstico da doença é dificultado pela má-nutrição proteico-energética e por absorção desbalanceada de aminoácidos, com redução da absorção do triptofano e aumento da absorção de leucina (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; SANT'ANA, 2003).

Como a nicotinamida é o componente ativo da NAD e NADP, coenzimas envolvidas nos sistemas de óxido-redução, sua deficiência resulta em distúrbios fundamentais do metabolismo intermediário podendo levar à morte (OTTAWAY, 1993).

A Tabela 2.5 mostra os sintomas mais comuns de deficiência das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP.

Tabela 2.5: Resumo das doenças e principais sintomas associados à deficiência de vitaminas.

	Doença Associada	Sintomas
Vitamina B₁	Beribéri	Perda de apetite, distúrbios digestivos, fadiga Comprometimento cardíaco Sintomas neurológicos – parestesia e fraqueza muscular
Vitamina B₂	-	Lesões nos lábios e cantos da boca, dermatite seborréica ao redor do nariz Língua fissurada e com coloração magenta Dermatite na vulva e escroto Supervascularização córnea acompanhada de intensa fotofobia Infecção e opacidade da córnea, ulceração e catarata
Vitamina B₆	-	Lesões na pele Mal-estar, anemia e depressão Convulsões Neurite periférica
Vitamina PP	Pelagra	Lesões na boca e lábios, pele descolorida e seca Distúrbios gastro-intestinais – dor abdominal, estomatite, diarreia e perda de apetite Sintomas neurológicos – lassidão, depressão, tremor, irritabilidade, ansiedade, delírio e demência

FONTE: BALL, 1998;BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a, b e c; COOPERMAN, 1990; DRISKELL, 1990; GUBLER, 1990; HANKES, 1990; OTTAWAY, 1993; ROCHE, 1996; SANT'ANA, 2003

6. FONTES NATURAIS

A tiamina e a riboflavina estão presentes em praticamente todos os tecidos animais e vegetais, em baixas concentrações. São consideradas fontes de tiamina, leveduras e extratos de leveduras, farelo de trigo, cereais integrais e castanhas; hortaliças, frutas, ovos e carne de frango, carneiro e boi apresentam teores intermediários, enquanto o leite é muito pobre nesta vitamina (COOPERMAN, 1991; GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

A maior parte da tiamina presente em produtos animais (95 a 98%) encontra-se na forma fosforilada, dos quais 80 a 85% apresenta-se como pirofosfato de tiamina. Nos produtos vegetais encontra-se, predominantemente, a forma não fosforilada (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Em tecidos animais, a riboflavina está presente, predominantemente, nas formas FAD e FMN, ligadas a proteínas. No leite e ovos, a forma predominante é a riboflavina, também ligada à proteína (BALL, 1998).

Extrato de levedura, fígado e rins são ricos em riboflavina, enquanto cereais, frutas e vegetais são muito pobres. Ovos, leite, queijo e farelo de trigo podem ser considerados boas fontes de vitamina B₂ (COOPERMAN, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

A vitamina B₆ está presente em todos os alimentos naturais não processados e em alta concentração no extrato de levedura, trigo integral, fígado e carne de frango. Outras fontes importantes são cereais integrais, castanhas, rins, peixes, batatas e outros vegetais. Leite, ovos e frutas são pobres em vitamina B₆ (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Nos alimentos de origem animal, a maior parte da vitamina B₆ está na forma de PLP e PL, enquanto PN é encontrado em alimentos de origem vegetal, ligado a glucosídeo e em outras formas conjugadas, indisponíveis para humanos (BALL, 1998).

A niacina está presente na maioria dos alimentos, com exceção dos gordurosos. Na carne, a maior parte da vitamina está na forma de nicotinamida

livre, formada *post mortem* a partir da hidrólise do NAD (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998).

Altos teores de vitamina PP são encontrados na carne vermelha magra, aves, fígado, pescados, legumes, farelo de trigo e cereais integrais. Nos cereais, cerca de 85% do ácido nicotínico presente está ligado a polissacarídeos e peptídeos (niacitina) que não estão biodisponíveis (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; SANT'ANA, 2003).

Frutas, vegetais, grãos inteiros, pão, chá e café apresentam teores medianos de vitamina PP. Após a torrefação do café, o teor de niacina aumenta significativamente devido a desmetilação da trigonelina presente neste alimento com formação de ácido nicotínico (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; SANT'ANA, 2003).

Apesar de apresentarem baixos níveis de niacina, queijos e ovos são ricos em triptofano, que também está presente nos alimentos proteicos balanceados (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; SANT'ANA, 2003).

A Tabela 2.6 mostra teores de vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP em vários alimentos.

Tabela 2.6: Teor de vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP em alimentos.

Alimento	Vitaminas (mg/100g)			
	B ₁	B ₂	B ₆	PP
Carne de vaca	0,02 – 0,18	0,15 – 3,42	0,13 – 1,03	2,4 – 17,5
Pão	0,14 – 0,97	0,11 – 0,44	0,03 – 0,18	1,5 – 6,6
Brócoli in natura	0,07	0,12	0,18	0,6
Brócoli cozido	0,06	0,12	0,20	0,6
Repolho	0,03 – 0,07	0,03 – 0,07	0,10 – 0,21	0,3 – 0,5
Cenoura crua	0,07	0,06	0,14	1,0
Cenoura cozida	0,07	0,04	0,15	0,6
Queijos	0,002 – 0,35	0,03 – 2,68	0,02 – 0,42	0,04 – 1,02
Frango	0,01	0,13	0,10	6,3
Ovos frescos	0,07	0,48	0,14	0,07
Pepino	0,03	0,03	0,04 – 0,05	0,04 – 0,10
Peixe	0,01 – 0,50	0,04 – 0,23	0,06 – 1,04	1,2 – 14,7
Uva	0,07	0,07	0,09	0,2
Geléia real	0,14 – 0,67	0,5 – 2,5	0,10 – 4,8	4,8 – 8,8
Leite in natura	0,04	0,18	0,04	0,09
Leite em pó	0,41	1,74	0,34	0,9
Laranja	0,09	0,04	0,06	0,3
Papaya	0,03	0,03	0,02	0,3
Arroz branco cozido	0,08 – 0,60	0,01 – 0,07	0,01 – 0,35	0,9 – 4,2
Farinha de trigo	0,70 – 0,90	0,41 – 0,51	0,03 – 0,05	5,8 – 7,6
Iogurtes	0,03 – 0,05	0,14 – 0,23	0,03 – 0,05	0,07 – 0,12
Farinha de trigo integral	0,45	0,22	0,34	6,4

FONTE: BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a, b e c; COOPERMAN, 1990; DRISKELL, 1990; GUBLER, 1990; HANKES, 1990; OTTAWAY, 1993; ROCHE, 1996; SANT'ANA, 2003

7. MÉTODOS DE ANÁLISE DE VITAMINAS EM ALIMENTOS

Os requisitos básicos de um método analítico são confiabilidade e robustez. Durante a validação, deve ser demonstrado que o analito permanece estável durante todo processo de extração e que a exatidão e a reprodutibilidade dos resultados obtidos sejam aceitáveis, apresentando baixa incerteza (SHARPLESS, 2000).

Para análise de vitaminas, os métodos também devem ser exatos para todas as formas naturais da vitamina analisada e garantir que todos estes vitâmeros tenham sido extraídos do alimento e medidos (SHARPLESS, 2000).

A etapa de extração é a mais importante do método e depende da natureza da matriz, forma de ocorrência da vitamina (natural ou adicionada), substâncias interferentes presentes e estabilidade dos vitâmeros. Na maioria dos métodos são utilizadas hidrólises ácidas ou alcalinas, seguidas ou não de digestão enzimática (BALL, 1998).

Algumas técnicas de purificação de amostra são utilizadas, como desproteínização, extração com solventes, cromatografia em coluna aberta ou em permeação em gel, diálise e extração em fase sólida (BALL, 1998).

Várias técnicas são aplicadas na análise de vitaminas, sendo o método microbiológico um dos mais tradicionais. A cromatografia gasosa tem sido utilizada para a determinação das vitaminas B₁, PP e B₆, enquanto o maior desenvolvimento tem sido observado na cromatografia líquida de alta eficiência. Recentemente, métodos utilizando a técnica de eletroforese capilar têm sido desenvolvidos para a análise de vitaminas, além de técnicas bioespecíficas, como radioensaio, radioimunoensaio e ELISA (BALL, 1998).

Métodos microbiológicos para determinação de vitaminas são adequados e disponíveis para todos os alimentos, além de responder a todos os vitâmeros presentes. As desvantagens são a infraestrutura necessária e analistas treinados para sua execução, além de ser tedioso e propenso a interferentes. A Tabela 2.7 mostra os microrganismos mais utilizados para análise microbiológica de vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP (OTTAWAY, 1993).

Tabela 2.7: Microrganismos utilizados nas análises de vitaminas por método microbiológico.

Vitamina	Microrganismo	No. ATCC
B₁	<i>Lactobacillus viridescens</i>	12706
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	
B₂	<i>Lactobacillus casei</i>	7469
	<i>Enterococcus faecalis</i>	10100
PP (como ácido nicotínico)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8014
B₆ (total)	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	9080
	<i>Kloeckera apiculata</i>	9774
	<i>Neurospora sitophila</i>	9776
B₆ (vitâmeros)	<i>Saccharomyces faecalis</i> (PL/PM)	
	<i>Lactobacillus casei</i> (PL)	7469
Ácido pantotênico	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8014
	<i>Lactobacillus casei</i>	
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	
	<i>Proteus morganni</i>	
	<i>Pedicoccus acidilacti</i>	
Biotina	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8014
Folatos totais	<i>Lactobacillus casei</i>	7469
B₁₂	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	4797
	<i>O. malhamensis</i>	11532

Fonte: OTTAWAY, 1993.

Praticamente todos os métodos químicos de análise de vitamina B₁ baseiam-se na oxidação alcalina da tiamina pelo ferricianeto de potássio em meio básico com formação de tiocromo, composto que apresenta intensa fluorescência (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993).

Qualquer que seja a técnica utilizada, a etapa de extração da vitamina deve garantir que tanto a tiamina livre como seus ésteres sejam liberados quantitativamente. O processo de extração da vitamina é composto de uma hidrólise ácida, normalmente ácido clorídrico 0,1 M sob aquecimento e agitação

para liberação das formas ligadas à proteína, seguida de hidrólise enzimática para conversão das formas fosforiladas para tiamina livre (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Após a extração, pode ser realizada uma etapa de purificação em coluna de troca iônica antes da oxidação da tiamina a tiocromo. Na determinação por fluorimetria, o tiocromo formado é extraído em isobutanol para sua leitura fluorimétrica (BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Como a tiamina não é volátil e é termosensível, sua determinação por cromatografia gasosa só é possível após a reação com sulfito e formação de 5(2-hidroxietil)-4-metil-tiazol, extraído com solvente orgânico (BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a)

Os métodos por CLAE podem utilizar detecção UV ou fluorescência. A formação de tiocromo pode ser em reação pré ou pós-coluna, após separação em colunas de fase reversa (OTTAWAY, 1993; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

A vitamina B₂ nos alimentos pode estar presente como riboflavina livre ou ligada, normalmente a proteínas, FMN e FAD. Estas formas podem ser determinadas separadamente ou devem ser convertidas à riboflavina. O aquecimento do alimento em meio ácido, normalmente ácido clorídrico 0,1M, hidrolisa parcialmente a FMN a riboflavina e totalmente a FAD a FMN, hidrólise enzimática subsequente garante a conversão completa da FMN a riboflavina (COOPERMAN, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

A FAD ligada covalentemente a enzimas não pode ser medida, pois não é possível sua liberação por hidrólise ácida e enzimática. Para alimentos em que a forma predominante de vitamina é a riboflavina livre ou fracamente ligada à proteína ou para determinação das diferentes formas de vitamina presentes, não há necessidade de hidrólise ácida ou enzimática, sendo suficiente a precipitação das proteínas por acidificação e filtração. (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

A FMN e riboflavina apresentam a mesma intensidade de fluorescência, enquanto fluorescência de FAD é aproximadamente 14% das duas, sendo necessária sua completa conversão a FMN e riboflavina durante a extração, antes da determinação fluorimétrica (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998).

O método oficial da Association of Official Analytical Chemistry (AOAC) utiliza hidrólise ácida seguida de precipitação de proteínas para extração da vitamina B₂, e oxidação dos interferentes com permanganato de potássio e leitura de sua fluorescência natural, antes e depois da adição de hidrossulfito de sódio; este método não é adequado a todos os tipos de amostra (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

Utilizando a quantificação por CLAE, pode-se medir separadamente a riboflavina e FMN. A cromatografia de fase reversa é a mais utilizada, com mistura de solventes com soluções aquosas contendo tampão ou par iônico como fase móvel; a detecção mais utilizada é a de fluorescência, podendo também ser utilizada detecção por UV (COOPERMAN, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

Os processos de extração da vitamina B₂ e tiamina são muito similares, podendo ser utilizado um mesmo processo para as duas vitaminas, bem como a determinação cromatográfica simultânea ou seqüencial (OTTAWAY, 1993).

Todos os seis vitâmeros da vitamina B₆ podem estar presentes nos alimentos e em quantidades diferentes, além da possibilidade de ocorrência de transição entre as diferentes formas devido à presença de várias enzimas em alimentos frescos. Os vitâmeros podem estar ligados à proteína, tornando-os ou não biodisponíveis (OTTAWAY, 1993).

A determinação do teor total de vitamina B₆ em um alimento ou dieta só é possível utilizando diferentes condições de extração. A AOAC indica 5 horas a 121°C com ácido clorídrico 0,055N para alimentos de origem animal e 2 horas a 121°C em ácido clorídrico 0,44N para alimentos de origem vegetal (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

As formas PL, PLP e PN-glucosídeos, presente em tecidos vegetais, são liberadas rapidamente por hidrólise ácida, e a forma conjugada presente em farelos e legumes também pode ser liberada por hidrólise alcalina seguida de hidrólise enzimática com β -glucosidase. Este procedimento leva a superestimativa do teor total de B₆, já que as formas ligadas ao glucosídeo são extraídas, mas não são biodisponíveis (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998).

A eficiência da extração depende da concentração e volume de ácido utilizado. A hidrólise ácida realizada a 121°C com ácido sulfúrico ou clorídrico provoca a defosforilação e hidrólise das formas glicosídicas. Outra técnica de

extração utilizada é a desproteínização, em temperatura ambiente com ácido tricloroacético, sulfossalicílico, perclórico ou metafosfórico, com liberação da vitamina e manutenção da forma glicosídica intacta, seguida de hidrólise enzimática com fosfatase ácida para conversão das formas fosforiladas à vitamina livre ou com β -glicosidase para hidrólise de PN-glicosídeo à PN (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

A determinação de vitamina B₆ por CLAE é realizada em coluna de fase reversa ou troca iônica, precedida ou não de purificação do extrato em colunas abertas. A fase móvel é normalmente composta por mistura de água, solução tampão ou par iônico com solventes orgânicos, como trietilamina, metanol, propanol e acetonitrila. A detecção é por fluorescência, que apresenta maior sensibilidade e seletividade que o UV (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

A cromatografia gás-líquido também pode ser utilizada, após extração dos vitâmeros e derivatização com N-metil-bis-trifluoracetamida com formação de derivados trifluoracetilados de PL, PM e PN que apresentam maior volatilidade (BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Parte da vitamina PP presente no alimento pode estar na forma de éster nicotinil, ligado a polissacarídeos, peptídeos e glicopeptídeos, que não é biodisponível. Na quantificação da niacina, estes ésteres podem ser extraídos e quantificados como vitamina, levando a uma superestimativa do teor vitamínico do alimento. Por outro lado, a niacina presente em cereais não está na forma de ácido livre, mas é biodisponível e, portanto, a determinação da niacina livre pode levar a teores menores (OTTAWAY, 1993; BALL, 2003).

Os termos niacina livre e ligada são definidos pelo método de extração utilizado, sendo considerado niacina total aquela liberada por hidrólise alcalina ou com ácido 1N em autoclave e a niacina livre é frequentemente definida como aquela extraída por autoclavagem com ácido 0,1N (BALL, 1998).

A hidrólise ácida libera a niacina presente no NAD e NADP, mas não hidrolisa os ésteres nicotinil. Condições severas podem hidrolisar toda nicotinamida ao ácido nicotínico, com detecção de somente um composto. Em grãos e cereais imaturos não deve ser utilizada hidrólise alcalina, pois o NAD, presente nestes alimentos, é destruído nestas condições (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998).

O método colorimétrico para determinação de niacina é pouco específico pois baseia-se na reação de Konig-Zincke que responde a todas as pirimidinas substituídas. Os derivados de piridina reagem com brometo cianogênico e uma amina aromática, normalmente o ácido sulfanílico, causando a abertura do anel e produzindo um intermediário que por sua vez reage com amina formando um composto amarelo cuja absorbância é medida fotometricamente (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; SANT'ANA, 2003).

Métodos mais recentes utilizam a CLAE para a determinação de niacina em colunas de fase reversa ou troca iônica e mistura de soluções aquosas com solventes orgânicos como fase móvel. A detecção é realizada em UV (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; SANT'ANA, 2003).

A Tabela 2.8 mostra um resumo das condições de análise por CLAE dos métodos encontrados no levantamento bibliográfico realizado.

A análise simultânea de vitaminas B₁, B₂ e B₆ em alimentos já é bastante comum. Entretanto, não foi encontrado um método que analise simultaneamente as vitaminas B₁, B₂ e os três vitâmeros da vitamina B₆. Quando separados cromatograficamente estes vitâmeros, o método é específico para vitamina B₆. A vitamina PP possui sempre procedimento próprio para sua determinação.

As técnicas de extração utilizadas nas análises destas vitaminas são muito parecidas, mas não há trabalhos relatando uma extração única para determinação das vitaminas B₁, B₂, vitâmeros da B₆ e PP.

Tabela 2.8: Métodos por CLAE utilizados para determinação de vitaminas em alimentos.

Vitamina	Matriz	Preparação amostra	Coluna	Fase Móvel	Compostos analisados	Deteção	Referência
B₁, B₂	Alimentos em geral	Extração em autoclave (121°C por 30 minutos) com ácido clorídrico 0,1M, ajuste de pH em 4,5 com acetato de sódio. Hidrólise enzimática “overnight” a 37°C e filtração em papel de filtro. Filtração em membrana de celulose 0,45µm Reação pré-coluna com solução 0,25% de ferricianeto de potássio em hidróxido de sódio 15%. Purificação em fase sólida.	Novapak C ₁₈ , 4µm, 150 x 3,9 mm (marca Waters)	Isocrática. 30% Metanol / 70% solução tampão 50mM pH 7,0	Tiamina e riboflavina	B ₁ : Fluorescência em $\lambda_{exc.} = 366 \text{ nm}$ / $\lambda_{em.} = 435 \text{ nm}$ Riboflavina: Fluorescência em $\lambda_{exc.} = 445 \text{ nm}$ / $\lambda_{em.} = 522 \text{ nm}$	OLLILAINEN <i>et al</i> , 1993
B₂	Vinhos	Filtração em membrana 0,22 µm e injeção direta no cromatógrafo	ODS C ₁₈ , 5µm, 200 x 2,1 mm (marca Hypersil)	Gradiente: Sol. A-tampão NaH ₂ PO ₄ 0,05M pH 3,0 Sol. B-acetonitrila 0-8min.: 95% A / 5% B 8-12min.: 75% A / 25% B 12min. 95% A / 5% B	Riboflavina, FAD, FMN e outras flavinas	Fluorescência em $\lambda_{exc.} = 265 \text{ nm}$ / $\lambda_{em.} = 525 \text{ nm}$	MATTIVI <i>et al</i> , 2000

Tabela 2.8: Continuação

Vitamina	Matriz	Preparação amostra	Coluna	Fase Móvel	Compostos analisados	Deteccção	Referência
B₆	Alimentos em geral	Extração em autoclave (121°C por 30 minutos para alimentos de origem animal e 5 minutos para vegetais) com ácido clorídrico 0,1M. Ajuste de pH a 4,5 com acetato de sódio. Centrifugação de alíquota (10 minutos, 8500g), filtração, hidrólise enzimática "overnight" a 45°, adição de ácido clorídrico 1M, filtração em membrana celulose 0,45µm	C ₁₈ 3µm, 150 x 4,6 mm (marca Hypersil)	Isocrática. 93% solução tampão / 7% acetonitrila Ajuste de pH da fase móvel após saída da coluna pela adição de solução tampão fosfato	Piridoxol, piridoxal e piridoxamina	Fluorescência em $\lambda_{exc.} = 333 \text{ nm}$ / $\lambda_{em.} = 375 \text{ nm}$	KALL, 2003
B₁, B₂, B₆	Geléia real	Extração em vórtex com ácido tricloroacético 8%, centrifugação e filtração do sobrenadante em filtro celulose 0,45 µm	C ₁₈ , 5µm, 250 x 4,6 mm (marca Vydac)	Isocrática Ácido hexassulfônico:hidróxido de amônia:acetonitrila:água (0,09:0,05:9,02:90,84) pH3,6 ajustado com ácido fosfórico	Tiamina, riboflavina e piridoxol	Tiamina : UV em 245 nm Riboflavina: fluorescência em $\lambda_{exc.} = 450 \text{ nm}$ / $\lambda_{em.} = 525 \text{ nm}$ Piridoxol: fluorescência em $\lambda_{exc.} = 295 \text{ nm}$ / $\lambda_{em.} = 395 \text{ nm}$	PRESOTO, RIOS e ALMEIDA-MURADIAN, 2004

Tabela 2.8: Continuação

Vitamina	Matriz	Preparação amostra	Coluna	Fase Móvel	Compostos analisados	Deteccção	Referência
B₁, B₂, B₆	Alimentos funcionais	Extração a frio com ácido perclórico e hidróxido de potássio. Precipitação de proteínas e perclorato após uma noite em refrigerador. Filtração em papel de filtro e em filtro de celulose 0,45 µm	Pico Tag (C ₁₈ NovaPaK), 300 x 3,9 mm (marca Waters)	Isocrática. 0,95g de ácido hexanossulfônico em 1L de água contendo 9,5% acetonitrila e 0,5 mL de hidróxido de amônia. 930 mL desta solução foi diluída a 1L de água. Reativo pós-coluna: 1g ferricianeto de potássio em 100mL de água. 6 mL desta solução em 100mL de hidróxido de sódio 15% (temperatura reação 55°C)	Tiamina, riboflavina e piridoxol	Tiamina: fluorescência em $\lambda_{exc.} = 360 \text{ nm}$ / $\lambda_{em.} = 435 \text{ nm}$ Riboflavina: fluorescência em $\lambda_{exc.} = 440 \text{ nm}$ / $\lambda_{em.} = 565 \text{ nm}$ Piridoxol: fluorescência em $\lambda_{exc.} = 295 \text{ nm}$ / $\lambda_{em.} = 395 \text{ nm}$	CHASE <i>et al</i> , 1993
B₁, B₂, B₆	Leite	Extração a temperatura ambiente com ácido tricloroacético 50%	C ₁₈ , 5µm, 250 x 4,6 mm (marca Vydac)	Isocrática. 0,95g de ácido hexanossulfônico em 1L de água contendo 9,5% acetonitrila e 0,5 mL de hidróxido de amônia. 93%da sol. 7% água.	Tiamina, riboflavina e piridoxol	Tiamina: UV $\lambda = 245 \text{ nm}$ Riboflavina: UV $\lambda = 275 \text{ nm}$ Piridoxol: fluoresc $\lambda_{exc.}=295\text{nm}$ $\lambda_{em.}=395\text{nm}$	BINACHINI e PENTEADO, 2000

Tabela 2.8: Continuação

Vitamina	Matriz	Preparação amostra	Coluna	Fase Móvel	Compostos analisados	Deteccção	Referência
PP	Carne e peixe cru ou cozidos	Extração ácida em autoclave por 2 horas a 121°C com ácido sulfúrico 2M e posterior purificação em coluna de fase sólida.	Novapak Radial Pak Cartridge C ₈ 4µm, 100 x 8 mm (marca Waters)	Isocrática. 85% solução aquosa 0,005M PIC A / 15% metanol	Niacina	UV em $\lambda = 254$ nm	WINDAHL <i>et al.</i> , 1998
PP	Alimentos em geral	Extração ácida em banho de água fervente por 1h com ácido clorídrico 0,1M. Posterior hidrólise alcalina em autoclave a 120°C por 1 hora.	Lichrospher RP18 endcapped, 5µm, 250 x 5 mm (marca Merck)	Isocrática. Solução 0,07M de hidrogenofosfato de potássio, 5×10^{-6} M de sulfato de cobre e 0,075 M de peróxido de hidrogênio Reação fotoquímica após saída da coluna	Niacina	Fluorescência em $\lambda_{exc.} = 322$ nm / $\lambda_{em.} = 380$ nm	LAHÉLY <i>et al.</i> , 1999
PP	Carnes e vegetais	Hidrólise enzimática com NADase em solução tampão fosfato.	Uptisphere C ₁₈ HDO, 5µm, 150 x 4,6 mm (marca Interchim)	Isocrática. Solução 0,07M de hidrogenofosfato de potássio, 5×10^{-6} M de sulfato de cobre e 0,075 M de peróxido de hidrogênio Reação fotoquímica após saída da coluna	Niacina e niacinamida	Fluorescência em $\lambda_{exc.} = 322$ nm / $\lambda_{em.} = 380$ nm	NDAW <i>et al.</i> , 2002

Tabela 2.8: Continuação

Vitamina	Matriz	Preparação amostra	Coluna	Fase Móvel	Compostos analisados	Deteccção	Referência
B1, B2, B6, B12, PP, PP, ácido fólico e inosina	Fórmulas infantis, cereais infantis	Hidrólise ácida com ácido clorídrico 0,1M por 1 hora a 90°C, seguida de hidrólise enzimática com Taka-díastase a 50°C por 2 horas.	RP-AmideC ₁₆ , 5µm (marca Supelco)	Gradiente. Sol. A: Tampão fosfato 10mM, pH 6 Sol. B: Acetonitrila grau HPLC	Tiamina, riboflavina, niacinamida, niacinam, piridoxol, piridoxal, ácido fólico, cianocobalamina e inosina	UV (arranjo de diodos) em $\lambda = 249, 266, 326$ e 361 nm	VINÃS <i>et al</i> , 2003

8. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi validar um método de extração único para as vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP, com quantificação por CLAE, simultânea para B₁ e B₂ e em condições cromatográficas específicas para vitamina B₆ (três vitâmeros) e PP.

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1. MATERIAL

9.1.1. Amostras

Conforme descrito no Capítulo 1, para a validação da metodologia foram utilizadas amostras de referência para leite em pó e fórmula infantil em pó e bebida instantâneos, obtidos no Centre Nestlé de Reference (CRN) – Lausanne, Suíça. Para a validação de cereais, foram utilizados produtos adicionados ou não de vitaminas em dois níveis diferentes de concentração.

Foram analisadas amostras de produtos comerciais adicionados de vitaminas, apresentando diferentes teores de gordura. As bebidas instantâneas apresentam baixo teor de gordura (1-3%) e nos leites este teor variou de 20-26%, dependendo do produto.

Os cereais utilizados neste trabalho são misturas de farinhas (aveia, cevada, trigo, arroz) que podem ou não conter leite em sua formulação, fazendo com que o teor de gordura varie muito (1-10%) em função do produto. Todos os produtos analisados são adicionados de vitaminas.

Todas as amostras utilizadas, com exceção das amostras de referência, foram adquiridas no mercado local e/ou cedidas por empresas de processamento de alimentos.

9.1.2. Reagentes e Outros Materiais

Os reagentes utilizados nas análises estão listados abaixo:

- Acetato de sódio P.A.
- Acetonitrila grau HPLC
- Ácido clorídrico P.A.
- Ácido orto-fosfórico 85%
- Diastase fúngica para fins bioquímicos
- Dihidrogenofosfato de potássio P.A.
- Ferricianeto de sódio P.A.
- Hidróxido de amônio P.A.
- Hidróxido de sódio P.A.
- Peróxido de hidrogênio 30%
- Sal ácido heptanossulfônico de sódio (PIC-7)
- Sal ácido hexassulfônico de sódio (PIC-6)
- Sulfato de cobre II pentahidratado P.A.
- Pyridoxol Assay Medium
- Niacin Assay Medium
- *Saccharomyces carlsbergensis*
- *Lactobacillus plantarum*

Os padrões utilizados foram o mononitrato de tiamina, riboflavina, cloridrato de piridoxol, cloridrato de piridoxal, dicloridrato de piridoxamina, ácido nicotínico e nicotinamida, todos da marca Merck.

As fases móveis e amostras injetadas no sistema cromatográfico foram filtradas em filtro em membrana de celulose de 0,45 µm de tamanho de poro.

9.1.3. Equipamentos

Para extração das amostras, foi utilizada uma autoclave marca AMSCO, banho de água marca Heraeus, balanças analítica e semi-analítica da marca Mettler.

Foi utilizado um sistema cromatográfico Waters composto de uma bomba modelo 510, um injetor automático modelo WISP717+, dois detectores de fluorescência modelos 474 e 2475, um sistema de reação pós-coluna (bomba pós-coluna Waters, looping de reação e forno de reação Waters) e um sistema de coleta de dados – Millenium 2000 marca Waters. Para análise das vitaminas B₆ e PP, foi utilizado somente um detector de fluorescência, modelo 2475, enquanto para determinação simultânea de B₁ e B₂, os dois detectores (modelos 474 para vitamina B₁ e 2475 para vitamina B₂) foram ligados em série, conforme esquema mostrado na Figura 2.3.

Figura 2.3: Sistema cromatográfico utilizado para determinação simultânea das vitaminas B₁ e B₂.

A vitamina PP foi detectada por fluorescência após reação sob radiação ultravioleta (UV). O sistema de reação pós-coluna é montado conforme mostrado na Figura 2.4.

Figura 2.4: Sistema cromatográfico utilizado para determinação de vitamina PP.

9.2. MÉTODOS

9.2.1. Preparação da amostra

As amostras foram mantidas na embalagem original e estocadas à temperatura ambiente (21-25 °C) até o momento da análise. Quando necessário, as amostras foram trituradas e mantidas em frascos fechados e protegidas da luz até o momento da análise. Amostras de bebidas instantâneas prontas para uso foram mantidas sob refrigeração depois de abertas por, no máximo, 7 dias.

9.2.2. Extração das vitaminas

9.2.2.1. Métodos cromatográficos

A condição de extração utilizada, adaptada de vários trabalhos em literatura, entre eles OLLILAINEN e colaboradores (1993) e KALL (2003), foi hidrólise ácida com ácido clorídrico 0,1N a 100°C por 30 minutos. Após a hidrólise ácida, o pH do extrato foi ajustado em 4,6 com acetato de sódio 2,5M. As amostras contendo amido em sua formulação, de maneira geral os cereais, sofreram hidrólise enzimática após o ajuste de pH. Esta hidrólise é realizada com adição de 0,5g de diastase fúngica ao extrato que depois é mantido por 2 horas a temperatura de 37°C.

Após a hidrólise, os extratos foram transferidos para balões volumétricos âmbar de 100mL, completando-se o volume com água deionizada e filtrados sobre papel de filtro plissado. Os filtrados foram recolhidos em frascos âmbar.

Para análise de vitamina B₁ pelo método de reação pré-coluna, a oxidação da tiamina a tiocromo é realizada com 2mL do extrato da amostra, 3mL de ferricianeto de potássio em meio de hidróxido de sódio 15% durante 2 minutos; após este tempo é adicionado 0,45 mL de ácido orto-fosfórico 85% e o volume completado a 10 mL com água deionizada. Esta solução é filtrada em filtro em membrana de celulose de 0,45 µm de tamanho de poro e injetada no sistema cromatográfico.

Na determinação das vitaminas B₂, B₆, PP e para análise de vitamina B₁ pelo método de reação pós-coluna, os extratos obtidos foram filtrados em filtros em membrana de celulose de 0,45 µm de tamanho de poro para injeção no cromatógrafo.

9.2.2.2. Métodos microbiológicos

A etapa de extração do método microbiológico é diferente para cada vitamina.

Para a vitamina B₆, a extração é realizada com ácido clorídrico 0,044 N em autoclave a 120°C por 1 hora. Após resfriamento do hidrolisado, é ajustado o pH a 4,6 com hidróxido de sódio e o extrato obtido é transferido a balão volumétrico âmbar de 250 ou 500 mL, dependendo da concentração da vitamina na amostra. É completado o volume do balão volumétrico com água deionizada e filtrado o extrato sobre papel de filtro, recolhendo-se o filtrado em frasco âmbar.

A vitamina PP é extraída também em autoclave a 120°C por 30 minutos em ácido clorídrico 1M e então ajustado o pH do hidrolisado a 4,6 com hidróxido de sódio. Transfere-se o extrato para balão volumétrico de 250 ou 500 mL, dependendo da concentração da vitamina na amostra. Completa-se o volume do balão volumétrico com água deionizada e filtra-se o extrato sobre papel de filtro, recolhendo o filtrado.

9.2.3. Condições experimentais

9.2.3.1. Métodos cromatográficos

As condições cromatográficas variam para cada vitamina, sendo as vitaminas B₁ e B₂ analisadas simultaneamente, enquanto as vitaminas B₆ e PP são quantificadas em condições cromatográficas diferentes.

As vitaminas B₂ e B₆ são detectadas diretamente por fluorescência, enquanto as vitaminas B₁ e PP sofrem reação pós-coluna para serem detectadas também por fluorescência.

As condições cromatográficas utilizadas na determinação das vitaminas B₁ e B₂ foram adaptadas de CHASE e colaboradores (1993), utilizando dois detectores de fluorescência em série, sendo possível a quantificação das duas vitaminas em uma única corrida cromatográfica.

A reação sofrida pela vitamina B₁ é a oxidação da tiamina a tiocromo pelo ferricianeto de potássio em meio básico. Esta reação é realizada após a eluição da coluna cromatográfica a 55°C em uma tubulação de 18 metros de comprimento por 0,01 mm de diâmetro interno.

A vitamina PP, após eluição da coluna cromatográfica passa por 12 metros de tubulação de tetrafluoretileno (TFE), 0,5 mm de diâmetro interno, enrolada em uma lâmpada negra emitindo radiação entre 300 a 400 nm, transformando seus vitâmeros em compostos fluorescentes.

A Tabela 2.9 mostra as condições utilizadas na quantificação de cada vitamina.

A fase móvel para determinação das vitaminas B₁ e B₂ é preparada pesando-se 0,95g de ácido hexano-sulfônico-sal sódico (PIC-6) em bquer de 1L onde se adiciona 900 mL de água, 95 mL de acetonitrila grau HPLC e 0,5 mL de hidróxido de amônio P.A. Ajusta-se o pH desta solução a 3,6 com ácido ortofosfórico P.A. e, após este ajuste adiciona-se mais 70 mL de água deionizada e 22 mL de acetonitrila grau HPLC. Filtra-se a fase móvel obtida em filtro em membrana de teflon de 0,45µm de tamanho de poro. A solução para reação pós-coluna da vitamina B₁ é preparada adicionando-se 60 mL de uma solução de ferricianeto de potássio 1% em água em balão volumétrico âmbar de 500 mL; completa-se o volume com solução de hidróxido de sódio 15% e filtra-se em filtro de celulose 0,45µm de tamanho de poro.

Para a determinação de vitamina B₆, pesa-se 6,80g de dihidrogenofosfato de potássio P.A. e 0,14g de sal sódico de ácido heptanossulfônico monohidratado (PIC-7) em um bquer de 1000 mL, adiciona-se aproximadamente 600mL de água deionizada e ajusta-se o pH em 2,5 com ácido ortofosfórico. Transfere-se a solução para balão volumétrico de 1000 mL e completa-se o volume com água deionizada. Filtra-se em filtro de membrana de celulose de 0,45µm de diâmetro de poro. Mistura-se 960 mL deste tampão

fosfato com 40 mL de acetonitrila grau HPLC e degaseificar antes do uso no sistema cromatográfico.

A fase móvel para a análise da vitamina PP deve ser preparada pesando-se, em um balão volumétrico de 1000mL, 9,54g de dihidrogenofosfato de potássio P.A. Dissolve-se o sal em aproximadamente 500 mL de água deionizada e adiciona-se 7,6 mL de peróxido de hidrogênio e 1,0 mL de solução de sulfato de cobre 5mM. Completa-se o volume com água deionizada e filtra-se em filtro de membrana de celulose de 0,45 μ m de diâmetro de poro. Esta fase móvel tem validade de 24 horas.

A cada análise são injetados os padrões e, após a calibração, as amostras. Não há necessidade de limpeza entre as injeções de amostra, porém após o final de toda a corrida analítica, passar pelo menos 30 mL de água deionizada pelo sistema cromatográfico, incluindo a coluna. O sistema cromatográfico e a coluna não devem ser mantidos em água por mais de 24 horas, portanto, após a limpeza, passar pelo menos 10 mL de acetonitrila ou metanol HPLC pelo sistema cromatográfico, inclusive a coluna.

Para a verificação de seletividade do método, os resultados das vitaminas B₁ e B₂ obtidos nas condições descritas acima foram comparadas com os resultados obtidos utilizando fase móvel com 85% de tampão fosfato (pH 7,2) e 15% de dimetilformamida em comprimento de onda $\lambda_{exc} = 368$ nm, $\lambda_{em} = 440$ nm para a vitamina B₁ com reação pré-coluna e $\lambda_{exc} = 450$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm para a vitamina B₂.

Tabela 2.9: Condições cromatográficas para determinação de vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP.

Parâmetro	Vitamina B ₁	Vitamina B ₂	Vitamina B ₆	Vitamina PP
Coluna	C18, esférica, 5µm, 125 x 4,0 mm com pré-coluna		C18, esférica, endcapped, 5µm 250 x 4,0 mm com pré-coluna	C18, esférica, 5µm, 250 x 4,0 mm com pré-coluna
Fase Móvel (FM)	Solução tampão com par iônico pH 3,6 / Acetonitrila		Solução tampão com par iônico pH 2,5 / Acetonitrila	Solução salina de dihidrogenofosfa to de sódio com sulfato de cobre e peróxido de hidrogênio
Fluxo FM	1,0 mL/min.		0,60 mL/min.	1,0 mL/min.
Volume injeção	20 µL			
Comprimento de onda (λ)	λ _{exc} :360nm λ _{em} :435nm	λ _{exc} :450nm λ _{em} :530nm	λ _{exc} :296nm λ _{em} :390nm	λ _{exc} :322nm λ _{em} :380nm
Ganho do detetor	10	1	1	1
Reativo pós coluna	Ferricianeto de potássio em solução de hidróxido de sódio 15%	-	-	-
Fluxo reativo pós-coluna	0,3 mL/min.	-	-	-
Looping de reação	18 metros x 0,01 mm diâmetro interno	-	-	12 metros x 0,5 mm diâmetro interno
Temperatura da reação	55°C	-	-	Ambiente

9.2.3.2. Métodos microbiológicos

Após a extração da vitamina B₆, dilui-se uma alíquota do extrato em 10 mL de meio de cultura específico para determinação de vitamina B₆. Esteriliza-se os tubos de ensaio contendo o meio de cultura e a alíquota da amostra em autoclave, conforme indicação do fabricante do meio de cultura. Após a esterilização, inoculam-se os tubos com o microrganismo *Saccharomyces carlsbergensis* e incuba-se a 30°C por uma noite.

A vitamina PP é determinada diluindo-se o extrato obtido no item 9.2.2.2 em meio de cultura específico para análise de vitamina PP. Esterilizam-se os tubos de ensaio contendo o meio de cultura e a alíquota da amostra em autoclave, conforme indicação do fabricante do meio de cultura. Após a esterilização, inoculam-se os tubos com o microrganismo *Lactobacillus plantarum* e procede-se à incubação por uma noite a 37°C.

O teor de vitamina é calculado por comparação com padrão externo, através da medida da absorvância do meio de cultura produzida pelo crescimento do microrganismo.

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a definição dos parâmetros analíticos para o método cromatográfico, descritos no item 9, foi realizada a validação do método proposto. Os cromatogramas característicos para o padrão e para as amostras analisadas são mostrados nas Figuras 2.5, 2.6, 2.7 e 2.8.

A validação dos métodos foi realizada segundo procedimento descrito no capítulo 1, item 4.2.

Figura 2.5: Cromatogramas característicos da vitamina B₁: **a)** padrão; **b)** leite em pó/fórmula infantil; **c)** cereal; **d)** bebida achocolatada.

Coluna C18, 125x4,6 mm, tampão pH 3,6:acetonitrila, fluxo 1mL/min. Reativo pós-coluna: ferricianeto de potássio em meio básico, 0,3 mL/min. Comprimento de onda: 360/435 nm.

Figura 2.6: Cromatogramas característicos da vitamina B₂: **a)** padrão; **b)** leite em pó/fórmula infantil; **c)** cereal; **d)** bebida achocolatada.
Coluna C18, 125x4,6 mm, tampão pH 3,6:acetonitrila, fluxo 1mL/min.
Comprimento de onda: 450/530 nm.

Figura 2.7: Cromatogramas característicos dos três vitâmeros da vitamina B₆: **a)** padrão; **b)** leite em pó/fórmula infantil; **c)** cereal; **d)** bebida achocolatada. Coluna C18, 250x4,6 mm, tampão pH 2,5:acetonitrila (96:4), fluxo 0,6mL/min. Comprimento de onda: 296/390 nm.

Figura 2.8: Cromatogramas característicos dos dois vitâmeros da vitamina PP: **a)** padrão; **b)** leite em pó/fórmula infantil; **c)** cereal; **d)** bebida achocolatada. Coluna C18, 250x4,6 mm, tampão/sulfato de cobre e peróxido de hidrogênio, fluxo 1mL/min. Comprimento de onda: 322/380 nm.

10.1. CAMPO DE APLICAÇÃO

O método descrito aplica-se a leite em pó, bebidas instantâneas em pó e UHT e cereais, com teores de vitaminas B₁, B₂ e B₆ entre 0,30 a 4,00 mg/100g e vitamina PP variando de 3,0 a 50 mg/100g, aproximadamente.

10.2. LINEARIDADE

A linearidade das vitaminas B₆ e PP foi estudada para cada um dos seus vitâmeros. Os dados médios obtidos, bem como um resumo do resultado das regressões das vitaminas B₁ e B₂ encontram-se na Tabela 2.10 e para os vitâmeros da vitamina B₆ encontram-se na Tabela 2.11.

Tabela 2.10: Dados médios obtidos no estudo de linearidade das vitaminas B₁ e B₂.

Vitamina B ₁			Vitamina B ₂		
Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área	Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=4)	Desvio Padrão U.Área
0,92	55632	4803	1,05	640225	12459
2,30	172560	6503	2,63	1538008	17402
4,59	385577	25069	5,26	3084328	73396
9,18	824449	23049	10,52	6151841	126876
18,36	1811213	31870	21,04	12846849	302011
45,90	4359962	173337	52,60	31138578	295262
Inclinação da reta: 96282,95			Inclinação da reta: 593462,7		
Intersecção da reta: - 35560,9			Intersecção da reta: 24741,52		
R ² : 0,997817			R ² : 0,999788		

Massa inj.: massa injetada; **U.Área** : unidades de área; **n:** número de injeções.

Tabela 2.11: Dados obtidos no estudo de linearidade dos vitâmeros da vitamina B₆.

Vitamina B ₆								
Piridoxol			Piridoxal			Piridoxamina		
Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área	Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área	Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área
1,0	216391	3985	0,4	80810	4238	0,4	133491	5900
2,0	434522	12129	1,0	216975	24215	1,0	351026	12728
4,0	883026	17161	2,0	391094	8093	2,0	759947	89634
8,0	1806832	22053	4,0	804346	14521	4,0	1579027	176472
20,0	4471145	22318	8,0	1669962	22055	8,0	2789257	21734
40,0	8979756	44348	20,0	4249846	56694	20,0	7700695	86310
100,0	20345514	409341	40,0	7780825	127889	40,0	14003184	261614
Inclinação da reta: 204125,4 Intersecção da reta: 202176,5 R ² : 0,99788			Inclinação da reta: 196527,9 Intersecção da reta: 53664,4 R ² : 0,997717			Inclinação da reta: 353856,0 Intersecção da reta: 90840,6 R ² : 0,997108		

Massa inj.: massa injetada; **U.Área** : unidades de área; **n:** número de injeções.

Os dados obtidos no estudo de linearidade para os vitâmeros da vitamina PP (niacina e niacinamida) encontram-se na Tabela 2.12.

Tabela 2.12: Dados obtidos no estudo de linearidade para niacina e niacinamida.

Vitamina PP					
Niacina			Niacinamida		
Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=4)	Desvio Padrão U.Área	Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=4)	Desvio Padrão U.Área
0,5	31236	1949	9,6	1439713	5985
0,9	46419	1034	19,3	2131153	4882
1,9	82005	1869	38,6	3367873	15489
4,6	212795	948	96,4	7901199	47429
9,3	448673	1870	192,8	17576572	19605
18,6	834115	8639	482,0	40722712	552379
37,1	1759083	48983	964,0	87505343	2390929
Inclinação da reta: 47033,02			Inclinação da reta: 89768,01		
Intersecção da reta: -2054,42			Intersecção da reta: -168604		
R²: 0,999119			R²: 0,998611		

Massa inj.: massa injetada; **U.Área** : unidades de área; **n:** número de injeções.

A Figura 2.9 mostra a reta de regressão e a variação da razão resposta/concentração das vitaminas B₁ e B₂. Estas informações para os vitâmeros da B₆ encontram-se na Figura 2.10 e para a PP, na Figura 2.11.

Figura 2.9: Gráficos de linearidade e variação de resposta com a massa injetada das vitaminas B₁ e B₂.

Figura 2.10: Gráficos de linearidade e variação de resposta com a massa injetada dos vitâmeros da vitamina B₆.

Figura 2.11: Gráficos de linearidade e variação de resposta com a massa injetada dos vitâmeros da vitamina PP.

10.3. FAIXA DE TRABALHO E FAIXA LINEAR DE TRABALHO

Após avaliação dos gráficos construídos durante o estudo da linearidade, pode-se definir a faixa linear de trabalho para cada composto analisado.

Todos os compostos apresentaram-se lineares na faixa estudada, entretanto a razão resposta/massa injetada apresentada não é independente da concentração em toda faixa estudada. Assim sendo, a faixa linear de trabalho é limitada à região de concentração onde a relação resposta/massa permanece praticamente inalterada.

As faixas de trabalho definidas para cada composto estudado são apresentadas na Tabela 2.13.

Tabela 2.13: Faixa de trabalho para vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP.

Vitaminas	Faixa Linear de Trabalho (ng injetado)
B ₁ – tiamina	5 – 50
B ₂ – riboflavina	2 – 50
B ₆ – álcool	1 – 100
B ₆ – aldeído	2 – 40
B ₆ – amina	2 – 40
PP – niacina	0,5 – 20
PP – niacinamida	40 – 1000

10.4. SENSIBILIDADE

A partir do estudo de linearidade, obtém-se o valor de sensibilidade do método, como a inclinação da curva padrão. A Tabela 2.14 mostra os valores obtidos a partir da curva de calibração construída no estudo de linearidade para cada vitâmetro.

Tabela 2.14: Valores de sensibilidade obtidos para cada vitâmetro.

Vitamina	Sensibilidade (U. Área/ng injetado)
B ₁ – tiamina	96283
B ₂ – riboflavina	593463
B ₆ – piridoxol	204125
B ₆ – piridoxal	196528
B ₆ – piridoxamina	353856
PP – niacina	47033
PP – niacinamida	89768

U.Área: unidades de área

10.5. PRECISÃO

Os resultados da avaliação de precisão realizada em produtos encontram-se na Tabela 2.15.

O desvio padrão obtido e o limite de repetibilidade calculado para cada material de referência analisado encontram-se na Tabela 2.16.

Tabela 2.15: Desvio padrão e limite de repetibilidade para as vitaminas analisadas em cereais.

Produto	Vit. B ₁ (mg/100g)		Vit. B ₂ (mg/100g)		Vit. B ₆ (mg/100g)		Vit. PP (mg/100g)	
	Desvio Padrão	r	Desvio Padrão	r	Desvio Padrão	r	Desvio Padrão	r
Cereal – nível 1	0,08	0,22	0,005	0,01	0,01	0,03	0,2	0,6
	Valor médio 0,49 mg/100g		Valor médio 0,07 mg/100g		Valor médio 0,84 mg/100g		Valor médio 10,4 mg/100g	
Cereal – nível 2	0,05	0,14	0,02	0,06	0,03	0,08	0,4	1,1
	Valor médio 1,63 mg/100g		Valor médio 0,46 mg/100g		Valor médio 1,87 mg/100g		Valor médio 17,6 mg/100g	

r: Limite de repetibilidade.

Tabela 2.16: Desvio padrão e limite de repetibilidade para as vitaminas analisadas.

Material de referência	Vit. B1 (mg/100g)		Vit. B2 (mg/100g)		Vit. B6 (mg/100g)		Vit. PP (mg/100g)	
	Desvio Padrão	r	Desvio Padrão	r	Desvio Padrão	r	Desvio Padrão	r
Leite / fórmula infantil – nível 1	0,02	0,06	0,01	0,03	0,01	0,03	0,05	0,14
	Valor referência 0,33 mg/100g		Valor referência 1,34 mg/100g		Valor referência 0,42 mg/100g		Valor referência 3,25 mg/100g	
Leite / fórmula infantil – nível 2	0,02	0,06	0,01	0,03	0,01	0,03	0,03	0,08
	Valor referência 0,89 mg/100g		Valor referência 1,55 mg/100g		Valor referência 0,77 mg/100g		Valor referência 6,01 mg/100g	
Bebida instantânea – nível 1	0,03	0,08	0,02	0,06	0,08	0,2	0,22	0,6
	Valor referência 0,97 mg/100g		Valor referência 2,20 mg/100g		Valor médio 3,09 mg/100g *		Valor referência 20,12 mg/100g	
Bebida instantânea – nível 2	0,15	0,42	0,05	0,14	0,11	0,3	0,66	1,85
	Valor referência 2,41 mg/100g		Valor referência 3,60 mg/100g		Valor médio 4,13 mg/100g *		Valor referência 23,20 mg/100g	

r: limite de repetibilidade.

* : encontrado somente cloridrato de piridoxol na amostra.

10.6. EXATIDÃO

A exatidão do método foi avaliada com material de referência para leite em pó e bebida instantânea e por recuperação de padrão adicionado para os cereais.

A média dos resultados obtidos para material de referência encontra-se na Tabela 2.17.

Tabela 2.17: Resultados obtidos em análise de materiais de referência.

Material de referência	Vit. B1 (mg/100g)		Vit. B2 (mg/100g)		Vit. B6 (mg/100g)		Vit. PP (mg/100g)	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Leite / fórmula infantil – nível 1	0,37	0,02	1,28	0,01	0,40	0,01	3,86	0,05
	Valor referência 0,33 ± 0,03		Valor referência 1,34 ± 0,13		Valor referência 0,42 ± 0,07		Valor referência 3,25 ± 0,72	
Leite / fórmula infantil – nível 2	0,77	0,02	1,41	0,01	0,77	0,01	6,30	0,03
	Valor referência 0,89 ± 0,089		Valor referência 1,55 ± 0,15		Valor referência 0,70 ± 0,11		Valor referência 6,01 ± 0,82	
Bebida instantânea – nível 1	1,21	0,03	2,23	0,02	-	-	18,88	0,22
	Valor referência 0,97 ± 0,143		Valor referência 2,20 ± 0,09		-		Valor referência 20,12 ± 2,96	
Bebida instantânea – nível 2	2,49	0,15	3,81	0,05	-	-	28,40	0,66
	Valor referência 2,41 ± 0,37		Valor referência 3,60 ± 0,17		-		Valor referência 23,20 ± 1,36	

Os dados médios obtidos para os materiais de referência, em função do z-Score, estão plotados na Figura 2.12.

Figura 2.12: Representação gráfica dos valores de z-Score obtidos para média dos resultados dos materiais de referência para cada vitamina estudada.

A recuperação média e o desvio padrão obtido para as vitaminas B₁ e B₂ nos dois níveis de concentração estudados por adição de padrão em cereais são mostrados na Tabela 2.18.

Tabela 2.18: Resultados de recuperação de padrão em cereais para vitaminas B₁ e B₂.

Produto	Vit. B ₁ (%)		Vit. B ₂ (%)	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Cereal – nível 1	93	11	92	1
	Valor médio 0,49 mg/100g		Valor médio 0,07 mg/100g	
Cereal – nível 2	110	7	84	7
	Valor médio 1,63 mg/100g		Valor médio 0,46 mg/100g	

Foi estudada a recuperação para os três vitâmeros da vitamina B₆ em bebida instantânea e em cereais e os resultados médios e seus respectivos desvios padrão encontram-se na Tabela 2.19.

Tabela 2.19: Resultados de recuperação de padrão em cereais para vitâmeros da vitamina B₆.

Produto	Vit. B ₆ (%)					
	Piridoxol		Piridoxal		Piridoxamina	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Bebida instantânea – nível 1	102	3	102	2	109	4
	Valor médio = 3,09 mg/100g					
Bebida instantânea – nível 2	96	3	108	4	78	9
	Valor médio = 4,13 mg/100g					
Cereal – nível 1	98	3	77	6	96	2
	Valor médio = 0,84 mg/100g					
Cereal – nível 2	99	1	103	4	107	5
	Valor médio = 1,87 mg/100g					

Para a vitamina PP foi estudada a exatidão em cereais por recuperação de padrão adicionado. Foram considerados somente resultados de niacinamida, uma vez que não foram detectados teores de niacina nesta matriz. Os resultados encontram-se na Tabela 2.20.

Tabela 2.20: Resultados de recuperação de padrão em cereais para vitamina PP (niacinamida).

Produto	Vit. PP (%)	
	Média	Desvio Padrão
Cereal – nível 1	101	7
	Valor médio 10,4 mg/100g	
Cereal – nível 2	104	7
	Valor médio 17,6 mg/100g	

10.7. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O cálculo dos limites de detecção e quantificação foi realizado medindo-se a linha de base e o pico de um padrão diluído o suficiente para permitir estas duas medidas em um mesmo cromatograma.

Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para as vitaminas estudadas encontram-se na Tabela 2.20.

Tabela 2.20: Limite de detecção e quantificação do método para as vitaminas estudadas.

Vitaminas	Limite de Detecção (mg/100g)	Limite de Quantificação (mg/100g)
B ₁ – tiamina	0,05	0,15
B ₂ - riboflavina	0,006	0,02
B ₆ – piridoxol	0,007	0,02
B ₆ – piridoxal	0,004	0,01
B ₆ – piridoxamina	0,003	0,01
PP – niacina	0,02	0,07
PP - niacinamida	0,10	0,34

10.8. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

Os resultados obtidos para os materiais de referência utilizados durante a validação garantem a especificidade do método para leite em pó e bebidas instantâneas em pó.

Conforme descrito no Capítulo 1, também foram comparados resultados obtidos pelo método proposto com resultados obtidos por outro método.

A Tabela 2.21 mostra, separado por grupo de produto, os resultados de vitamina B₁ e B₂ obtidos por dois diferentes métodos cromatográficos.

Tabela 2.21: Resultados de vitamina B₁ e B₂ obtidos por dois métodos cromatográficos.

Produtos	Vitamina B ₁ (mg/100g)		Vitamina B ₂ (mg/100g)	
	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2
Leites e Fórmulas infantis em pó	0,25	0,29	0,99	1,08
	0,25	0,26	1,21	1,23
	0,75	0,88	1,32	1,27
	0,47	0,65	1,37	1,32
	0,36	0,41	0,15	0,14
	0,51	0,59	1,15	1,20
	0,73	0,80	1,15	1,06
	0,02	0,03	0,24	0,15
	0,64	0,62	1,23	0,92
	0,65	0,59	1,53	1,20
	0,33	0,37	1,58	1,23
	0,89	0,77	1,55	1,43
Bebidas instantâneas	1,83	1,72	3,60	3,81
	3,30	3,87	2,46	2,06
	1,07	1,86	0,25	0,24
	2,61	2,32	0,25	0,24
	0,27	0,28	3,30	4,56
	3,65	3,80	2,84	2,13
	3,05	2,35	2,25	2,25
	2,04	2,59	2,34	2,29
	2,01	2,07	2,20	2,24
	0,97	1,21	3,60	3,85
	2,41	2,49	2,20	2,23
Cereais	0,50	0,57	0,82	0,90
	1,58	1,66	0,74	0,81
	0,60	0,94	0,09	0,12
	0,56	0,54	0,07	0,07
	0,44	0,51	0,05	0,05
	1,48	1,61	0,72	0,74
	0,86	0,98	0,29	0,26
	0,62	0,64	0,99	0,73
	0,50	0,61	0,96	1,05
	0,92	1,10	1,46	1,55
	1,83	1,64	0,10	0,14
	1,70	1,64	0,06	0,09
	0,42	0,45	1,33	1,40
	1,47	1,65	0,56	0,32
	1,48	1,76	0,08	0,14

Método 1: Reação pré-coluna para vitamina B₁ e fase móvel tampão/dimetilformamida para B₁ e B₂, com determinação cromatográfica individual. **Método 2:** Determinação simultânea de vitaminas B₁ e B₂, com reação pós-coluna para vitamina B₁.

O método indicado como 1 refere-se ao método de vitamina B₁ utilizando reação pré-coluna e a vitamina B₂ determinada em fase móvel tampão/dimetilformamida, enquanto o método 2 é o método proposto. A Figura 2.13 mostra os gráficos com os dados obtidos para vitamina B₁ e os gráficos referentes à vitamina B₂ encontram-se na Figura 2.14.

Método 1: Reação pré-coluna e fase móvel tampão/dimetilformamida. **Método 2:** Determinação simultânea de vitaminas B₁ e B₂, com reação pós-coluna para vitamina B₁.

Figura 2.13: Gráficos mostrando os dados de comparação de métodos para vitamina B₁.

Método 1: Fase móvel tampão/dimetilformamida com determinação cromatográfica individual. **Método 2:** Determinação simultânea de vitaminas B₁ e B₂.

Figura 2.14: Gráficos mostrando os dados de comparação de métodos para vitamina B₂.

Os resultados das vitaminas B₆ e PP obtidos pelo método proposto foram comparados com os resultados obtidos por métodos microbiológicos de análise de vitaminas. Os dados avaliados encontram-se na Tabela 2.22, onde método A identifica o método microbiológico e o método B o de CLAE. A Figura 2.15 mostra os gráficos com os dados obtidos para vitamina B₆ e, os gráficos referentes à vitamina PP encontram-se na Figura 2.16.

Tabela 2.22: Resultados de vitamina B₆ e PP obtidos pelo método cromatográfico e microbiológico.

Produtos	Vitamina B6(mg/100g)		Vitamina PP(mg/100g)	
	Método A	Método B	Método A	Método B
Leite e Fórmula infantil em pó	0,39	0,38	15,2	15,2
	1,16	1,11	5,3	5,4
	0,66	0,76	9,2	8,8
	0,55	0,60	8,3	8,3
	0,59	0,68	14,7	15,2
	1,67	1,68	6,5	4,3
	1,28	1,55	9,8	9,5
	0,61	0,58	5,5	5,8
	1,62	1,69	6,2	5,3
	0,61	0,59	15,2	15,2
	0,47	0,44	5,3	5,4
	1,47	1,44	9,2	8,8
Bebidas instantâneas	3,64	3,58	-	-
	0,86	0,92	-	-
	0,92	0,80	-	-
	0,40	0,43	-	-
	0,38	0,40	-	-
	0,38	0,42	-	-
	0,28	0,31	-	-
	3,20	3,30	-	-
	3,41	3,10	-	-
	0,37	0,32	-	-
	2,61	2,56	-	-
	2,42	2,57	-	-
	2,56	2,66	-	-
	0,34	0,28	-	-
	0,37	0,32	-	-
	0,93	0,89	-	-
	3,18	3,35	-	-
	3,18	3,44	-	-
Cereais	2,69	1,83	4,4	4,9
	2,04	1,22	9,6	9,1
	2,05	1,87	29,6	25,0
	1,84	1,83	21,7	19,2
	4,20	3,51	28,7	30,4
	2,33	2,13	18,2	15,2
	3,54	2,87	14,8	10,7
	5,51	5,87	-	-
	0,88	0,96	-	-
	1,88	2,04	-	-

Método A: Método microbiológico para determinação de vitaminas B₆ e PP;

Método B: Método por CLAE.

Figura 2.15: Gráficos mostrando os dados de comparação de métodos para vitamina B₆.

Figura 2.16: Gráficos mostrando os dados de comparação de métodos para vitamina PP.

O resultado da avaliação estatística das diferenças obtidas entre os resultados encontra-se na Tabela 2.23 e mostra que os resultados obtidos por diferentes métodos são estatisticamente iguais, comprovando a especificidade do método proposto. Além disso, como os métodos chamados de referência são validados pode-se demonstrar também a exatidão do método proposto.

Tabela 2.23: Resultados da avaliação de especificidade do método proposto.

Vitaminas	Leites e Fórmulas infantis em pó		Bebidas instantâneas		Cereais	
	Diferença média	R ²	Diferença média	R ²	Diferença média	R ²
B ₁	0,04 ± 0,078	0,902	0,08 ± 0,394	0,843	0,075 ± 0,12	0,938
B ₂	-0,07 ± 0,14	0,900	0,0 ± 0,209	0,882	0,03 ± 0,060	0,954
B ₆	0,0 ± 0,0596	0,969	0,025 ± 0,10	0,992	-0,19 ± 0,584	0,902
PP	0,0 ± 0,477	0,973	-	-	-2,49 ± 3,083	0,935

R²: Coeficiente de determinação da reta de regressão.

Diferença média ± erro

10.9. ROBUSTEZ

Para avaliação da robustez dos métodos, foi aplicado o teste de Youden conforme descrito no Capítulo 1.

Os fatores avaliados, bem como os valores utilizados nos ensaios, para as matrizes leite em pó/fórmulas infantis e bebidas instantâneas estão na Tabela 2.24.

Tabela 2.24: Fatores e respectivos valores utilizados para determinação da robustez do método para leite em pó/fórmulas infantis e bebidas instantâneas

Fator	Nominal	Varição
Tamanho da amostra	5g	6g
Concentração ácida	0,1 M	0,08 M
Temperatura de extração	100°C	~ 97°C (banho de água fervente)
Tempo de extração	30 min.	35 min.
pH do extrato	4,6	4,8

Para cada fator estudado, foi calculada a média dos 4 resultados obtidos com os valores nominais e a média dos 4 resultados obtidos com os valores variados. A partir destas médias calcular um fator, chamado efeito, como a

diferença entre a média dos resultados obtidos com os valores nominais e a média dos resultados obtidos com os valores variados.

A Tabela 2.25 mostra as combinações dos diversos fatores e os resultados obtidos no ensaio destas combinações para leite em pó/fórmulas infantis. Os fatores calculados a partir destes resultados encontram-se na Tabela 2.26.

Tabela 2.25: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método para leite em pó/fórmulas infantis e valores obtidos para cada combinação estudada.

Fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tamanho da amostra (g)	5	5	5	5	6	6	6	6
Concentração ácida (M)	0,1	0,1	0,08	0,08	0,1	0,1	0,08	0,08
Temperatura de extração (°C)	100	~97	100	~97	100	~97	100	~97
Tempo de extração (min.)	30	30	35	35	35	35	30	30
pH do extrato	4,6	4,8	4,6	4,8	4,8	4,6	4,8	4,6
Vitamina B₁ (mg/100g)	0,22	0,25	0,22	0,25	0,28	0,28	0,23	0,33
Vitamina B₂ (mg/100g)	1,06	1,05	1,02	1,03	1,08	1,03	1,04	1,04
Vitamina B₆ (mg/100g)	0,45	0,44	0,45	0,44	0,45	0,44	0,45	0,44
Vitamina PP (mg/100g)	4,95	4,98	4,97	5,01	4,97	5,00	4,98	5,10

Tabela 2.26: Efeitos calculados para cada fator estudado na matriz de leite em pó/fórmulas infantis, para as vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP.

Vitaminas	Efeito				
	Tamanho da amostra	Concentração ácida	Temperatura de extração	Tempo de extração	pH do extrato
B₁	-0,02	0,025	-0,015	-0,025	-0,015
B₂	-0,0075	0,0225	0,0125	0,0075	-0,0125
B₆	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
PP	-0,035	-0,04	-0,055	0,015	0,02

Comparando os efeitos calculados com o limite de repetibilidade do método para cada vitamina na matriz leite em pó/fórmula infantil, verifica-se que todos os efeitos são menores que este limite. Isto significa que nenhum dos fatores estudados é crítico para determinação de vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP em leite em pó/fórmula infantil pelo método estudado.

Os resultados obtidos no estudo de robustez para a matriz bebida instantânea encontram-se na Tabela 2.27 e os efeitos calculados a partir destes resultados encontram-se na Tabela 2.28.

Tabela 2.27: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método para bebidas instantâneas e valores obtidos para cada combinação estudada.

Fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tamanho da amostra (g)	5	5	5	5	6	6	6	6
Concentração ácida (M)	0,1	0,1	0,08	0,08	0,1	0,1	0,08	0,08
Temperatura de extração (°C)	100	~97	100	~97	100	~97	100	~97
Tempo de extração (min.)	30	30	35	35	35	35	30	30
pH do extrato	4,6	4,8	4,6	4,8	4,8	4,6	4,8	4,6
Vitamina B₁ (mg/100g)	3,40	3,05	3,23	3,00	3,54	3,45	3,07	3,60
Vitamina B₂ (mg/100g)	3,96	3,79	4,15	4,00	3,75	3,88	3,84	3,84
Vitamina PP (mg/100g)	27,87	28,01	28,61	28,51	27,35	28,44	28,19	28,17

Tabela 2.28: Efeitos calculados para cada fator estudado na matriz de bebidas instantâneas, para as vitaminas B₁, B₂ e PP.

Vitaminas	Efeito				
	Tamanho da amostra	Concentração ácida	Temperatura de extração	Tempo de extração	pH do extrato
B₁	0,245	0,135	0,035	-0,025	0,255
B₂	0,1475	-0,1125	0,0475	-0,0875	0,1125
PP	0,2125	-0,4525	-0,2825	-0,1675	0,2575

Verifica-se que nenhum efeito calculado para bebida instantânea é maior que o limite de repetibilidade obtido pelo método para esta matriz, o que mostra que nenhum dos fatores estudado é crítico para bebida instantânea neste método.

As Tabelas 2.29, 2.30 e 2.31 mostram os fatores e valores estudados, bem como os dados obtidos para a robustez do método para cereais.

Tabela 2.29: Fatores e respectivos valores utilizados para determinação da robustez do método para cereais.

Fator	Nominal	Variação
Tamanho da amostra	5g	6g
Concentração ácida	0,1 M	0,08 M
Temperatura de extração	100°C	~ 97°C (banho de água fervente)
Tempo de extração	30 min.	35 min.
pH do extrato	4,6	4,8
Quantidade de enzima	0,5g	0,4g
Tempo da reação enzimática	120 min.	105 min.

Tabela 2.30: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método para cereais e valores obtidos para cada combinação estudada.

Fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tamanho da amostra (g)	5	5	5	5	6	6	6	6
Concentração ácida (M)	0,1	0,1	0,08	0,08	0,1	0,1	0,08	0,08
Temperatura de extração (°C)	100	~97	100	~97	100	~97	100	~97
Tempo de extração (min.)	30	30	35	35	35	35	30	30
pH do extrato	4,6	4,8	4,6	4,8	4,8	4,6	4,8	4,6
Quantidade de enzima (g)	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5
Tempo da reação enzimática (min.)	120	105	105	120	105	120	120	105
Vitamina B₁ (mg/100g)	0,58	0,64	0,93	0,70	0,68	0,76	0,69	0,68
Vitamina B₂ (mg/100g)	0,59	0,63	0,58	0,58	0,54	0,57	0,56	0,58
Vitamina B₆ (mg/100g)	0,28	0,30	0,29	0,28	0,22	0,23	0,18	0,18
Vitamina PP (mg/100g)	3,35	3,17	3,59	3,55	3,24	3,68	3,28	3,79

Os efeitos calculados para cada vitamina em cereais são menores que o limite de repetibilidade do método, mostrando que os fatores estudados não são críticos para esta determinação.

Tabela 2.31: Efeitos calculados para cada fator estudado na matriz de cereais, para as vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP.

Vitaminas	Efeito						
	Tamanho da amostra	Concentração ácida	Temperatura de extração	Tempo de extração	pH do extrato	Quantidade de enzima	Tempo reação enzimática
B₁	0,01	-0,085	0,025	-0,12	0,06	0,065	-0,05
B₂	0,0325	0,0075	-0,0225	0,0225	0,0025	-0,0125	-0,0075
B₆	0,085	0,025	-0,005	-0,02	0,00	0,01	-0,005
PP	-0,0825	-0,1925	-0,1825	-0,1175	0,2925	0,0525	0,0175

Avaliando todos os valores de efeito calculados para todas as vitaminas e matrizes, verifica-se que são todos menores que o limite de repetibilidade calculado para cada vitamina e matriz, mostrando que o método é indiferente a pequenas variações de massa de amostra, temperatura, tempo de extração ácida e enzimática.

10.10. INCERTEZA DA MEDIDA

Utilizando os dados de validação obtidos para o método proposto e seguindo o procedimento descrito em EURACHEM (2002) e adaptado por NESTLÉ (2002), calculou-se a incerteza da medida para o método proposto.

Para melhor visualizar as fontes de incerteza, a Figura 2.17 apresenta um fluxograma do método analítico.

Figura 2.17: Fluxograma do método de análise de vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os teores de vitaminas são calculados segundo a equação abaixo:

$$\text{Vitamina (mg/100g)} = \frac{(\text{Área}_{\text{am}} - \text{Constante}_{\text{curva}})}{\text{Inclinação}_{\text{curva}}} * \frac{V_{\text{am}}}{\text{Massa}_{\text{am}} * V_{\text{inj}}} * \frac{1}{R}$$

Onde:

Área_{am} : unidade de área do pico da amostra;

$\text{Constante}_{\text{curva}}$: Constante da curva de calibração utilizada na quantificação da vitamina;

$\text{Inclinação}_{\text{curva}}$: Inclinação da curva de calibração utilizada na quantificação da vitamina;

V_{am} : Volume para o qual é transferida a amostra após a extração (normalmente 100mL);

M_{am} : massa de amostra

V_{inj} : Volume de amostra injetado no sistema cromatográfico

R: recuperação do método

Cada termo da equação de cálculo possui uma série de fontes de incerteza. Para melhor visualizar e facilitar o cálculo desta grandeza constrói-se um diagrama de causa e efeito considerando como eixo principal a vitamina quantificada, cada seta lateral a este eixo representa um termo da equação e nestes setas são indicados os fatores que contribuem para a incerteza deste termo. Depois de computadas todas as incertezas de cada termo, estes valores são associados para a determinação da incerteza do método. A Figura 2.18 apresenta o diagrama de causa e efeito utilizado para o cálculo da incerteza do método apresentado.

Figura 2.18: Diagrama de causa e efeito baseado na equação de cálculo dos teores de vitamina pelo método cromatográfico proposto.

A incerteza proveniente da repetibilidade que afeta a massa, volume e área da amostra pode ser agrupada em um único termo que já foi quantificado durante a validação do método no item precisão. A intersecção e inclinação da reta estão relacionadas no erro inerente ao modelo de regressão linear e, portanto, são quantificados em conjunto. A partir destas considerações, é possível refinar o diagrama de causa e efeito, tornando mais aparente as incertezas que devem ser quantificadas.

A Figura 2.19 apresenta o diagrama de causa e efeito refinado. A partir das definições efetuadas, a incerteza para cada nível de concentração validado para cada vitamina é calculada separadamente.

Figura 2.19: Diagrama de causa e efeito refinado.

10.10.1. Vitamina B₁

Seguindo o diagrama de causa e efeito refinado, apresentado na Figura 2.14, deve-se quantificar a incerteza de cada termo da equação de cálculo, representado pelas setas laterais no diagrama.

- **Repetibilidade:** obtido a partir dos dados de validação do método, apresentados nas Tabelas 2.15 e 2.16.
- **Calibração:** a partir dos dados obtidos durante o estudo de linearidade determina-se o erro do modelo linear. Conforme descrito no Capítulo 1, esta incerteza é calculada como o desvio padrão dos resíduos da curva dividido pela sua inclinação que dá o valor de **0,777578 ng injetado**.

Para o cálculo do erro proveniente do preparo das soluções padrão, considera-se o erro referente à pureza do padrão, sua pesagem e posteriores diluições. O erro proveniente da pureza do padrão é normalmente obtido do fornecedor deste padrão, a massa do padrão é afetada pela repetibilidade da pesagem e a não-linearidade da balança. Os volumes são afetados pela repetibilidade da operação, tolerância do material volumétrico e temperatura do ambiente, sendo que este último fator é desconsiderado devido à sua pouca influência quando comparado com os dois primeiros. Assim sendo, a Tabela 2.32 apresenta o erro proveniente da preparação das soluções padrão para cada concentração utilizada na curva de calibração, incluindo o volume injetado no cromatógrafo.

Tabela 2.32: Incerteza proveniente da preparação das soluções de calibração.

Massa injetada (ng)	Incerteza (ng)
2,5	0,028998445
5,0	0,058129847
10,0	0,116236641
20,0	0,234245882
50,0	0,579894746

O valor utilizado no cálculo da incerteza em função do nível de concentração estudado é a média dos valores de massa injetada e da incerteza da preparação das soluções de calibração, respectivamente, **17,5 e 0,203501112 ng injetado**.

- **Volume da amostra:** a amostra é transferida para balão volumétrico de 100mL que apresenta tolerância de $\pm 0,10\text{mL}$. Utilizando as características da distribuição triangular, divide-se o valor de tolerância do balão volumétrico por $\sqrt{6}$ e obtém-se o desvio padrão do volume de 0,040824829mL.

A repetibilidade da operação foi 0,04 mL, calculada como o desvio padrão de 10 repetições de ajuste do volume em balão volumétrico de 100mL.

Utilizando o cálculo de propagação de erros, obtém-se a incerteza do volume da amostra **$u(100\text{mL}) = 0,0571547607\text{mL}$** .

- **Volume injetado:** o volume injetado da amostra no sistema cromatográfico é 20 μL . Considerando-se o desvio padrão máximo do injetor automático WISP717+ (0,5%), tem-se a tolerância de $\pm 0,1\mu\text{L}$. Utilizando as características da distribuição triangular, divide-se o valor de tolerância do injetor por $\sqrt{6}$ e obtém-se o desvio padrão do volume **$u(20\mu\text{L}) = 0,040824829\mu\text{L}$** .
- **Massa da amostra:** a não-linearidade da balança, obtida do manual do fabricante, utilizada para pesagem da amostra é de $\pm 0,02\text{g}$. Utilizando as características da distribuição retangular, divide-se o valor de não-linearidade da balança por $\sqrt{3}$ e obtém-se seu desvio padrão (0,0115470054g). Este valor deve ser computado duas vezes, uma para a tara e outra para a pesagem da amostra, obtendo-se assim o desvio padrão para a massa da amostra **$u(\text{massa amostra}) = 0,0163299316\text{g}$** .
- **Exatidão:** a partir dos dados obtidos durante a validação do método e seguindo o procedimento descrito no Capítulo 1, verifica-se estatisticamente a presença de tendência e calcula-se a incerteza da exatidão. Caso o método apresente tendência para alguma matriz e/ou nível de concentração estudados, os resultados não serão

corrigidos em função da recuperação obtida, portanto o desvio padrão obtido durante a validação será estendido e o valor de recuperação utilizado na planilha do cálculo da incerteza será sempre 1 (100% recuperação média). Os dados obtidos para cada matriz e cada nível de concentração encontram-se na Tabela 2.33.

Tabela 2.33: Valores de incerteza da exatidão para as matrizes estudadas nos diferentes níveis de concentração.

Matriz-Nível	SD(Rec)	t_{calc}	u(Rec)
Leite/Fórmula Infantil – Nível 1	0,034487	3,514693	0,069731
Leite/Fórmula Infantil – Nível 2	0,024167	5,579091	0,071617
Bebida Instantânea – Nível 1	0,05902	4,192157	0,137069
Bebida Instantânea – Nível 2	0,0553	0,515964	0,072539
Cereais – Nível 1	0,04607	1,519426	0,060432
Cereais – Nível 2	0,031059	3,219691	0,058861

A partir dos dados obtidos, constrói-se uma tabela para o cálculo de incerteza para cada matriz e cada nível de concentração estudado. Para melhor visualização dos resultados, são construídos gráficos dos parâmetros x incerteza relativa. As Tabelas 2.34, 2.35, 2.36, 2.37, 2.38, 2.39 e as Figuras 2.20, 2.21, 2.22, 2.23, 2.24 e 2.25 mostram os resultados obtidos.

Tabela 2.34: Cálculo da incerteza da vitamina B₁ para leite em pó/fórmula infantil no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	0,37	mg/100g	0,02	0,054054054
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,777578	0,044433029
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,069731	0,069731
Incerteza Total	0,37	mg/100g	0,036831139	0,09954362
Incerteza Expandida	0,37	mg/100g	0,073662279	0,19908724

Figura 2.20: Gráfico representando a incerteza relativa de vitamina B₁ para leite/fórmula infantil em pó, nível de concentração 0,37 mg/100g.

Tabela 2.35: Cálculo da incerteza da vitamina B₁ para leite em pó/fórmula infantil no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	0,77	mg/100g	0,02	0,025974026
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,777578	0,044433029
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,071617	0,071617
Incerteza Total	0,77	mg/100g	0,068561675	0,089041136
Incerteza Expandida	0,77	mg/100g	0,137123349	0,178082272

Figura 2.21: Gráfico representando a incerteza relativa de vitamina B₁ para leite/fórmula infantil em pó, nível de concentração 0,77 mg/100g.

Tabela 2.36: Cálculo da incerteza da vitamina B₁ para bebida instantânea no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	1,21	mg/100g	0,03	0,024793388
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,777578	0,044433029
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,137069	0,137069
Incerteza Total	1,21	mg/100g	0,177533442	0,146721853
Incerteza Expandida	1,21	mg/100g	0,355066883	0,293443705

Figura 2.22: Gráfico representando a incerteza relativa de vitamina B₁ para bebida instantânea no nível de concentração 1.21 mg/100g.

Tabela 2.37: Cálculo da incerteza da vitamina B₁ para bebida instantânea no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	2,49	mg/100g	0,15	0,060240964
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,777578	0,044433029
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1,028533	-	0,072539	0,070526663
Incerteza Total	2,49	mg/100g	0,257900337	0,103574432
Incerteza Expandida	2,49	mg/100g	0,515800674	0,207148865

Figura 2.23: Gráfico representando a incerteza relativa de vitamina B₁ para bebida instantânea no nível de concentração 2,49 mg/100g.

Tabela 2.38: Cálculo da incerteza da vitamina B₁ para cereais no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	0,49	mg/100g	0,08	0,163265306
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,777578	0,044433029
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	0,93	-	0,060432	0,064980645
Incerteza Total	0,49	mg/100g	0,089016594	0,181666518
Incerteza Expandida	0,49	mg/100g	0,178033187	0,363333035

Figura 2.24: Gráfico representando a incerteza relativa de vitamina B₁ para cereais no nível de concentração 0,49 mg/100g.

Tabela 2.39: Cálculo da incerteza de vitamina B₁ para cereais no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	1,63	mg/100g	0,05	0,030674847
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,777578	0,044433029
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,058861	0,058861
Incerteza Total	1,63	mg/100g	0,131720165	0,080809917
Incerteza Expandida	1,63	mg/100g	0,26344033	0,161619834

Figura 2.25: Gráfico representando a incerteza relativa de vitamina B₁ para cereais no nível de concentração 1,63 mg/100g.

A fim de resumir os valores obtidos, a Tabela 2.40 traz a incerteza expandida da vitamina B₁ para cada matriz em cada nível validado.

Tabela 2.40: Resumo dos valores de incerteza encontrados para vitamina B₁ nas diferentes matrizes em diferentes níveis de concentração estudados.

Matriz	Nível de Concentração (mg/100g)	Incerteza Expandida (k=2)	
		Absoluta (mg/100g)	Relativa (%)
Leite / Fórmula Infantil em pó	0.40	0,07	20
	0.80	0,14	18
Bebida Instantânea	1.20	0,36	29
	2.50	0,52	21
Cereal	0.50	0,18	36
	1.60	0,26	16

10.10.2. Vitamina B₂

Utilizando os mesmos procedimentos descritos no Capítulo 1 e no cálculo da incerteza da vitamina B₁, são calculados os valores de incerteza para vitamina B₂ nas diferentes matrizes e diferentes níveis de concentração estudados durante a validação do método analítico.

A incerteza devido ao modelo linear foi calculada a partir dos dados obtidos no estudo de linearidade como sendo **0,397824** para uma massa injetada média de **17,5 ng** de vitamina B₂.

A Tabela 2.41 apresenta os resultados de incerteza devido à preparação das soluções de calibração. Os valores médios deste parâmetro são utilizados na tabela de cálculo da incerteza (**17,5 e 0,203501112 ng injetados**).

Tabela 2.41: Incerteza proveniente da preparação das soluções de calibração.

Massa injetada (ng)	Incerteza (ng)
2,5	0,028998445
5,0	0,058129847
10,0	0,116236641
20,0	0,234245882
50,0	0,579894746

A existência de tendência para os resultados obtidos pelo método foi verificada a partir dos resultados de recuperação obtidos durante a validação do método analítico e a incerteza da recuperação para cada matriz em cada nível de concentração encontra-se na tabela 2.42.

Tabela 2.42: Valores de incerteza da exatidão para as matrizes estudadas nos diferentes níveis de concentração.

Matriz-Nível	SD(Rec)	t_{calc}	u(Rec)
Leite/Fórmula Infantil – Nível 1	0,024781	1,806841	0,032507
Leite/Fórmula Infantil – Nível 2	0,01986	4,547903	0,049335
Bebida Instantânea – Nível 1	0,016323	0,835399	0,021412
Bebida Instantânea – Nível 2	0,020355	2,865738	0,035567
Cereais – Nível 1	0,010963	7,297361	0,041475
Cereais – Nível 2	0,030049	5,324572	0,085457

A partir dos dados obtidos, constrói-se uma tabela para o cálculo de incerteza para cada matriz e cada nível de concentração estudado. Para melhor visualização dos resultados, são construídos gráficos dos parâmetros x incerteza relativa. As Tabelas 2.43, 2.44, 2.45, 2.46, 2.47, 2.48 e as Figuras 2.26, 2.27, 2.28, 2.29, 2.30 e 2.31 mostram os resultados obtidos.

Tabela 2.43: Cálculo da incerteza da vitamina B₂ para leite em pó/fórmula infantil no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	1,28	mg/100g	0,01	0,0078125
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,397823622	0,022732778
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	0,95522	-	0,032507	0,034030761
Incerteza Total	1,28	mg/100g	0,055592277	0,043431466
Incerteza Expandida	1,28	mg/100g	0,111184553	0,086862932

Figura 2.26: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₂ para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 1,28 mg/100g.

Tabela 2.44: Cálculo da incerteza da vitamina B₂ para leite em pó/fórmula infantil no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	1,41	mg/100g	0,01	0,007092199
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,397823622	0,022732778
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,049335	0,049335
Incerteza Total	1,41	mg/100g	0,079153711	0,056137384
Incerteza Expandida	1,41	mg/100g	0,158307423	0,112274768

Figura 2.27: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₂ para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 1,41 mg/100g.

Tabela 2.45: Cálculo da incerteza da vitamina B₂ para bebida instantânea no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	2,23	mg/100g	0,02	0,00896861
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,397823622	0,022732778
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1,01364	-	0,021412	0,021123954
Incerteza Total	2,23	mg/100g	0,077050348	0,034551726
Incerteza Expandida	2,23	mg/100g	0,154100697	0,069103451

Figura 2.28: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₂ para bebida instantânea no nível de concentração de 2,23 mg/100g.

Tabela 2.46: Cálculo da incerteza da vitamina B₂ para bebida instantânea no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	3,81	mg/100g	0,05	0,01312336
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,397823622	0,022732778
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,035567	0,035567
Incerteza Total	3,81	mg/100g	0,174778883	0,045873723
Incerteza Expandida	3,81	mg/100g	0,349557766	0,091747445

Figura 2.29: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₂ para bebida instantânea no nível de concentração de 3,81 mg/100g.

Tabela 2.47: Cálculo da incerteza da vitamina B₂ para cereais no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	0,49	mg/100g	0,08	0,163265306
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,397823622	0,022732778
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,041475	0,041475
Incerteza Total	0,49	mg/100g	0,08350569	0,170419776
Incerteza Expandida	0,49	mg/100g	0,167011381	0,340839553

Figura 2.30: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₂ para cereais no nível de concentração de 0,49 mg/100g.

Tabela 2.48: Cálculo da incerteza da vitamina B₂ para cereais no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	1,63	mg/100g	0,05	0,030674847
Erro Modelo Linear	17,5	ng	0,397823622	0,022732778
Prep. Soluções de Calibração	17,5	ng	0,203501112	0,011628635
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,085457	0,085457
Incerteza Total	1,63	mg/100g	0,153868973	0,094398143
Incerteza Expandida	1,63	mg/100g	0,307737947	0,188796286

Figura 2.31: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₂ para cereais no nível de concentração de 1,63 mg/100g.

A fim de resumir os valores obtidos, a Tabela 2.49 traz a incerteza expandida da vitamina B₂ para cada matriz em cada nível validado.

Tabela 2.49: Resumo dos valores de incerteza encontrados para vitamina B₂ nas diferentes matrizes em diferentes níveis de concentração estudados.

Matriz	Nível de Concentração (mg/100g)	Incerteza Expandida (k=2)	
		Absoluta (mg/100g)	Relativa (%)
Leite / Fórmula Infantil em pó	1,30	0,11	8,7
	1,40	0,16	11
Bebida Instantânea	2,20	0,15	6,9
	3,80	0,35	9,2
Cereal	0,50	0,17	34
	1,60	0,31	19

10.10.3. Vitamina B₆

Utilizando os mesmos procedimentos descritos no Capítulo 1 e no cálculo da incerteza da vitamina B₁ e B₂, foram calculados os valores de incerteza para vitamina B₆ nas diferentes matrizes e diferentes níveis de concentração estudados durante a validação do método analítico. Este cálculo foi realizado utilizando-se somente os dados do cloridrato de piridoxol, uma vez que este é o composto adicionado aos alimentos e que foi encontrado nas amostras analisadas. Os dados obtidos para os outros vitâmeros (cloridrato de piridoxal e dicloridrato de piridoxamina) não foram considerados neste cálculo.

A incerteza devido ao modelo linear foi calculada a partir dos dados obtidos no estudo de linearidade do cloridrato de piridoxol como sendo **0,054315** para uma massa injetada média de **12,5 ng** de vitamina B₆.

A Tabela 2.50 apresenta os resultados de incerteza devido à preparação das soluções de calibração. Os valores médios deste parâmetro são utilizados na tabela de cálculo da incerteza (**12,5 e 0,296261895 ng injetado**).

Tabela 2.50: Incerteza proveniente da preparação das soluções de calibração.

Massa injetada (ng)	Incerteza (ng)
1,0	0,023690374
2,0	0,047387266
4,0	0,095284577
8,0	0,190583885
20,0	0,473625594

A existência de tendência para os resultados obtidos pelo método foi verificada a partir dos resultados de recuperação obtidos durante a validação do método analítico e a incerteza da recuperação para cada matriz em cada nível de concentração encontra-se na tabela 2.51.

Tabela 2.51: Valores de incerteza da exatidão para as matrizes estudadas nos diferentes níveis de concentração.

Matriz-Nível	SD(Rec)	t_{calc}	u(Rec)
Leite/Fórmula Infantil – Nível 1	0,042841	1,111542	0,056195
Leite/Fórmula Infantil – Nível 2	0,048542	2,060072	0,063674
Bebida Instantânea – Nível 1	0,016588	1,205694	0,021759
Bebida Instantânea – Nível 2	0,016151	2,476562	0,021186
Cereais – Nível 1	0,026207	0,763157	0,034377
Cereais – Nível 2	0,023759	0,420897	0,031165

A partir dos dados obtidos, constrói-se uma tabela para o cálculo de incerteza para cada matriz e cada nível de concentração estudado. Para melhor visualização dos resultados, são construídos gráficos dos parâmetros x incerteza relativa. As Tabelas 2.52, 2.53, 2.54, 2.55, 2.56, 2.57 e as Figuras 2.32, 2.33, 2.34, 2.35, 2.36 e 2.37 mostram os resultados obtidos.

Tabela 2.52: Cálculo da incerteza da vitamina B₆ para leite em pó/fórmula infantil no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	0,40	mg/100g	0,01	0,025
Erro Modelo Linear	12,5	ng	0,05431506	0,004345205
Prep. Soluções de Calibração	12,5	ng	0,296261895	0,023700952
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,056195	0,056195
Incerteza Total	0,40	mg/100g	0,026468559	0,066171398
Incerteza Expandida	0,40	mg/100g	0,052937119	0,132342796

Figura 2.32: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₆ para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 0,40 mg/100g.

Tabela 2.53: Cálculo da incerteza da vitamina B₆ para leite em pó/fórmula infantil no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	0,77	mg/100g	0,01	0,012987013
Erro Modelo Linear	12,5	ng	0,05431506	0,004345205
Prep. Soluções de Calibração	12,5	ng	0,296261895	0,023700952
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,063674	0,063674
Incerteza Total	0,77	mg/100g	0,053451627	0,069417697
Incerteza Expandida	0,77	mg/100g	0,106903254	0,138835395

Figura 2.33: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₆ para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 0,77 mg/100g.

Tabela 2.54: Cálculo da incerteza da vitamina B₆ para bebida instantânea no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	3,09	mg/100g	0,08	0,025889968
Erro Modelo Linear	12,5	ng	0,05431506	0,004345205
Prep. Soluções de Calibração	12,5	ng	0,296261895	0,023700952
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,021759	0,021759
Incerteza Total	3,09	mg/100g	0,128876355	0,041707558
Incerteza Expandida	3,09	mg/100g	0,25775271	0,083415117

Figura 2.34: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₆ para bebida instantânea no nível de concentração de 3,09 mg/100g.

Tabela 2.55: Cálculo da incerteza da vitamina B₆ para bebida instantânea no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	4,13	mg/100g	0,11	0,026634383
Erro Modelo Linear	12,5	ng	0,05431506	0,004345205
Prep. Soluções de Calibração	12,5	ng	0,296261895	0,023700952
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,021186	0,021186
Incerteza Total	4,13	mg/100g	0,172968268	0,041880937
Incerteza Expandida	4,13	mg/100g	0,345936536	0,083761873

Figura 2.35: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₆ para bebida instantânea no nível de concentração de 4,13 mg/100g.

Tabela 2.56: Cálculo da incerteza da vitamina B₆ para cereais no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	0,84	mg/100g	0,01	0,011904762
Erro Modelo Linear	12,5	ng	0,05431506	0,004345205
Prep. Soluções de Calibração	12,5	ng	0,296261895	0,023700952
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,034377	0,034377
Incerteza Total	0,84	mg/100g	0,036800029	0,043809558
Incerteza Expandida	0,84	mg/100g	0,073600058	0,087619117

Figura 2.36: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₆ para cereais no nível de concentração de 0,84 mg/100g.

Tabela 2.57: Cálculo da incerteza da vitamina B₆ para cereais no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta u(x)	Relativa u(x)/x
Repetibilidade	1,87	mg/100g	0,03	0,016042781
Erro Modelo Linear	12,5	ng	0,05431506	0,004345205
Prep. Soluções de Calibração	12,5	ng	0,296261895	0,023700952
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,031165	0,031165
Incerteza Total	1,87	mg/100g	0,079873388	0,042713042
Incerteza Expandida	1,87	mg/100g	0,159746777	0,085426084

Figura 2.37: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina B₆ para cereais no nível de concentração de 1,87 mg/100g.

A fim de resumir os valores obtidos, a Tabela 2.58 traz a incerteza expandida da vitamina B₆ para cada matriz em cada nível validado.

Tabela 2.58: Resumo dos valores de incerteza encontrados para vitamina B₆ nas diferentes matrizes em diferentes níveis de concentração estudados.

Matriz	Nível de Concentração (mg/100g)	Incerteza Expandida (k=2)	
		Absoluta (mg/100g)	Relativa (%)
Leite / Fórmula Infantil em pó	0,40	0,05	13
	0,80	0,11	14
Bebida Instantânea	3,00	0,26	8,3
	4,13	0,35	8,4
Cereal	0,85	0,07	8,8
	1,90	0,16	8,5

10.10.4. Vitamina PP

Utilizando os mesmos procedimentos descritos no capítulo 1 e no cálculo da incerteza das vitaminas B₁, B₂ e B₆, foram calculados os valores de incerteza para a vitamina PP nas diferentes matrizes e diferentes níveis de concentração estudados durante a validação do método analítico. Este cálculo foi realizado utilizando-se somente os dados da niacinamida, uma vez que este é o composto adicionado aos alimentos e que foi encontrado nas amostras analisadas. Os dados obtidos para a niacina não foram considerados neste cálculo.

A incerteza decorrente do modelo linear foi calculada a partir dos dados obtidos no estudo de linearidade da niacinamida como sendo **16,61666** para uma massa injetada média de **354,8 ng** de vitamina PP.

A Tabela 2.59 apresenta os resultados de incerteza devido à preparação das soluções de calibração. Os valores médios deste parâmetro são utilizados na tabela de cálculo da incerteza (**362 e 3,998351636 ng injetado**).

Tabela 2.59: Incerteza proveniente da preparação das soluções de calibração.

Massa injetada (ng)	Incerteza (ng)
10	0,110723801
100	1,116507949
200	2,210581522
500	5,516656596
1000	11,03728831

A existência de tendência para os resultados obtidos pelo método foi verificada a partir dos resultados de recuperação obtidos durante a validação do método analítico e a incerteza da recuperação para cada matriz em cada nível de concentração encontra-se na tabela 2.60.

Tabela 2.60: Valores de incerteza da exatidão para as matrizes estudadas nos diferentes níveis de concentração.

Matriz-Nível	SD(Rec)	t_{calc}	u(Rec)
Leite/Fórmula Infantil – Nível 1	0,040687	4,613133	0,102286
Leite/Fórmula Infantil – Nível 2	0,036684	1,315351	0,04812
Bebida Instantânea – Nível 1	0,057841	1,065507	0,075872
Bebida Instantânea – Nível 2	0,032166	6,968056	0,116594
Cereais – Nível 1	0,03724	0,268527	0,048849
Cereais – Nível 2	0,037699	1,061037	0,049451

A partir dos dados obtidos, constrói-se uma tabela para o cálculo de incerteza para cada matriz e cada nível de concentração estudado. Para melhor visualização dos resultados, são construídos gráficos dos parâmetros x incerteza relativa. As Tabelas 2.61, 2.62, 2.63, 2.64, 2.65, 2.66 e as Figuras 2.38, 2.39, 2.40, 2.41, 2.42 e 2.43 mostram os resultados obtidos.

Tabela 2.61: Cálculo da incerteza da vitamina PP para leite em pó/fórmula infantil no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta $u(x)$	Relativa $u(x)/x$
Repetibilidade	3,86	mg/100g	0,05	0,012953368
Erro Modelo Linear	354,76	ng	0,05431506	0,000153104
Prep. Soluções de Calibração	362	ng	3,998351636	0,01104517
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,102286	0,102286
Incerteza Total	3,86	mg/100g	0,400536983	0,103766058
Incerteza Expandida	3,86	mg/100g	0,801073967	0,207532116

Figura 2.38: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 3,86 mg/100g.

Tabela 2.62: Cálculo da incerteza da vitamina PP para leite em pó/fórmula infantil no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta $u(x)$	Relativa $u(x)/x$
Repetibilidade	6,30	mg/100g	0,03	0,004761905
Erro Modelo Linear	354,76	ng	0,05431506	0,000153104
Prep. Soluções de Calibração	362	ng	3,998351636	0,01104517
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,04812	0,04812
Incerteza Total	6,3	mg/100g	0,313445695	0,049753285
Incerteza Expandida	6,3	mg/100g	0,626891391	0,09950657

Figura 2.39: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para leite em pó/fórmula infantil no nível de concentração de 6,30 mg/100g.

Tabela 2.63: Cálculo da incerteza da vitamina PP para bebida instantânea no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta $u(x)$	Relativa $u(x)/x$
Repetibilidade	18,88	mg/100g	0,22	0,011652542
Erro Modelo Linear	354,76	ng	0,05431506	0,000153104
Prep. Soluções de Calibração	362	ng	3,998351636	0,01104517
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,075872	0,075872
Incerteza Total	18,88	mg/100g	1,466031861	0,077649993
Incerteza Expandida	18,88	mg/100g	2,932063722	0,155299985

Figura 2.40: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para bebida instantânea no nível de concentração de 18,88 mg/100g.

Tabela 2.64: Cálculo da incerteza da vitamina PP para bebida instantânea no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta $u(x)$	Relativa $u(x)/x$
Repetibilidade	28,40	mg/100g	0,66	0,023239437
Erro Modelo Linear	354,76	ng	0,05431506	0,000153104
Prep. Soluções de Calibração	362	ng	3,998351636	0,01104517
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,116594	0,116594
Incerteza Total	28,4	mg/100g	3,39274957	0,119463013
Incerteza Expandida	28,4	mg/100g	6,785499139	0,238926026

Figura 2.41: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para bebida instantânea no nível de concentração de 28,40 mg/100g.

Tabela 2.65: Cálculo da incerteza da vitamina PP para cereais no nível 1 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta $u(x)$	Relativa $u(x)/x$
Repetibilidade	10,40	mg/100g	0,199	0,019134615
Erro Modelo Linear	354,76	ng	0,05431506	0,000153104
Prep. Soluções de Calibração	362	ng	3,998351636	0,01104517
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,048849	0,048849
Incerteza Total	10,4	mg/100g	0,559045955	0,053754419
Incerteza Expandida	10,4	mg/100g	1,11809191	0,107508837

Figura 2.42: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para cereais no nível de concentração de 10,40 mg/100g.

Tabela 2.66: Cálculo da incerteza da vitamina PP para cereais no nível 2 de concentração.

Fator	Valor	Unidade	Incerteza	
			Absoluta $u(x)$	Relativa $u(x)/x$
Repetibilidade	17,58	mg/100g	0,43	0,024459613
Erro Modelo Linear	354,76	ng	0,05431506	0,000153104
Prep. Soluções de Calibração	362	ng	3,998351636	0,01104517
Volume da amostra	100	mL	0,057154761	0,000571548
Volume injetado	20	uL	0,040824829	0,002041241
Massa da amostra	5	g	0,016329932	0,003265986
Recuperação	1	-	0,049451	0,049451
Incerteza Total	17,58	mg/100g	0,991495372	0,056399054
Incerteza Expandida	17,58	mg/100g	1,982990743	0,112798108

Figura 2.43: Representação gráfica da incerteza relativa da vitamina PP para cereais no nível de concentração de 17,58 mg/100g.

A fim de resumir os valores obtidos, a Tabela 2.67 traz a incerteza expandida da vitamina PP para cada matriz em cada nível validado.

Tabela 2.67: Resumo dos valores de incerteza encontrados para vitamina PP nas diferentes matrizes em diferentes níveis de concentração estudados.

Matriz	Nível de Concentração (mg/100g)	Incerteza Expandida (k=2)	
		Absoluta (mg/100g)	Relativa (%)
Leite / Fórmula Infantil em pó	3,9	0,8	21
	6,3	0,6	10
Bebida Instantânea	19	3	16
	28	7	24
Cereal	10	1	11
	18	2	11

11. CONCLUSÕES

O método proposto mostrou-se de fácil execução e alta produtividade, podendo realizar extração de até 15 produtos em duplicata em um único dia de trabalho. Para agilizar a obtenção dos resultados são necessários três sistemas cromatográficos trabalhando simultaneamente; nesta situação, pode-se ter os resultados das 4 vitaminas nos 15 produtos em dois dias de trabalho. Considerando a rotina de um laboratório de controle, isto é um grande avanço.

Os dados obtidos durante a validação do método mostraram que ele é confiável, com precisão variando de 2 a 15% em função do teor e da matriz analisada. A exatidão apresenta-se adequada, com recuperações variando de 90 a 120% também em função do teor e da matriz estudada. Estes valores estão de acordo com dados encontrados em literatura.

Os cálculos de incerteza são demorados e sujeitos a erros devido ao grande número de cálculos necessário. É indispensável a elaboração de uma

planilha para este trabalho, evitando erros de cálculos. Os valores obtidos variaram de 10 a 25% e a análise dos gráficos mostra que as maiores contribuições vêm da exatidão, repetibilidade e do modelo linear. O erro proveniente da exatidão é mais significativo principalmente quando se utiliza material de referência para sua verificação, isto devido ao fato deste erro não depender somente da recuperação média e de sua variação, obtida durante a validação, mas também do erro associado ao valor de referência ou do erro proveniente da adição de padrão à amostra. Em média, o erro associado aos materiais de referência varia de 2,5 a 5% do valor de referência. Não era esperado que o erro associado ao modelo linear fosse tão significativo para algumas vitaminas, portanto, faz-se necessário avaliar o modelo utilizado e se a calibração é a melhor prática analítica.

Considerando os valores de incerteza obtidos, pode-se concluir que os limites permitidos para variação das vitaminas rotuladas nos produtos ($\pm 20\%$ do valor declarado) não é viável, uma vez que a variação analítica, em alguns casos, é maior que 20%.

Apesar dos altos valores de incerteza obtidos, considerou-se o método adequado ao uso em laboratórios de controle para análise de vitaminas adicionadas aos alimentos, sendo necessário estudo mais profundo sobre o cálculo de incerteza, suas contribuições e sua importância nos resultados obtidos e, principalmente, a capacidade dos métodos disponíveis em garantir o atendimento aos limites da legislação brasileira de rotulagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALL, G. Bioavailability and analysis of vitamins in foods. London: Chapman & Hall, 1998. 416p.
- BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina B₁. In: PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP: Manole, 2003a. cap.7, p.229-266
- BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina B₂. In: PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP: Manole, 2003b. cap.8, p.279-316
- BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina B₆. In: PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP: Manole, 2003c. cap.10, p.367-396
- BIANCHINI, R.; PENTEADO, M.V.C. Teores de tiamina, riboflavina e piridoxina em leites bovinos comercializados na cidade de São Paulo. Ciênc. Tecnol.Aliment., v.20, 2000.
- BRASIL. Resolução RDC no. 269 de 22 de dezembro de 2005. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova regulamento técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília.
- CHASE, G.W.; LANDEN, W.O.; SOLIMAN, A.M. Method modification for liquid chromatographic determination of thiamine, riboflavin, and pyridoxine in medical foods. Journal of AOAC International, v.76, p.1276-1280, 1993.
- COOPERMAN, J.M.; LOPEZ, R. Riboflavin. In: MACHLIN, J. Handbook of Vitamins. 2.ed. New York : M.Dekker, 1990. cap.7, p.299-328
- DRISKELL, J.A. Vitamin B₆. In: MACHLIN, J. Handbook of Vitamins. 2.ed. New York : M.Dekker, 1990. cap.9, p.379-402

GUBLER, C.J. Thiamin. In: MACHLIN, J. Handbook of Vitamins. 2.ed. New York : M.Dekker, 1990. cap.6, p.245-298

HANKES, L.V. Nicotinic Acid and Nicotinamide. In: MACHLIN, J. Handbook of Vitamins. 2.ed. New York : M.Dekker, 1990. cap.8, p.329-378

KALL, M.A. Determination of total vitamin B6 in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. Food Chemistry, v.82, p.315-327, 2003.

LAHÉLY, S.; BERGAENTZLÉ, M.; HASSELMANN, C. Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. Food Chemistry, v.65, p.129-133, 1999.

MATTIVI, F.; MONETTI, A.; VRHOVSEK, U.; TONON, D.; ANDRÉS-LACUEVA, C. High-performance liquid chromatographic determination of the riboflavin concentration in white wines for predicting their resistance to light. Journal of Chromatography A, v.888, p.121-127, 2000.

NDAW, S.; BERGAENTZLÉ, M.; AOUDÉ-WERNER, D.; HASSELMANN, C. Enzymatic extraction procedure for the liquid chromatographic determination of niacin in foodstuffs. Food Chemistry, v. 78, p.129-134, 2002.

OLLILAINEN, V.; VAHTERISTO, L.; UUSI-RAUVA, A.; VARO, P.; KOIVISTOINEN, K.; HUTTUNEN, J. The HPLC determination of total thiamin (Vitamin B1) in foods. Journal of Food Composition and Analysis, v.6, p.152-165, 1993.

OTTAWAY, P.B. The Technology of vitamins in food, 1.ed. London; New York, NY: Blackie Academic & Professional, 1993. 265p.

PRESOTO, A.E.F.; RIOS, M.D.G.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of vitamins B1, B2 and B6 in royal jelly. J. Braz.Chem.Soc, v.15, p.136-139, 2004.

ROCHE. Vitamin Compendium. 1996

SANT'ANA, H.M.P. Niacina. In: PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP: Manole, 2003. cap.9, p.331-359

SHARPLESS, K.; MARGOLIS, S; THOMAS, J. Determination of vitamins in food-matrix standard reference materials. *Journal of Chromatography A*, v.881, p.171-181, 2000.

VIÑAS, P.; LÓPEZ-ERROZ, C.; BALSALOBRE, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods. *Journal of Chromatography A*, v.1007, p.77-84, 2003.

WINDAHL, K.L.; TRENNERY, V.C., WARD, C.M. The determination of niacin in selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography: acid extraction. *Food Chemistry*, v.65, p.263-270, 1998.

CAPÍTULO 3

ESTABILIDADE DE VITAMINAS NOS ALIMENTOS

1. INTRODUÇÃO

A estabilidade das vitaminas é influenciada por vários fatores, sendo os principais, temperatura, umidade, presença de oxigênio, luz e pH do meio. A presença de agentes redutores ou oxidantes, outras vitaminas e íons metálicos também influenciam na estabilidade das vitaminas (OTTAWAY, 1993).

A perda de vitaminas pode ocorrer naturalmente durante a estocagem de alimentos frescos, como verduras e frutas, ou durante etapa de processamento, principalmente quando o alimento é submetido a tratamento térmico (OTTAWAY, 1993).

A estabilidade de cada vitamina, frente às condições de processamento e estocagem varia muito, com algumas vitaminas muito estáveis, como a vitamina PP, até compostos relativamente instáveis, como vitamina C ou B₁₂ (OTTAWAY, 1993).

A Tabela 3.1 apresenta um resumo do comportamento de vitaminas em relação a vários fatores.

O uso da irradiação como método de preservação de alimentos é aceito em muitos países e tem vários objetivos: reduzir a carga microbiana, aumentar o tempo de vida do produto retardando seu amadurecimento, eliminação de insetos em caso de infestação ou eliminação das larvas para preveni-la (OTTAWAY, 1993; KILCAST, 1994).

As perdas nutricionais devido ao processo de irradiação dependem da dose utilizada e o comportamento das vitaminas frente à irradiação varia muito, sendo a niacina, riboflavina e vitamina D consideradas muito estáveis e as vitaminas A, E e K as mais sensíveis; os resultados obtidos para vitamina C ainda são contraditórios (OTTAWAY, 1993).

Tabela 3.1: Resumo da estabilidade de vitaminas.

	Aquecimento	Luz (UV)	Oxigênio atmosférico	pH		Agentes oxidantes	Agentes redutores	Íons metálicos	Radiação ionizante	Informações adicionais
				< 7	> 7					
Vitamina A		u	Vu	u				u	u	Suscetível a isomerização
β-caroteno		u	u	u						
Vitamina D		u	u							Suscetível a isomerização
Vitamina E (tocoferóis)	u (na presença de ar)	u							u	Ésteres de vitamina E são muito estáveis
Vitamina K		u	u (vagarosamente)		u				u	Suscetível a isomerização
Vitamina B ₁ (tiamina)	u (pH alto)				u	u	u		u	Clivagem por sulfitos
Vitamina B ₂ (riboflavina)		vu			u (pH alto)		u			
Niacina										Normalmente muito estável
Vitamina B ₆ (piridoxol)		u								
Ácido pantotênico (como pantotenatos)				u (pH baixo)	u (pH alto)					Ácido pantotênico livre é muito instável
Ácido fólico		vu		u (abaixo pH 5)		u	u			
Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)		u		u (pH baixo)	u (pH alto)	u	u			
Biotina		u								Inativada por avidina
Vitamina C			u	u (vu em pH 4,0-4,3)				vu (Cobre e Ferro)	u ?	Instável em soluções com oxigênio dissolvido

Fonte: OTTAWAY, 1993. u: instável; vu: muito instável.

2. REVISÃO DA LITERATURA

De maneira geral, a vitamina B₁ é sensível ao calor, aumento de pH e presença de álcalis, desta forma, durante o processamento, cozimento e estocagem pode haver grande perda desta vitamina (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Durante o cozimento convencional de carnes, a perda de tiamina pode chegar a 85% do seu teor, enquanto que no cozimento em microondas esta perda é menor. O leite pode perder de 10 a 50% de tiamina durante pasteurização ou esterilização, enquanto o processo de liofilização leva a perdas médias de 10%. Da mesma forma, os vegetais podem perder até 60% do seu teor natural de tiamina durante o cozimento, sendo que grande parte da vitamina pode ser encontrada na água de cozimento. No processo de congelamento não foram encontradas perdas de tiamina, entretanto, durante o descongelamento ocorrem perdas significativas. (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a)

A tiamina também apresenta grande sensibilidade à irradiação, principalmente em alimentos com alta quantidade de água. (OTTAWAY, 1993; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a)

De maneira geral, a vitamina B₂ é sensível à luz, estável ao calor e oxigênio, principalmente em meio ácido, tornando-se instável ao aumento de pH e apresenta degradação na presença de agentes redutores (COOPERMAN, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

O beneficiamento de cereais pode acarretar perdas de até 60% da riboflavina presente no alimento, enquanto processos de pasteurização, evaporação e condensação parecem não afetar esta vitamina (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998).

Durante o processamento e cozimento doméstico, a riboflavina apresenta-se estável quando mantida na ausência de luz; o processo de fervura transfere a vitamina B₂ para água. O branqueamento também não afeta o teor da vitamina B₂ no alimento, e também não apresenta perdas quando o alimento é submetido à irradiação (COOPERMAN, 1991; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

A exposição à luz é a principal causa de perdas da riboflavina presente no leite, e apresenta maior sensibilidade em comprimentos de onda entre 420 e 560 nm. A fotodegradação no leite depende da intensidade da luz, tempo de exposição, temperatura e embalagem utilizada. Durante este processo há formação de lumicromo, um potente agente oxidante que catalisa a destruição do ácido ascórbico presente, e singletos de oxigênio altamente reativos que promovem a oxidação de ácidos graxos insaturados e geração de “off-flavours” (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b).

Em carnes, a riboflavina apresenta-se estável ao cozimento, enlatamento, desidratação e, durante a estocagem se os alimentos forem mantidos sob baixas temperaturas (COOPERMAN, 1991).

Dados de estabilidade de vitamina B₆ em alimentos são raros, mas mostram que tanto a forma quanto o teor desta vitamina são afetados por aquecimento, concentração e desidratação. Durante o processamento e estocagem de produtos cárneos e lácteos, observou-se interconversões entre piridoxol/piridoxol fosfato e piridoxamina/piridoxamina fosfato, através de reações reversíveis com proteínas e compostos carbonilas (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

O cloridrato de piridoxol é estável ao oxigênio e aquecimento, embora se decomponha em reação catalisada por íons metálicos e apresenta sensibilidade à luz, particularmente em soluções neutras e alcalinas (OTTAWAY, 1993).

Durante a pasteurização do leite não se observa perda de vitamina B₆, apesar da esterilização apresentar perdas de até 20% e o processamento por UHT, até 27%. Em carnes assadas ou grelhadas, a perdas de vitamina podem chegar a 60%, enquanto os vegetais cozidos ou enlatados podem perder até 80% do teor original de vitamina B₆ (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Há poucos estudos sobre a estabilidade da vitamina B₆ ao processo de irradiação de alimentos, com dados que mostram até 16% de perdas no peixe e nenhuma perda no trigo irradiado (BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Os dois vitâmeros da vitamina PP, niacina e niacinamida, apresentam-se estáveis ao oxigênio, aquecimento e luz, sem apresentar perdas durante

processamento, cozimento e estocagem doméstica, e durante processamento do leite (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; SANT'ANA, 2003).

Na etapa de lixiviação, durante o branqueamento de alimentos, podem ocorrer perdas da vitamina PP, bem como sua migração para o caldo durante a cocção dos alimentos. No processo de maturação da carne podem ocorrer perdas de até 30% da niacina presente (SANT'ANA, 2003).

O triptofano apresenta boa estabilidade durante processamento e estocagem dos alimentos (BALL, 1998).

O ácido pantotênico é razoavelmente estável ao processamento e armazenagem. Em pH neutro, esta vitamina é estável a altas temperaturas, sendo degradado fora da faixa de 5-7 (FOX, 1990; OTTAWAY, 1993; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

Dependendo do alimento e do processamento, as perdas podem chegar a 80%: a pasteurização do leite afeta muito pouco o teor de ácido pantotênico (perda menor que 10%), a refinação e alto grau de processamento de grãos é responsável pela perda de quase 50% desta vitamina, legumes enlatados perdem até 80% do teor de ácido pantotênico natural, enquanto a carne congelada pode perder mais que 70% da vitamina B₅ (FOX, 1990; SONG, 1990; OTTAWAY, 1993; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

3. OBJETIVO

Avaliar a estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em diferentes produtos industrializados adicionados de vitaminas sob diferentes condições de armazenamento durante sua vida de prateleira.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Foram adquiridas, no mercado local, amostras de fórmula infantil, cereal infantil e bebida instantânea a base de cacau, todos produtos adicionados de vitaminas.

4.2. MÉTODOS

As amostras adquiridas foram homogeneizadas (aproximadamente 1000g de cada produto) e analisados seis tomadas de ensaio para determinação do teor inicial das vitaminas nas amostras.

O restante das amostras foi separado em 7 porções de massas semelhantes, mantidas sob diferentes condições de temperatura, atmosfera e exposição à luz, conforme descrito na Tabela 3.2.

Periodicamente foram analisadas amostras em cada condição de armazenamento para verificação dos teores de vitaminas B₁, B₂, B₆, PP utilizando-se o método cromatográfico descrito e validado no capítulo 2.

Tabela 3.2: Condições de armazenagem das amostras para estudo de estabilidade das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP.

Condições Combinação	Temperatura		Atmosfera		Luz	
	Amb.	37°C	Normal	Vácuo	Exp.	Não Exp.
A	X		X		X	
B	X		X			X
C	X			X	X	
D	X			X		X
E		X	X		X	
F		X	X			X
G		X		X	X	
H		X		X		X

Amb.: Temperatura ambiente (ar condicionado 20°C); **Exp.:** amostra exposta à luz durante o dia; **Não Exp.:** amostra mantida no escuro.

Após as análises, os resultados foram tabelados e foram construídas curvas de decaimento para cada vitamina em cada matriz estudada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinação do teor inicial de vitaminas nas amostras foram analisadas seis tomadas de ensaio em condições de repetibilidade. As amostras foram analisadas periodicamente para verificação da estabilidade das vitaminas durante o tempo de armazenamento em diferentes condições.

5.1. VITAMINA B₁

Os resultados obtidos para vitamina B₁ em leite em pó/fórmulas infantis encontram-se na Tabela 3.3 e, graficamente na Figura 3.1.

Tabela 3.3: Resultados de vitamina B₁ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para leite em pó/fórmulas infantis.

Combinação	B ₁ (mg/100g)					
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses	10 meses
A	0,95±0,04	1,02	1,00	0,83	0,95	0,80
B		1,05	1,02	0,90	0,99	0,85
C		1,04	1,01	0,85	0,99	0,90
D		0,99	1,04	0,76	1,01	0,93
E		1,01	1,03	1,21	1,07	0,90
F		1,00	1,05	1,21	1,07	0,95
G		1,02	1,01	1,22	1,12	1,02
H		1,00	1,07	1,18	1,07	1,01

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

Figura 3.1: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₁ durante vida de prateleira de leite em pó/fórmula infantil em diferentes condições de estocagem.

Verifica-se pelos resultados obtidos, que a vitamina B₁ na matriz leite mostra-se estável em qualquer condição de estocagem durante o tempo estudado. A diferença entre os resultados obtidos no quinto mês ocorreu devido à necessidade de quantificação da vitamina em duas corridas cromatográficas diferentes.

Os dados obtidos para vitamina B₁ em bebida instantânea durante estocagem em diferentes condições encontram-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Resultados da vitamina B₁ durante o período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para bebida instantânea.

Combinação	B ₁ (mg/100g)					
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses	10 meses
A	1,67±0,09	1,63	2,00	1,54	1,85	1,61
B		1,63	1,92	1,56	1,89	1,61
C		1,54	1,95	1,55	1,84	1,60
D		1,58	1,93	1,61	1,91	1,59
E		1,59	2,01	1,51	1,73	1,53
F		1,57	1,98	1,56	1,84	1,65
G		1,61	1,81	1,54	1,73	1,63
H		1,52	2,00	1,56	1,73	0,47

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

A representação gráfica destes resultados encontra-se na Figura 3.2.

Figura 3.2: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₁ durante a vida de prateleira de bebida instantânea em diferentes condições de estocagem.

Para bebida instantânea, os teores de vitamina B₁ permaneceram estáveis durante todo período de estudo nas diferentes condições de estocagem. Não foi verificado nenhum problema analítico no último resultado da combinação H e, para concluir que houve perda da vitamina nesta condição, o estudo deveria se prolongar para avaliação de outros resultados.

Os resultados de vitamina B₁ em cereais encontram-se na Tabela 3.5 e mostram a estabilidade desta vitamina durante o período estudado nas diferentes condições de armazenamento. A Figura 3.3 apresenta os dados graficamente e, nota-se somente um resultado (combinação D – 3 meses) discrepante, devido a problemas na corrida cromatográfica.

Tabela 3.5: Resultados de vitamina B₁ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para cereais.

Combinação	B ₁ (mg/100g)					
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses	10 meses
A	1,36±0,03	1,29	1,19	1,55	1,35	1,26
B		1,28	1,18	1,48	1,37	1,36
C		1,28	1,23	1,52	1,39	1,32
D		1,30	0,76	1,50	1,48	1,35
E		1,32	1,42	1,61	1,45	1,44
F		1,37	1,22	1,61	1,47	1,41
G		1,35	1,39	1,63	1,51	1,42
H		1,35	1,40	1,55	1,52	1,36

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

Figura 3.3: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₁ durante vida de prateleira de cereais em diferentes condições de estocagem.

Foi calculado a média e o coeficiente de variação dos resultados obtidos ao longo do tempo para cada condição de estocagem para cada matriz e, estes resultados encontram-se na Tabela 3.6. Os valores de coeficiente de variação foram comparados com a incerteza expandida do método (18% para leite; 21% para bebida instantânea e 16% para cereais), demonstrando estabilidade da vitamina B₁ durante o período estudado nas diferentes condições de estocagem. Somente dois valores de coeficiente de variação estão acima da incerteza do método, combinação H para bebida instantânea e combinação D para cereais.

Tabela 3.6: Resumo dos resultados obtidos para as diferentes matrizes estudadas nas diferentes condições de estocagem.

Combinação	Leite em pó/Fórmula Infantil		Bebida Instantânea		Cereais	
	Média	Coeficiente de Variação	Média	Coeficiente de Variação	Média	Coeficiente de Variação
A	0,92	10	1,72	10	1,33	9
B	0,96	8	1,71	9	1,34	8
C	0,96	8	1,69	10	1,35	7
D	0,95	11	1,72	9	1,29	21
E	1,03	10	1,67	11	1,43	7
F	1,04	9	1,71	10	1,41	9
G	1,06	9	1,66	6	1,44	7
H	1,05	8	1,49	35	1,42	6

Média: média de todos os resultados obtidos em cada combinação durante o período de tempo estudado.

Apesar de alguns resultados serem discrepantes, a avaliação global dos dados obtidos mostra que a vitamina B₁ apresentou-se muito estável por, aproximadamente, 10 meses em diferentes condições de temperatura, atmosfera e luz.

5.2. VITAMINA B₂

Os valores de vitamina B₂ em leite em pó/formulas infantis durante o período estudado nas diferentes condições encontram-se na Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Resultados de vitamina B₂ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para leite em pó/fórmulas infantis.

Combinação	B ₂ (mg/100g)					
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses	10 meses
A	1,35±0,05	0,43	0,21	0,13	0,07	0,07
B		1,28	1,26	1,21	1,24	0,67
C		0,77	0,42	0,29	0,12	0,72
D		1,20	1,24	1,18	1,27	1,18
E		1,24	1,22	1,09	1,22	1,21
F		1,26	1,30	1,24	1,38	1,29
G		1,25	1,14	1,18	1,31	1,19
H		1,20	1,30	1,21	1,30	1,26

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

A representação gráfica dos resultados mostrados na Tabela 3.7 encontra-se na Figura 3.4.

Figura 3.4: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₂ durante a vida de prateleira de leite em pó/fórmulas infantis em diferentes condições de estocagem.

De maneira geral, a vitamina B₂ não se apresentou estável em matriz láctea durante o período estudado em nenhuma condição de estocagem, entretanto, a pior condição para a estabilidade da vitamina foi exposição à luz em temperatura ambiente e atmosfera normal, com perda de, aproximadamente 70% em um único mês. Quando a amostra ficou somente exposta à luz ou somente em atmosfera normal, o teor de vitamina B₂ também apresentou um decaimento estatisticamente significativo.

Os dados obtidos para a vitamina B₂ em bebida instantânea durante estocagem em diferentes condições encontram-se na Tabela 3.8 e na Figura 3.5 estes dados estão representados graficamente.

Tabela 3.8: Resultados de vitamina B₂ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para bebida instantânea.

Combinação	B ₂ (mg/100g)					
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses	10 meses
A	2,01±0,08	1,98	1,93	1,83	2,17	4,23
B		1,93	1,99	1,80	2,05	2,07
C		2,01	1,95	1,83	1,98	2,17
D		1,95	1,95	1,81	2,05	2,39
E		2,05	2,05	1,88	2,09	2,58
F		2,07	2,01	1,87	2,15	2,70
G		2,02	2,04	1,84	2,08	2,99
H		1,98	2,00	1,90	2,13	3,37

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

Figura 3.5: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₂ durante a vida de prateleira de bebida instantânea em diferentes condições de estocagem.

A vitamina B₂ apresentou-se extremamente estável nas diferentes condições de estocagem durante todo período estudado na matriz bebida instantânea. Os resultados obtidos na última análise do estudo encontram-se todos acima do esperado mostrando algum desvio do método analítico que não foi identificado.

O teor de vitamina B₂ em cereais comportou-se conforme mostrado na Tabela 3.9 e Figura 3.6 durante o período estudado nas diferentes condições de armazenamento.

Tabela 3.9: Resultados de vitamina B₂ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para cereais

Combinação	B ₂ (mg/100g)					
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses	10 meses
A	1,53±0,10	1,17	1,11	0,63	1,08	0,88
B		1,50	1,43	0,87	1,37	1,41
C		1,20	1,44	0,81	1,23	1,08
D		1,48	1,64	1,08	1,35	1,40
E		1,40	1,56	1,20	1,58	-
F		1,35	1,64	1,51	1,55	1,58
G		1,47	1,65	1,59	1,48	1,47
H		1,49	2,03	1,47	1,42	1,45

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

Figura 3.6: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₂ durante a vida de prateleira de cereal em diferentes condições de estocagem.

Na matriz cereal, a vitamina B₂ apresentou o mesmo comportamento identificado na matriz leite, entretanto, as perdas foram menores e durante todo o período estudado.

Para cada matriz, foi calculado a média e o coeficiente de variação dos resultados obtidos ao longo do tempo para cada condição de estocagem para cada matriz e, estes resultados estão apresentados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10: Resumo dos resultados de vitamina B₂ obtidos para as diferentes matrizes estudadas nas diferentes condições de estocagem.

Combinação	Leite em pó/Fórmula Infantil		Bebida Instantânea		Cereais	
	Média	Coefficiente de Variação	Média	Coefficiente de Variação	Média	Coefficiente de Variação
A	0,38	132	2,36(1,98)	39 (6)	1,07	28
B	1,17	21	1,98(1,96)	5 (5)	1,35	18
C	0,61	72	1,99(1,96)	6 (4)	1,22	21
D	1,24	5	2,03(1,95)	10 (5)	1,41	14
E	1,22	7	2,11(2,02)	11 (4)	1,45	11
F	1,30	4	2,14(2,02)	14 (5)	1,53	6
G	1,24	7	2,16(2,00)	19 (5)	1,53	5
H	1,27	5	2,23(2,00)	25 (4)	1,57	15

Média: média de todos os resultados obtidos em cada combinação durante o período de tempo estudado.

Os valores de coeficiente de variação foram comparados com a incerteza expandida do método (11% para leite; 9% para bebida instantânea e 19% para cereais) e as seguintes conclusões foram obtidas:

- ✓ A vitamina B₂ apresentou perdas significativas quando exposta à luz e sob atmosfera normal na matriz láctea; esta perda foi maior quando as duas condições foram combinadas;
- ✓ Os coeficientes de variação obtidos para bebida instantânea mostraram variação nos teores de vitamina maiores que a incerteza do método, entretanto, quando os cálculos foram realizados retirando-se os valores da última análise (valores entre parêntesis na Tabela 3.10), conclui-se que nesta matriz a vitamina B₂ mostrou-se extremamente estável nas condições de estocagem durante o período estudado;

- ✓ A atmosfera e exposição à luz também foram fatores importantes para a estabilidade da vitamina B₂, entretanto, a combinação destes fatores não teve um impacto maior que cada um separadamente;
- ✓ Quando a amostra foi mantida a 37°C, a exposição à luz foi menor que quando mantida em temperatura normal, o que pode explicar perdas não significativas nas amostras mantidas nesta condição de temperatura.

5.3. VITAMINA B₆

A Tabela 3.11 mostra os resultados obtidos para vitamina B₆ em leite em pó/fórmulas infantis durante o período de estudo. Estes dados estão representados graficamente na Figura 3.7 e mostram que a vitamina B₆ não é estável na matriz láctea em nenhuma condição de estocagem estudada, sendo afetada principalmente pela combinação de exposição à luz em atmosfera normal.

Tabela 3.11: Resultados de vitamina B₆ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para leite em pó/fórmulas infantis.

Combinação	B ₆ (mg/100g)					
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses	10 meses
A	1,41±0,02	1,12	1,04	0,96	0,79	0,79
B		1,18	1,12	1,04	1,00	0,87
C		1,17	1,12	0,96	0,98	0,92
D		1,20	1,19	1,10	1,07	1,00
E		1,21	1,25	1,10	1,10	0,98
F		1,20	1,26	1,10	1,11	1,02
G		1,22	1,25	1,09	1,10	1,04
H		1,22	1,26	1,06	1,10	1,03

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

Figura 3.7: Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₆ durante a vida de prateleira de leite em pó/fórmula infantil em diferentes condições de estocagem.

A Tabela 3.12 e a Figura 3.8 mostram os resultados de vitamina B₆ obtidos nas análises em bebida instantânea.

Tabela 3.12: Resultados de vitamina B₆ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para bebida instantânea.

Combinação	B ₆ (mg/100g)					
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses	10 meses
A	4,84±0,23	4,09	4,70	4,16	3,97	4,10
B		4,19	4,79	4,26	4,03	4,15
C		4,08	4,97	4,40	3,89	4,04
D		4,27	4,91	4,46	4,09	4,08
E		4,19	5,09	4,28	4,38	4,20
F		4,31	4,94	4,49	4,21	4,02
G		4,32	4,99	4,38	4,39	4,15
H		4,39	4,91	4,51	4,25	4,16

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

Figura 3.8: Representação gráfica dos resultados obtidos de vitamina B₆ durante a vida de prateleira para bebida instantânea em diferentes condições de estocagem.

Os resultados apresentados mostram uma tendência à perda gradual da vitamina durante o tempo estudado em todas as condições de estocagem, com o mesmo comportamento observado para matriz láctea.

Os resultados obtidos para cereais encontram-se na Tabela 3.13 e são representados graficamente na Figura 3.9.

Tabela 3.13: Resultados de vitamina B₆ durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para cereais.

Combinação	B ₆ (mg/100g)					
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses	10 meses
A	1,75±0,11	1,33	1,53	1,35	1,34	1,36
B		1,30	1,53	1,40	1,40	1,34
C		1,34	-	1,44	1,41	1,38
D		1,38	1,77	1,48	1,26	1,34
E		1,36	-	1,53	1,37	1,51
F		1,38	1,68	1,55	1,41	1,56
G		1,34	-	1,60	1,39	1,59
H		1,24	1,86	1,52	1,38	1,52

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

Figura 3.9: Representação gráfica dos resultados obtidos de vitamina B₆ durante a vida de prateleira em cereal sob diferentes condições de estocagem.

A Tabela 3.14 traz a média e o coeficiente de variação de todos os resultados obtidos para uma mesma combinação ao longo do tempo estudado.

Tabela 3.14: Resumo dos resultados de vitamina B₆ obtidos para as diferentes matrizes estudadas nas diferentes condições de estocagem.

Combinação	Leite em pó/Fórmula Infantil		Bebida Instantânea		Cereais	
	Média	Coeficiente de Variação	Média	Coeficiente de Variação	Média	Coeficiente de Variação
A	1,02	23	4,31	8	1,44	12
B	1,10	17	4,38	8	1,45	11
C	1,09	17	4,37	10	1,46	11
D	1,16	12	4,44	8	1,50	14
E	1,18	13	4,50	8	1,50	11
F	1,18	12	4,47	8	1,56	9
G	1,19	12	4,51	7	1,53	11
H	1,18	12	4,51	7	1,55	15

Média: média de todos os resultados obtidos em cada combinação durante o período de tempo estudado.

Quando se comparam os coeficientes de variação dos resultados com a incerteza expandida do método para as diferentes matrizes (leite em pó/fórmula infantil: 13%; bebida instantânea: 8% e cereal: 9%), conclui-se que para a matriz leite, há perda de vitamina B₆ nas combinações A, B e C, principalmente na combinação A, reforçando a tese que a exposição à luz e atmosfera normal afeta negativamente a estabilidade desta vitamina.

Para bebida instantânea, apesar do gráfico na Figura 3.8 mostrar uma tendência à perda de vitamina ela não pode ser estatisticamente verificada, uma vez que esta variação é menor ou igual à incerteza do método. Entretanto, para os cereais os coeficientes de variação obtidos nas diferentes combinações de estocagem são ligeiramente superiores à incerteza calculada para esta matriz, confirmando a perda de vitamina B₆ durante o período estudado em todas as combinações de estocagem estudadas.

5.4. VITAMINA PP

Devido a problemas analíticos, o estudo de estabilidade de vitamina PP foi realizado por somente 7 meses e não por 10 meses, como para as demais vitaminas.

Os resultados obtidos para vitamina PP em leite em pó/fórmulas infantis encontram-se na Tabela 3.15 e são representados graficamente na Figura 3.10.

Tabela 3.15: Resultados de vitamina PP durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para leite em pó/fórmulas infantis.

Combinação	PP (mg/100g)				
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses
A	13,88±0,22	13,23	14,28	14,64	14,89
B		14,29	14,52	14,75	15,00
C		14,72	14,86	14,68	14,92
D		15,20	15,95	15,16	15,05
E		15,84	15,67	15,89	15,83
F		16,14	15,70	15,71	15,73
G		16,61	16,16	15,73	15,98
H		16,77	13,87	15,95	15,72

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

Figura 3.10: Representação gráfica dos resultados obtidos de vitamina PP durante a vida de prateleira em leite em pó/fórmula infantil sob diferentes condições de estocagem.

Os resultados obtidos mostram que a vitamina PP foi extremamente estável durante o período estudado para leite em pó/fórmula infantil. Os dados obtidos para bebida instantânea encontram-se na Tabela 3.16.

Tabela 3.16: Resultados de vitamina PP durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para bebida instantânea.

Combinação	PP (mg/100g)				
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses
A	27,67±0,58	31,35	28,63	29,28	27,28
B		32,69	28,44	29,72	27,31
C		34,32	29,70	28,82	27,19
D		34,43	29,00	29,38	27,82
E		34,23	29,31	29,30	27,16
F		35,67	29,24	30,08	27,93
G		33,94	28,61	29,65	32,66
H		36,00	28,81	29,90	27,81

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

A representação gráfica destes resultados encontra-se na Figura 3.11 e mostra uma tendência de queda nos resultados obtidos durante o período estudado em todas as combinações de estocagem.

Figura 3.11: Representação gráfica dos resultados obtidos de vitamina PP durante a vida de prateleira em bebida instantânea sob diferentes condições de estocagem.

A Tabela 3.17 traz os resultados obtidos para a matriz cereal durante o período de estudo em todas as combinações de estocagem. Estes resultados estão representados graficamente na Figura 3.12.

Tabela 3.17: Resultados de vitamina PP durante período de estudo de estabilidade em diferentes condições de estocagem para cereais.

Combinação	PP (mg/100g)				
	Inicial	1 mês	3 meses	5 meses	7 meses
A	12,84±0,44	15,91	11,32	12,88	12,26
B		16,06	13,71	12,42	11,65
C		15,84	13,22	12,47	12,06
D		16,38	12,22	11,81	11,74
E		12,87	9,61	5,47	6,46
F		15,33	10,99	8,30	7,61
G		13,83	9,60	7,88	7,50
H		14,40	7,85	8,95	7,90

Resultados tabelados referem-se a média de duas determinações.

Figura 3.12: Representação gráfica dos resultados obtidos de vitamina PP durante a vida de prateleira em cereal sob diferentes condições de estocagem.

Os resultados mostram uma tendência de perda de vitamina PP ao longo do tempo, principalmente para as amostras mantidas a 37°C, independentemente da exposição à luz e em atmosfera normal.

Para avaliação estatística dos resultados, a Tabela 3.18 mostra as médias e os coeficientes de variação de todos os resultados obtidos em uma mesma combinação de estocagem. Os coeficientes de variação são comparados com a incerteza expandida do método para cada matriz (10% para leite em pó/fórmula infantil; 24% para bebida instantânea e 11% para a matriz cereal) a fim de definir se houve perda de vitamina PP durante o estudo.

Tabela 3.18: Resumo dos resultados de vitamina PP obtidos para as diferentes matrizes estudadas nas diferentes condições de estocagem.

Combinação	Leite em pó/Fórmula Infantil		Bebida Instantânea		Cereais	
	Média	Coefficiente de Variação	Média	Coefficiente de Variação	Média	Coefficiente de Variação
A	14,18	5	28,84	6	13,04	13
B	14,49	3	29,17	7	13,34	13
C	14,61	3	29,54	10	13,29	11
D	15,05	5	29,66	9	13,00	15
E	15,42	6	29,53	9	9,45	37
F	15,43	6	30,12	11	11,01	29
G	15,67	7	30,51	9	10,33	28
H	15,24	9	30,04	11	10,39	29

Média: média de todos os resultados obtidos em cada combinação durante o período de tempo estudado.

Apesar da tendência na diminuição dos resultados de vitamina PP ao longo do tempo na matriz de bebida instantânea, quando comparam-se os coeficientes de variação dos resultados obtidos nas diferentes combinações com a incerteza do método para esta matriz, verifica-se que a variação dos resultados é menor que a incerteza e, portanto, não se pode concluir que haja perda de vitamina durante a estocagem.

Os valores de coeficiente de variação obtidos para a matriz leite também são menores que a incerteza, mostrando que esta vitamina mantém-se estável pelo período estudado em todas as combinações de estocagem, entretanto, contrariando os dados obtidos em literatura, verificou-se que para a matriz cereal a temperatura de estocagem influencia muito a estabilidade da vitamina PP, com perdas de até 50% em relação ao resultado inicial.

6. CONCLUSÕES

Avaliando-se globalmente os resultados obtidos durante o estudo de estabilidade, pode-se concluir que:

- ✓ A vitamina B₁ apresentou-se extremamente estável durante o período de estudo, independente da condição a que os alimentos foram expostos; o comportamento desta vitamina também mostrou-se independente da matriz estudada.
- ✓ As vitaminas B₂ e B₆ foram extremamente influenciadas pela exposição à luz e ao oxigênio. A temperatura não se mostrou importante para estas vitaminas e a matriz de bebida instantânea parece proteger estas vitaminas.
- ✓ A combinação da exposição à luz e ao oxigênio resultou em perda de aproximadamente 70% da vitamina B₂ presente no leite em pó e 40% da presente no cereal. Esta combinação é mais danosa à vitamina que somente a exposição à luz ou ao oxigênio. Para a vitamina B₆, esta combinação não apresentou influência maior que quando o alimento foi exposto a elas individualmente.
- ✓ A vitamina PP mostrou-se extremamente estável nas matrizes leite em pó/fórmula infantil e bebida instantânea em qualquer condição e período, entretanto na matriz cereal a temperatura influenciou negativamente a estabilidade desta vitamina.

É importante ressaltar que a estabilidade das vitaminas depende muito da matriz onde se encontra e das condições a que estão expostas. Neste sentido, a embalagem utilizada em produtos adicionados de vitaminas é muito importante, principalmente para aquelas vitaminas que são sensíveis à luz e oxigênio, como as vitaminas B₂ e B₆.

A manipulação do produto pelo consumidor e o cuidado na forma de estocagem após sua abertura também é fundamental para que o teor das vitaminas adicionadas a ele se mantenha nutricionalmente adequados durante todo o período de consumo. Da mesma forma, as indicações sobre o tempo de consumo após a abertura da embalagem que estão no rótulo do produto também deve ser seguido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Ácido pantotênico. In: PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP: Manole, 2003. cap.12, p.465-481
- BALL, G. Bioavailability and analysis of vitamins in foods. London: Chapman & Hall, 1998. 416p.
- BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina B₁. In: PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP: Manole, 2003a. cap.7, p.229-266
- BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina B₂. In: PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP: Manole, 2003b. cap.8, p.279-316
- BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina B₆. In: PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP: Manole, 2003c. cap.10, p.367-396
- COOPERMAN, J.M.; LOPEZ, R. Riboflavin. In: MACHLIN, J. Handbook of Vitamins. 2.ed. New York : M.Dekker, 1990. cap.7, p.299-328
- DRISKELL, J.A. Vitamin B₆. In: MACHLIN, J. Handbook of Vitamins. 2.ed. New York : M.Dekker, 1990. cap.9, p.379-402
- FOX, H.M. Pantothenic acid. In: MACHLIN, J. Handbook of Vitamins. 2.ed. New York: M.Dekker, 1990. cap.11, p.437-458.
- GUBLER, C.J. Thiamin. In: MACHLIN, J. Handbook of Vitamins. 2.ed. New York : M.Dekker, 1990. cap.6, p.245-298
- HANKES, L.V. Nicotinic Acid and Nicotinamide. In: MACHLIN, J. Handbook of Vitamins. 2.ed. New York : M.Dekker, 1990. cap.8, p.329-378

KILCAST, D. Effect of irradiation on vitamins. Food Chemistry , v.49, p.157-164, 1994.

MORESCHI, E.C.M.; PRESOTO, A.E.F.; VIZEU, D.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Avaliação da estabilidade das vitaminas C, B1, B2, B6 e pantotenato de cálcio em fórmula infantil irradiada e não irradiada. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.39, 2003.

NESTLÉ Co. Determination of ascorbic acid (vitamin C) by titrimetry (Visual titration, Potenciometric titration). Publicação interna, 1996

NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP: UNICAMP, 2003.

OTTAWAY, P.B. The Technology of vitamins in food, 1.ed. London; New York, NY: Blackie Academic & Professional, 1993. 265p.

SONG, W.O. Pantothenic acid : how much do we know about this B-complex vitamin ? Nutrition Today, v.25, p.1-5, 1990.

WOOLARD, D.C.; INDYK, H.E.; CHRISTIANSEN, S.K. The analysis of panthotenic acid in milk and infant formulas by HPLC. Food Chemistry, v. 60, p.201-208, 2000.

CAPÍTULO 4

ÁCIDO PANTOTÊNICO

1. INTRODUÇÃO

Em 1930, Noris e Rengrose reportaram a existência de um fator antidermatite em frangos e em 1933 Williams identificou uma substância ácida necessária para o crescimento de leveduras; somente em 1938-1939 verificou-se que as duas substâncias eram idênticas, recebendo o nome de ácido pantotênico e sendo reconhecidas como vitamina. No ano seguinte foi descoberta a estrutura química do ácido pantotênico e em 1947, Lipmann identificou sua função bioquímica como constituinte da coenzima A (FOX, 1990; SONG, 1990; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

A importância do ácido pantotênico deve-se ao fato de ser parte da coenzima A (CoA) e da proteína carreadora de grupos acila (ACP). A CoA é necessária em todo metabolismo intermediário em reações envolvendo liberação de energia e sua deficiência está associada à desordem metabólica e energética em seres humanos (OTTAWAY, 1993; ALMEIDA-MURADIAN, 2003; MITTERMAYR et al, 2004).

2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

O ácido pantotênico é formado por um hidróxi-ácido complexo, o ácido pantóico, e uma molécula de β -alanina unidos por um grupo amina ligado à carboxila do ácido (SONG, 1990; ALMEIDA-MURADIAN, 2003)

A estrutura química do ácido pantotênico está mostrada na Figura 4.1.

Figura 4.1: Estrutura química do ácido pantotênico

O nome químico do ácido pantotênico é N-(2,4-dihidróxi-3,3-dimetil-1-oxobutil) β-alanina, com fórmula estrutural $C_9H_{17}O_5N$ e peso molecular de 219,23. É uma molécula opticamente ativa, embora somente o enantiomêro d(+) ocorra na natureza e apresente atividade vitamínica (FOX, 1990; OTTAWAY, 1993; ALMEIDA-MURADIAN, 2003; MITTERMAYER et al., 2004).

Como ácido livre, o ácido pantotênico é um óleo viscoso amarelo pálido, altamente higroscópico, facilmente destruído por álcalis e ácidos, principalmente sob aquecimento, embora estável em pH neutro. Possui caráter anfótero com predominância do caráter ácido e é solúvel em água, acetato de etila, ácido acético, acetona e álcool, parcialmente solúvel em éter etílico e insolúvel em benzeno e clorofórmio. O ácido pantotênico não apresenta cromóforo característico e mostra baixa absorvidade na região ultravioleta, com pico de absorção máxima em 204 nm devido à presença de grupos carbonila na molécula (ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

Comercialmente, encontram-se disponíveis três formas: D-pantotenato de cálcio, D-pantotenato de sódio e D-pantenol. Este último é o álcool correspondente do ácido pantotênico e disponível como líquido estável mas pouco utilizado em alimentos, embora amplamente usado na indústria farmacêutica, principalmente em multivitamínicos líquidos, devido à sua alta estabilidade (FOX, 1990; OTTAWAY, 1993; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

O sal de cálcio do ácido pantotênico é a forma mais utilizada como suplemento alimentar. Apresenta-se como pó microcristalino, incolor, inodoro, moderadamente higroscópico e com gosto amargo, solúvel em água (40g/mL), pouco solúvel em acetato de etila e insolúvel em éter etílico. A Figura 4.2 mostra a estrutura química do pantotenato de cálcio, que tem peso molecular de 476,53 e fórmula estrutural $(C_9H_{16}O_5N)_2Ca$ (ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

Figura 4.2: Estrutura do pantotenato de cálcio

A solução aquosa de pantotenato de cálcio é termolábil e ocorre quebra hidrolítica da molécula em pH alto ou baixo. A hidrólise alcalina forma ácido pantóico e β -alanina, enquanto a hidrólise ácida libera β -lactona do ácido pantóico. Entre pH 5-7 as soluções apresentam maior estabilidade. O pantotenato de cálcio também é estável ao oxigênio, luz, calor e cocção (OTTAWAY, 1993; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

Na natureza o ácido pantotênico pode ser sintetizado por alguns microorganismos presentes no rúmen de gado e ovelhas a partir da condensação de β -alanina com ácido di-hidroxibutírico ou sua lactona, embora esta reação não esteja bem determinada (FOX, 1990; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

Sinteticamente são produzidos os sais de sódio e cálcio, sendo esse último obtido em mistura racêmica, com aproximadamente 45% de atividade vitamínica, ou na forma D(+) pura (OTTAWAY, 1993).

3. FUNÇÕES BIOQUÍMICAS

O ácido pantotênico parece ter ação na resistência a doenças, pois ajuda no funcionamento dos linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos. Melhora a cicatrização de cortes e os sintomas da artrite. MURRAY (1990) cita o uso do ácido pantotênico em conjunto com vitamina C para melhorar a cicatrização de pacientes em períodos pré ou pós-operatórios; a vitamina C estimula a liberação de proteínas, enquanto o ácido pantotênico acelera a transformação dessa proteína em colágeno. Além disto, o ácido pantotênico está envolvido no metabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos, na formação de hormônios, na regulação de impulsos nervosos e na utilização do ácido p-aminobenzóico (PABA) e da colina, garantindo o funcionamento normal da cortizona. Assim sendo, essa vitamina é essencial para o crescimento, reprodução e manutenção da fisiologia normal em seres humanos e animais (MURRAY, 1990; SONG, 1990; OTTAWAY, 1993; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

A importância bioquímica do ácido pantotênico é por ser precursor da CoA e da fosfopanteteína, que atua como carreador de grupos protéicos (ACP) na

síntese de ácidos graxos de cadeia longa (FOX, 1990; SONG, 1990; BENDER, 1999; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

Como parte da CoA, atua em mais de setenta vias enzimáticas como mediadora na transferência de grupos acetil, funcionando como doador ou receptor de prótons. Está envolvida no metabolismo de ácidos graxos, aminoácidos e carboidratos, na síntese de colesterol, hormônios esteróides, neurotransmissores, porfirinas e hemoglobina, participa da oxidação de ácidos graxos, piruvato e cetoglutarato, além de ser responsável pela acetilação de drogas como a sulfadimida e isoniazida. Esta ação pode ser uma forma de avaliação do status nutricional do ácido pantotênico, uma vez que sua deficiência pode ter impacto na acetilação dessas drogas (FOX, 1990; SONG, 1990; SMITH & SONG, 1996; BENDER, 1999; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

No metabolismo de carboidratos, a CoA transforma-se em acetilcoenzima A, necessária para introdução de grupos acila no ciclo do ácido tricarboxílico. A acetilcoenzima A também é essencial na acetilação de aminoaçúcares que são constituintes de vários mucopolissacarídeos do tecido conjuntivo, e é responsável pela formação do neurotransmissor acetilcolina, através da acetilação da colina (ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

A conversão do ácido pantotênico em CoA parece ocorrer em uma sequência de 5 reações enzimáticas iniciando-se com a fosforilação do pantotenato pela ação da pantotenato quinase, conforme mostrado na Figura 4.3 (FOX, 1990; SONG, 1990; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

O ácido pantotênico, naturalmente presente nos alimentos, encontra-se na forma de CoA, que não pode ser absorvida diretamente pelas células pois não é capaz de atravessar a membrana plasmática. Dessa forma, a CoA deve ser degradada a ácido pantotênico para ser posteriormente sintetizada no interior das células (SONG, 1990; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

Os mecanismos de absorção do ácido pantotênico dependem da sua concentração: baixos teores são absorvidos no lúmen intestinal por mecanismo de transporte sódio-dependente e concentrações maiores por difusão simples. A CoA é absorvida somente após conversão a pantetina e pantotenato, que ocorre rapidamente no intestino pela ação de fosfatases e panteteinase. Após a absorção, o pantotenato é transportado às células pelo sangue e estocado nos músculos, fígado, coração e rins (SONG, 1990; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

Figura 4.3: Síntese da CoA a partir do ácido pantotênico.

O ácido pantotênico pode ser encontrado no sangue total, plasma, soro e células vermelhas do sangue, onde se apresenta na forma de CoA. A concentração de ácido pantotênico nas células vermelhas é maior e mais afetada pela ingestão diária que a presente no plasma (FOX, 1990).

A excreção do ácido pantotênico ocorre através da urina na forma de pantotenato livre e está relacionada à concentração ingerida. Observa-se que para baixo teor ingerido (aproximadamente 2,8 mg) a excreção é maior, levando-se à suposição de síntese ou perda de vitamina estocada; quanto maior a ingestão maior a excreção urinária, porém sempre menor que a concentração ingerida. Uma parte do ácido pantotênico também pode ser excretada pelo leite materno (FOX, 1990; SONG, 1990; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

4. INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA

O ácido pantotênico não apresenta ingestão diária permitida e necessidade nutricional (NR) publicados. A determinação do NR depende do conhecimento da biodisponibilidade do nutriente e da existência de parâmetros sensíveis e específicos para determinação de seu status nutricional (FOX, 1990; SMITH & SONG, 1996).

Os valores de ingestão diária recomendada para bebês (1,7 mg/dia) e mulheres nutrízes (7,0 mg/dia) são do ano de 2001. Nos Estados Unidos, a cota desejável de ácido pantotênico na dieta varia de 4-7 mg/dia e na França, 7-10 mg/dia. Para fins terapêuticos, utilizam-se teores entre 10 e 100 mg/dia sem aparecimento de sintomas nocivos, enquanto doses entre 10-20 g/dia podem causar diarreia (ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

A dificuldade para estabelecimento de NR deve-se aos vários fatores que afetam a absorção e a necessidade nutricional do nutriente, especificamente do ácido pantotênico: linhagem e idade dos animais em estudo, formas e métodos de suplementação durante o ensaio, uso de medicamentos. A existência de parâmetros e métodos sensíveis e específicos para sua determinação são essenciais: a correlação entre o teor de ácido pantotênico na dieta e nos músculos esqueléticos só foi provada em animais jovens, acetilação de

sulfanilamida ou do p-aminobenzoato *in vivo* pode ser utilizado como sinal de deficiência de ácido pantotênico (SMITH & SONG, 1996).

A Legislação Brasileira, através da sua Resolução RDC no. 269, de 22 de setembro de 2005, define o IDR de vitaminas e minerais para utilização em declaração nutricional de alimentos. O valor do IDR para ácido pantotênico nesta resolução é de 5mg. (BRASIL, 2005)

5. DEFICIÊNCIA

A deficiência de ácido pantotênico normalmente não é observada em humanos, somente em casos graves de desnutrição. O único caso conhecido de deficiência desta vitamina em seres humanos foi relatado em prisioneiros da 2ª Guerra Mundial e os sintomas são conhecidos como a síndrome dos pés queimando, devido às sensações de queimação anormais nos pés e pernas, aumentadas pelo calor e diminuídas por frio. Os efeitos desta deficiência variam de espécie para espécie, mas todas elas apresentam retardo de crescimento e alteração no metabolismo da CoA (FOX, 1990; SONG, 1990; BENDER, 1999; SMITH & SONG, 1996).

Estudos dos sintomas da deficiência de ácido pantotênico são normalmente realizados utilizando-se uma dieta deficiente nessa vitamina, associado à ingestão do seu antagonista, o ácido α -metilpantotênico (FOX, 1990).

A falta de relatos de casos de deficiência do ácido pantotênico na população em geral provavelmente deve-se à ausência de métodos bioquímicos e dietéticos para identificação dessa deficiência, normalmente presente em pessoas desnutridas e com deficiência de outras vitaminas do complexo B (SONG, 1990).

Os sintomas comumente observados em casos induzidos de deficiência de ácido pantotênico são insônia, fadiga, náuseas, cólicas abdominais, queimação nas mãos e pés, diminuição na taxa de crescimento e na quantidade de alimento ingerida, lesões na pele, desordens no sistema nervoso central, entre outros (MURRAY, 1990; SMITH & SONG, 1996).

6. FONTES NATURAIS

O ácido pantotênico está largamente distribuído na natureza na forma livre ou ligada. Como CoA está presente no tecido muscular, fígado e rins de animais. Na gema de ovo, leite, leveduras, alguns cereais e legumes há sua presença da forma livre. Em alimentos refinados, como açúcar, gorduras e óleos e amido de milho, não se encontram teores significativos de ácido pantotênico (FOX, 1990; OTTAWAY, 1993; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

Mesmo na forma ligada, o ácido pantotênico é totalmente biodisponível após a conversão à forma livre no intestino pela ação de fosfatase e amilase. O sal de cálcio do ácido pantotênico, utilizado na fortificação de alimentos, é absorvido e transformado em ácido pantotênico livre *in vivo* (ALMEIDA-MURADIAN, 2003; MITTERMAYR et al., 2004).

A Tabela 4.1 traz os teores de ácido pantotênico em vários alimentos.

Tabela 4.1: Teor de ácido pantotênico em alimentos.

Alimento	Ácido Pantotênico (mg/100g)
Arroz branco cozido	0,18 – 0,39
Brócoli cozido	0,61
Brócoli in natura	0,57
Carne de vaca	0,21 – 6,9
Cenoura cozida	0,23
Cenoura crua	0,27 – 0,40
Farinha de trigo	0,44 – 0,46
Farinha de trigo integral	1,01
Frango	0,17 – 3,27
Iogurtes	0,39 – 0,64
Laranja	0,25
Leite em pó	3,23
Leite in natura	0,36
Geléia real	15,9 – 26,5
Ovos frescos	1,2 – 1,6
Pão	0,081 – 0,70
Peixe	0,08 – 1,31
Pepino	0,24 – 0,26
Queijos	0,09 – 1,73
Repolho	0,14 – 0,19

7. MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÁCIDO PANTOTÊNICO EM ALIMENTOS

O método oficial da AOAC para determinação de ácido pantotênico é o microbiológico utilizando o *Lactobacillus plantarum*. Além deste microorganismo, pode-se utilizar também o crescimento de *Saccharomyces cerevisae*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Proteus morgannii* e *Pediococcus acidilacti*. Independente do microorganismo utilizado, o método microbiológico de análise é pouco seletivo para amostras complexas já que os constituintes da matriz podem influenciar o crescimento do microorganismo, além de ser demorado e trabalhoso (FOX, 1990; SONG, 1990; MITTERMAY, 2004).

Outra técnica existente para determinação de ácido pantotênico em alimentos é a utilização de animais como frangos, por seu baixo custo e praticidade. Avalia-se o crescimento ou cura de deficiência induzida para determinação do teor de vitamina presente no alimento ou dieta (FOX, 1990).

Outras técnicas analíticas têm sido desenvolvidas, como colorimetria, fluorimetria, espectrofotometria, radiometria, radioimunoensaio (RIA), cromatografia gasosa ou líquida (CG e CLAE), técnica de imunoafinidade (ELISA) e método enzimático (FOX, 1990; SONG, 1990; ALMEIDA-MURADIAN, 2003; MITTERMAYR, 2004).

O método por RIA é específico e sensível para determinação de substâncias presentes em baixa concentração em fluidos biológicos, após extração da vitamina com fosfatase alcalina e extrato de fígado, entretanto não se aplica a diversas matrizes (FOX, 1990; MITTERMAYR, 2004).

Utilizando um meio de cultura contendo C-14, o método microbiológico pode ser utilizado em conjunto com a técnica de cintilação em líquido. O $^{14}\text{CO}_2$ formado é retido em solução de 2-feniletilamina e utilizado para quantificação do ácido pantotênico (FOX, 1990).

Métodos químicos, como espectrofotometria, colorimetria, fluorimetria não são aplicáveis a qualquer matriz devido a sua pouca seletividade (FOX, 1990).

Os métodos cromatográficos podem ser utilizados para várias matrizes e concentrações. Utilizando-se cromatografia gasosa, há a necessidade de derivatização para obter um composto volátil possível de ser detectado por ionização de chama (FID), enquanto a utilização de um detetor de massa torna

possível a quantificação de ácido pantotênico em fluidos biológicos com ácido hopantênico (HOPA) como padrão interno (FOX, 1990; ALMEIDA-MURADIAN, 2003; MITTERMAYR, 2004).

A cromatografia líquida com detecção em UV apresenta boa sensibilidade, porém pouca seletividade devido ao baixo comprimento de onda utilizado na detecção. Atualmente, a detecção de massa acoplada à cromatografia líquida com interface ESI tem sido estudada. PAKIN *et al.* (2004) apresentam um método que utiliza cromatografia líquida com detecção fluorimétrica e reação pós-coluna (MITTERMAYR, 2004; ROMERA *et al.*, 1995; PAKIN, 2004).

A Tabela 4.2 apresenta um resumo dos métodos por CLAE encontrados na literatura.

Embora a técnica ELISA seja muito seletiva para ácido pantotênico, esta não permite a quantificação de CoA, pantenol e panteteína (produto da hidrólise enzimática da Còa) (ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

A determinação de ácido pantotênico utilizando-se eletroforese capilar, transformada de Fourier, diluição isotópica e voltametria foi abordada por vários autores, entre eles, KODAMA *et al.*, 1997, LI & BROWN, 2003, FOTSING *et al.*, 1997, RYCHLIK & FREISLEBEN, 2002, WANG & TSENG, 2000, RYCHLIK, 2000.

Tabela 4.2: Métodos de determinação de ácido pantotênico por CLAE.

Alimento	Preparação da Amostra	Coluna	Fase Móvel	Deteccção	Referência Bibliográfica
Leite e fórmulas infantis	Extração com ácido acético em vórtex	Resolve C18, 5µm, 100 x 8 mm (marca Waters) Develosil ODS-MG-5, 5µm, 250 x 4,6mm (marca Phenomenex) YMC AQ312, 5µm, 150 x 4,6 mm (marca YMS Inc.) Platinum EPS, 3µm, 53 x 7 mm (marca Alltech) Luna Phenyl-C6, 5µm, 250 x 4,6 mm (marca Phenomenex) Luna C8, 5µm, 250 x 4,6 mm (marca Phenomenex)	Isocrática: Tampão fosfato (0,1M pH2,25) : Acetonitrila (970:30)	UV multicanal em $\lambda = 200, 205$ e 240 nm	WOOLARD, INDYK, CHRISTIANSEN, 2000
Leite, fórmula infantil e cereais	Autoclavagem da amostra a 103°C por 20 min.	C18, 3µm, 150 x 3 mm (marca YMC Europe)	Gradiente: Sol. A: água e 0,025% TFA pH 2,6 Sol. B: acetonitrila	Detetor de massa Íon quantificado: 220	MITTERMAYR <i>et al</i> , 2004

Tabela 4.2: Continuação.

Alimento	Preparação da Amostra	Coluna	Fase Móvel	Deteccção	Referência Bibliográfica
Carnes, peixes e vegetais	Extração em tampão, seguida de purificação em cartucho de fase sólida aniônica	Lichrospher 100 RP18, 5µm, 250 x 5 mm (marca Merck)	Gradiente Sol. A: tampão fosfato 33mM, pH 2,5 Sol. B: Metanol Reativo pós-coluna: hidróxido de sódio, ortoftaldialdeído e ácido 3-mercaptopropiônico	Fluorescência $\lambda_{exc.} = 345 \text{ nm}$ $\lambda_{em.} = 455 \text{ nm}$	PAKIN <i>et al</i> , 2004
Fórmula infantil	Extração com ácido acético a temperatura ambiente.	Supersphere C18, 5µm, 250 x 5mm (marca Merck)	Isocrática. 97% tampão fosfato 0,25M / 3% acetoniirila – pH 2,5	UV $\lambda = 197 \text{ nm}$	ROMERA <i>et al</i> , 1996

8. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi implementar e validar um método de análise de ácido pantotênico por cromatografia líquida de alta eficiência em leite em pó e fórmulas infantis em pó.

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1. MATERIAL

9.1.1. Amostras

Conforme descrito no Capítulo 1, para a validação da metodologia foram utilizadas amostras de referência para leite em pó, cedidas pelo “Centre des Researchs Nestlé” (CRN).

Além das amostras de referência, foram adquiridas no mercado local amostras de leite em pó e fórmulas infantis em pó indicadas para alimentação de lactentes e crianças com idade entre 0 meses e 2 anos de idade. Estes produtos tem diferentes formulações, com teores de proteínas variando entre 12 e 20% e gordura entre 20 e 26%.

9.1.2. Reagentes e Outros Materiais

Os reagentes utilizados nas análises estão listados abaixo:

- ✓ Acetonitrila grau HPLC
- ✓ Ácido orto-fosfórico 85%
- ✓ Dihidrogenofosfato de potássio P.A.
- ✓ Hidrogenofosfato de di-potássio P.A.
- ✓ Pantothenate Assay Medium
- ✓ *Lactobacillus plantarum*

Foi utilizado padrão de D(+) pantotenato de cálcio, da marca Merck.

A fase móvel e amostras injetadas no sistema cromatográfico foram filtradas em filtro em membrana de celulose de 0,45 µm de tamanho de poro.

9.1.3. Equipamentos

Para extração das amostras, foi utilizada autoclave marca AMSCO, banho de água marca Heraeus, ultrassom, balanças analítica e semi-analítica marca Mettler.

Foi utilizado um sistema cromatográfico Waters composto de duas bombas modelo 510, um injetor automático modelo WISP 717+, um detector UV modelo 486 e um sistema de coleta de dados (Millenium).

9.2. MÉTODOS

9.2.1. Preparação da amostra

As amostras foram mantidas na embalagem original e estocadas à temperatura ambiente até o momento da análise. Quando necessário, as amostras foram trituradas e mantidas em frascos fechados e protegidas da luz até o momento da análise.

9.2.2. Extração da vitamina

9.2.2.1. Método cromatográfico

O método de extração baseou-se inicialmente no descrito por WOOLLARD, INDYK, CHRISTIANSEN (2000), sendo posteriormente alterado para extração com solução tampão pH 4,6 em ultrassom por 15 minutos.

O extrato foi então transferido para balão volumétrico de 100mL, completado o volume com água deionizada e filtrado sobre papel de filtro plissado. O filtrado obtido foi recolhido em frasco apropriado e filtrado em filtro de celulose de 0,45 μ m para injeção no cromatógrafo.

9.2.2.2. Método microbiológico

Para análise microbiológica de ácido pantotênico, é realizada uma hidrólise enzimática da amostra utilizando papaína e diastase. A amostra é solubilizada em solução tampão pH 4,6 e as enzimas são adicionadas a esta solução, que é mantida por uma noite a 37°C. O extrato obtido é transferido para balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água deionizada. Filtra-se a solução em papel de filtro plissado e recolhe-se o filtrado em erlenmeyer.

9.2.3. Condições experimentais

9.2.3.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram adaptadas do trabalho de WOOLLARD, INDYK, CHRISTIANSEN (2000). As condições utilizadas estão descritas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Condições cromatográficas para determinação de ácido pantotênico.

Parâmetro	Condições
Coluna	C18, esférica, 5 μ m, 250 x 4,0 mm com pré-coluna (marca Merck)
Fase Móvel (FM)	Solução A: tampão fosfato 0,1M pH 2,25 Solução B: tampão fosfato 0,1M pH 5,00
Fluxo FM	1,0 mL/min.
Volume injeção	20 μ L

9.2.3.2. Método microbiológico

Após a extração do ácido pantotênico, conforme item 9.2.2.2, foi diluída uma alíquota do extrato em 10 mL de meio de cultura específico para determinação ácido pantotênico. Foram esterilizados os tubos de ensaio contendo o meio de cultura e a alíquota da amostra em autoclave, conforme

indicação do fabricante do meio de cultura. Após a esterilização, foram inoculados os tubos com o microrganismo *Lactobacillus plantarum* e incubados a 37°C por uma noite.

O teor de vitamina foi calculado por comparação com padrão externo, através da medida da absorvância do meio de cultura produzida pelo crescimento do microrganismo.

10.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, utilizou-se coluna C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm, Purospher marca Merck e a mesma fase móvel proposta no trabalho de WOOLLARD, INDYK, CHRISTIANSEN (2000), 97% tampão fosfato 0,1M, pH 2,25 e 3% acetonitrila grau HPLC. A separação do pico de ácido pantotênico nas amostras de leite em pó adicionado desta vitamina não foi adequada, obrigando a realização de alterações nas condições cromatográficas propostas.

Foram testadas diferentes composições de fases móveis em modo isocrático e gradiente, optando-se por utilizar uma corrida cromatográfica em modo gradiente com duas soluções tampão de diferentes pH, conforme descrito na Tabela 4.4. Com a utilização do gradiente, a separação cromatográfica apresentou-se melhor, entretanto ainda não foi possível completa separação do ácido pantotênico em amostras não adicionadas.

Tabela 4.4: Gradiente utilizado para determinação de ácido pantotênico por CLAE.

Tempo (minutos)	% Solução A (Tampão fosfato pH 2,25)	% Solução B (Tampão fosfato pH 5,0)
0	100	0
10 – 35	0	100
36 – 55	100	0

10.1. CAMPO DE APLICAÇÃO

O método descrito aplica-se a leite em pó ou formula infantil com adição de ácido pantotênico entre 2,0 a 7,0 mg/100g, aproximadamente.

10.2. LINEARIDADE

A linearidade do ácido pantotênico foi estudada na faixa de 20 a 2000 ng de pantotenato de cálcio injetado. Foram avaliadas as respostas obtidas em unidades de área e de altura. Os dados médios e o resumo do resultado da análise de regressão encontram-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Resultados médios obtidos no estudo de linearidade do método de análise de ácido pantotênico.

Massa Inj. (ng)	U.Área		U.Altura	
	Média (n=6)	Desvio Padrão	Média (n=3)	Desvio Padrão
20,2	20168	1124	702	25
40,5	43227	1580	1452	46
101,2	115400	1956	3868	35
202,4	221200	2871	7338	173
404,8	455058	2211	13412	386
1012,0	1152218	1915	32197	295
2024,0	2378827	8113	64990	461
	Inclinação: 1174,33		Inclinação: 31,85	
	Intersecção: - 11766,35		Intersecção: 396,88	
	R₂: 0,999762		R₂: 0,999791	

Massa Inj.: Massa injetada; **U.Área:** unidades de área; **U.Altura:** unidades de altura; **n:** número de injeções.

A Figura 4.4 mostra a reta de regressão e a variação da razão resposta/concentração do pantotenato de cálcio.

Figura 4.4: Gráficos de linearidade e variação de resposta com a massa injetada do pantotenato de cálcio em unidades de área e altura.

Avaliando-se a variação dos resultados em área e altura, mostrados graficamente na Figura 4.5, observa-se que a menor variação ocorre quando a resposta é obtida em unidades de área.

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (N=6 INJEÇÕES)

Figura 4.5: Variação da dispersão dos dados de resposta de padrão em área e altura de pico

10.3. FAIXA DE TRABALHO E FAIXA LINEAR DE TRABALHO

Após avaliação dos gráficos construídos durante o estudo da linearidade, foi definida a faixa linear de trabalho para o pantotenato de cálcio. A razão resposta/massa injetada não é independente da concentração em toda faixa estudada, portanto a faixa linear de trabalho é limitada à região de concentração onde a relação resposta/massa permanece praticamente inalterada.

A faixa de trabalho definida para o pantotenato de cálcio situa-se entre 100 e 2000 ng injetado, aproximadamente.

10.4. SENSIBILIDADE

A partir do estudo de linearidade, obtém-se o valor de sensibilidade do método como a inclinação da curva padrão. Este valor é de 1174 unidades de área por unidade de massa injetada de pantotenato de cálcio.

10.5. PRECISÃO

Os resultados da avaliação de precisão realizada em leite em pó e fórmulas infantis encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Desvio padrão e limite de repetibilidade para leite/fórmula infantil em pó.

Produto	Desvio Padrão (mg/100g)	r (mg/100g)
Leite / Fórmula infantil – nível 1	0,12	0,34
	Valor médio = 3,12 mg/100g	
Leite / Fórmula infantil – nível 2	0,17	0,48
	Valor médio = 4,25 mg/100g	

r: limite de repetibilidade.

10.6. EXATIDÃO

A exatidão método foi avaliada com material de referência em leite em pó. A média dados obtidos encontra-se na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Resultados obtidos em análise de materiais de referência.

Material de Referência	Média (mg/100g)	Desvio Padrão (mg/100g)
Leite / fórmula infantil – nível 1	3,12	0,12
	Valor referência $3,87 \pm 0,42$	
Leite / fórmula infantil – nível 2	4,25	0,17
	Valor referência $5,04 \pm 0,56$	

Os dados obtidos para os materiais de referência em função do valor de referência estão plotados na Figura 4.6.

Figura 4.6: Gráfico dos valores de z-Score dos resultados obtidos em materiais de referência para ácido pantotênico.

10.7. LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O cálculo dos limites de detecção e quantificação foi realizado medindo-se a amplitude da linha de base e a altura do pico de um padrão diluído o suficiente para permitir estas duas medidas em um mesmo cromatograma.

O limite de detecção do método foi estabelecido em 0,2 mg/100g e o de quantificação em 0,7 mg/100g de pantotenato de cálcio.

10.8. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

Os resultados obtidos para os materiais de referência utilizados durante a validação garantem a especificidade do método para leite em pó.

Conforme descrito no Capítulo 1, também foram comparados resultados obtidos pelo método de CLAE, adaptado de WOOLLARD, INDYK, CHRISTIANSEN (2000), com resultados obtidos pelo método microbiológico. A Tabela 4.8 mostra os resultados de ácido pantotênico obtidos pelos diferentes métodos.

Tabela 4.8: Resultados de ácido pantotênico obtidos pelo método CLAE e microbiológico.

Produtos	Ácido Pantotênico (mg/100g)	
	Método Microbiológico	Método CLAE
Leite/Fórmula infantil em pó	4,59	4,56
	5,01	5,20
	5,96	5,85
	4,03	3,56
	4,58	4,43
	4,58	3,57
	4,36	3,80
	4,47	4,25
	3,92	4,14
	2,83	2,71
	4,58	4,33
	6,54	5,83
	6,10	5,65
	6,43	6,37
	6,21	5,43
	6,32	6,15
	4,69	5,48

Resultados médios de duas determinações

O resultado da avaliação estatística das diferenças obtidas entre os resultados encontra-se na Tabela 4.9 e mostra que os resultados obtidos pelos dois diferentes métodos são estatisticamente iguais, comprovando a especificidade do método proposto.

Tabela 4.9: Resultados da avaliação de especificidade do método proposto.

Diferença média (mg/100g)	R ²
- 0,17 ± 0,394	0,846

R²: coeficiente de determinação da regressão linear.

A Figura 4.7 traz os gráficos das diferenças e a reta de regressão que correlaciona os resultados dos dois métodos.

Figura 4.7: Gráfico das diferenças e da correlação entre resultados de ácido pantotênico obtidos pelo método microbiológico e CLAE.

11. CONCLUSÕES

Em função dos dados obtidos durante a validação, pode-se concluir que o método não é adequado a um laboratório de rotina, pois a separação cromatográfica do pantotenato de cálcio não é robusta e interferentes podem ser quantificados com o composto de interesse, levando a resultados inexatos. Esta interferência também influencia a precisão dos resultados, uma vez que a integração do pico da vitamina não é adequada.

Devido a este problema de separação cromatográfica, não é aconselhável aplicar este método em rotina de laboratório de controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Ácido pantotênico. In: PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP: Manole, 2003. cap.12, p.465-481.
- BENDER, D.A. Optimun nutrition: thiamin, biotin and pantothenate. Proceedings of the Nutrition Society, v. 58, p.427-433, 1999.
- FOTSIN, L.; FILLET, M.; BECHET, I.; HUBERT, P.H.; CROMMEN, J. Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 15, p.1113-1123, 1997
- KODAMA, S.; YAMAMOTO, A.; MATSUNAGA, A. Direct chiral resolution of pantothenic acid using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in capillary electrophoresis. Journal of chromatography A, v.811, p.269-273, 1998.
- LI, Y.; BROWN, P.R. The optimization of HPLC-UV conditions for use with FTIR detection in analysis of B vitamins. Journal of chromatographic science, v.41, p.1-4, 2003.
- FOX, H.M. Pantothenic acid. In: MACHLIN, J. Handbook of Vitamins. 2.ed. New York: M.Dekker, 1990. cap.11, p.437-458.
- MITTERMAYR, R.; KALMAN, A.; TRISCONI, M.J.; HEUDI, O. Determination of vitamin B5 in a range of fortified food products by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation. Journal of Chromatography A, v.1032, p.1-6, 2004.
- MURRAY, F. Pantothenic Acid: vitamin on the run. Better Nutrition for Today's Living, v. 52, p.1-2, 1990.
- OTTAWAY, P.B. The Technology of vitamins in food, 1.ed. London; New York, NY: Blackie Academic & Professional, 1993. 265p.

- PAKIN, C.; BERGAENTZLÉ, M.; HUBSCHER, V.; AOUDÉ-WERNER, D.; HASSELMANN, C. Fluorimetric determination of pantothenic acid in foods by liquid chromatography with post-column derivatization. *Journal of chromatography A* (article in press), 2004.
- ROMERA, J.M.; RAMIREZ, M.; GIL, A. Determination of pantothenic acid in infant formulas by high performance liquid chromatography. *J Dairy Sci*, v.79, p.523-526, 1995.
- RYCHLIK, M. Quantification of free and bound pantothenic acid in foods and blood plasma by stable isotope dilution assay. *J.Agric.Food Chem.*, v.48, p.1175-1181, 2000.
- RYCHLIK, M.; FREISLEBEN, A. Quantification of pantothenic acid and folates by stable isotope dilution assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.15, p.399-409, 2002.
- SMITH, C.M.; SONG, W.O. Comparative nutrition of pantothenic acid. *Nutritional Biochemistry*, v.7, p.312-321, 1996.
- SONG, W.O. Pantothenic acid : how much do we know about this B-complex vitamin ? *Nutrition Today*, v.25, p.1-5, 1990.
- WANG, L.H.; TSENG, S.W. Direct determination of D-panthenol and sal of pantothenic acid in cosmetic and pharmaceutical preparations by differential pulse voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, v.432, p.39-48, 2001.
- WOOLARD, D.C.; INDYK, H.E.; CHRISTIANSEN, S.K. The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC. *Food Chemistry*, v. 60, p.201-208, 2000.