UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de cereais

Ana Elisa Ferreira Presoto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian

São Paulo

2006

18673

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012313

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Presoto, Ana Elisa Ferreira
P934v Vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de cereais /
Ana Elisa Ferreira Presoto. -- São Paulo, 2006.
137p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Muradian, Ligia Bicudo de Almeida

1. Vitamina B : Ciência dos alimentos 2. Ferro : Ciência
dos alimentos 3. Farinha : Ciência dos alimentos I. T. II.
Muradian, Ligia Bicudo de Almeida, orientador.

641.18 CDD

Ana Elisa Ferreira Presoto

Vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de cereais

Comissão Julgadora da
dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian
(Orientadora/Presidente)

Profa. Dra. Marilene De Vuono Camargo Penteado
1º. Examinador

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
2º. Examinador

São Paulo, 27 de novembro de 2006.

Aos meus pais Vicente e Maria do Carmo
Ao meu marido Carlos Eduardo

Agradecimentos

À Profa Dra Ligia Bicudo de Almeida Muradian, pela orientação deste trabalho, mas especialmente pela orientação durante todo o meu desenvolvimento científico nos mais de 10 anos de nossa parceria.

À minha amiga Elaine Moreschi, pelo companheirismo e pela orientação prática e técnica durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do NQAC (Nestlé Quality Assurance Center), que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À Nestlé Brasil LTDA, pela disponibilização dos recursos analíticos, em especial à Rosângela Gorni e Donizeti Cezari.

À Adriana, da Biblioteca do Conjunto das Químicas (BCQ), pelo apoio prestado na elaboração das referências bibliográficas.

À minha irmã Adriana Presoto e aos meus amigos e familiares, que tiveram a paciência do convívio durante os anos de realização deste trabalho.

**“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.**

Chico Xavier

Sumário

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
2.1. Vitamina B ₁ (tiamina)	02
2.2. Vitamina B ₂ (riboflavina)	06
2.3. Vitamina B ₆ (piridoxina)	10
2.4. Niacina (vitamina PP ou B ₃)	13
2.5. Ácido fólico	16
2.6. Biotina (vitamina H)	18
2.7. Ácido pantotênico (vitamina B ₅)	20
2.8. Ferro	21
2.9. Métodos de análise de vitaminas do complexo B e ferro	22
2.9.1. Método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	22
2.9.2. Método de análise microbiológica	23
2.9.3. Análise de ferro por espectrofotometria de absorção atômica	25
2.10. Vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de cereais	26
2.11. Validação de métodos de análise	29
2.11.1. Etapas de validação de métodos de análise	30
2.11.2. Parâmetros de validação	31
3. OBJETIVO	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. MATERIAL	36
4.1.1. Escolha das amostras de farinhas de cereais	36
4.1.2. Amostragem	38
4.1.3. Padrões e reagentes	38
4.1.4. Equipamentos	40
4.2. MÉTODOS	42
4.2.1. Pesquisa dos dados mundiais do teor de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de cereais	42
4.2.2. Análise das Vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e Niacina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de farinhas de cereais	42

4.2.2.1. Extração simultânea para análise das vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ e niacina	42
4.2.2.2. Análise simultânea das vitaminas B ₁ e B ₂	43
4.2.2.3. Análise da vitamina B ₆ através dos vitâmeros piridoxol, piridoxal e piridoxamina	47
4.2.2.4. Análise de Vitamina PP através dos vitâmeros niacina e niacinamida	50
4.2.3. Análise de vitamina B ₁ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de farinhas de cereais com reação pré-coluna	53
4.2.4. Análise da vitaminas B ₂ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de farinhas de cereais	55
4.2.5. Análise de ácido fólico, biotina e ácido pantotênico por método microbiológico	57
4.2.5.1. Análise do ácido fólico por método microbiológico	59
4.2.5.2. Análise da biotina por método microbiológico	60
4.2.5.3. Análise do ácido pantotênico por método microbiológico ..	62
4.2.5.4. Condições analíticas para determinação das vitaminas ácido fólico, biotina e ácido pantotênico	64
4.2.6. Análise de ácido fólico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de farinhas de cereais	71
4.2.7. Análise de ferro por espectrofotometria de absorção atômica	73
4.2.8. Validação dos métodos analíticos	76
4.2.8.1. Campo de aplicação	77
4.2.8.2. Limite de detecção e limite de quantificação	77
4.2.8.3. Linearidade	78
4.2.8.4. Faixa de trabalho	78
4.2.8.5. Sensibilidade	78
4.2.8.6. Exatidão	78
4.2.8.7. Precisão	79
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1. Tabelas de composição de alimentos	79
5.2. Resultados preliminares dos teores das vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ , niacina, biotina, ácido fólico, ácido pantotênico e ferro em amostras de farinha de arroz, aveia, cevada, milho e trigo	86
5.3. Escolha do método para análise de vitamina B ₁ e B ₂	90

5.4. Validação dos métodos analíticos para as vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ , niacina (CLAE) e ferro (espectrofotometria de absorção atômica)	91
5.4.1. Campo de aplicação	92
5.4.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	92
5.4.3. Linearidade	93
5.4.4. Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	98
5.4.5. Sensibilidade	100
5.4.6. Exatidão	101
5.4.7. Precisão	102
5.5 Validação dos métodos microbiológicos de biotina, ácido fólico e ácido pantotênico	103
5.5.1. Campo de aplicação	103
5.5.2. Limite de quantificação	104
5.5.3. Linearidade	105
5.5.4. Sensibilidade	107
5.5.5. Exatidão	107
5.5.6. Precisão	108
5.6. Teores das vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ , niacina, biotina, ácido fólico, ácido pantotênico e ferro em amostras de farinha de arroz, aveia, cevada, milho e trigo	109
5.7. Comparação dos resultados de ácido fólico em farinhas de milho e trigo obtidos pelo método cromatográfico (CLAE) e microbiológico	124
6. CONCLUSÕES	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1: Estrutura molecular da vitamina B ₁ na forma de cloridrato de tiamina	03
Figura 2: Estrutura molecular da vitamina B ₂	07
Figura 3: Estrutura molecular dos vitâmeros da vitamina B ₆	10
Figura 4: Estrutura molecular dos vitâmeros da vitamina PP	14
Figura 5: Estrutura molecular do ácido fólico	16
Figura 6: Estrutura molecular da biotina	18
Figura 7: Estrutura molecular do ácido pantotênico	20
Figura 8: Sistema de CLAE utilizado para análise da vitamina B ₁ com detecção por reação pós coluna	44
Figura 9: Esquema de diluição para preparo da solução padrão concentrada de vitamina B ₁	45
Figura 10: Sistema cromatográfico utilizado para determinação de vitamina PP	51
Figura 11: Fatores de conversão das vitaminas hidrossolúveis ...	56
Figura 12: Esquema de diluição da solução concentrada de padrão de ácido fólico	60
Figura 13: Esquema de diluição da solução concentrada de padrão de biotina	61
Figura 14: Esquema de diluição da solução concentrada de padrão de pantotenato de cálcio	63
Figura 15: Esquema de diluição das soluções de calibração do padrão de ferro	74
Figura 16: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de vitamina B ₁	96
Figura 17: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de vitamina B ₂	96
Figura 18: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de vitamina B ₆	97
Figura 19: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de Niacina	98

Figura 20: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de Ferro	98
Figura 21: Curva de regressão da análise de ácido fólico	106
Figura 22: Curva de regressão da análise de biotina	106
Figura 23: Curva de regressão da análise de pantotenato de cálcio	106
Figura 24: Cromatogramas de vitamina B ₁ : (reação pré-coluna) solução padrão e amostra de farinha de trigo	111
Figura 25: Cromatogramas de vitamina B ₂ : solução padrão e amostra de farinha de aveia	111
Figura 26: Cromatogramas de vitamina B ₆ : solução padrão e amostra de farinha de aveia	111
Figura 27: Cromatogramas de vitamina PP: solução padrão e amostra de farinha de aveia	112
Figura 28: Teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos da amostra de farinha de arroz	115
Figura 29: Teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos das amostras de farinha de aveia	117
Figura 30: Teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos da amostra de farinha de cevada	119
Figura 31: Teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos das amostras de farinha de milho	121
Figura 32: Teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos das amostras de farinha de trigo	123

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1: Ingestão Diária Recomendada (IDR) para adultos	27
Tabela 2: Ingestão Diária Recomendada (IDR) para lactentes e crianças	28
Tabela 3: Maiores produtores brasileiros de farinha de cereais, segundo a ABIA	37
Tabela 4: Condições de amostragem de farinhas	38
Tabela 5: Preparo das soluções padrão diluídas de vitamina B ₁	45
Tabela 6: Preparo das soluções padrão diluídas de vitamina B ₂	47
Tabela 7: Preparo das soluções padrão diluídas de vitamina B ₆ contendo os três vitâmeros	50
Tabela 8: Preparo das soluções padrão diluídas de vitamina PP contendo os dois vitâmeros	53
Tabela 9: Condições de repique para desenvolvimento das cepas de microorganismo, conforme a vitamina analisada	65
Tabela 10: Condições para subcultivo das cepas de microorganismo, conforme a vitamina analisada	65
Tabela 11: Meio de cultura e concentração, conforme a vitamina analisada	66
Tabela 12: Condições de esterilização, conforme a vitamina analisada	68
Tabela 13: Condições de transmitância do inóculo, conforme a vitamina analisada	69
Tabela 14: Coeficientes de absorção molar ácido do fólico em solução de hidróxido de sódio 0,1 M em diferentes comprimentos de onda	73
Tabela 15: Parâmetros instrumentais de trabalho para análise de ferro	76
Tabela 16: Teores médios, obtidos na literatura, de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de arroz	81
Tabela 17: Teores médios, obtidos na literatura, de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de aveia	82
Tabela 18: Teores médios, obtidos na literatura, de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de cevada	83

Tabela 19: Teores médios, obtidos na literatura, de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de milho	84
Tabela 20: Teores médios, obtidos na literatura, de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de trigo	85
Tabela 21: Resultados preliminares dos teores de vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de arroz	87
Tabela 22: Resultados preliminares dos teores de vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de aveia	87
Tabela 23: Resultados preliminares dos teores de vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de cevada	88
Tabela 24: Resultados preliminares dos teores de vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de milho	88
Tabela 25: Resultados preliminares dos teores de vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de trigo	89
Tabela 26: Limite de detecção e quantificação do método para a análise das vitaminas B ₁ e B ₂ utilizando reação pós-coluna	91
Tabela 27: Faixas de teores de micronutrientes às quais a metodologia se aplica	92
Tabela 28: Limite de detecção e quantificação dos métodos propostos	93
Tabela 29: Linearidade das análises de vitamina B ₁ e B ₂	94
Tabela 30: Linearidade da análise dos vitâmeros da vitamina B ₆ ...	94
Tabela 31: Linearidade da análise dos vitâmeros da vitamina PP ..	95
Tabela 32: Linearidade da análise de ferro	95
Tabela 33: Faixa linear de trabalho, limites de concentração de amostra e limite de quantificação para a análise das vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ , PP e ferro	99
Tabela 34: valores de sensibilidade obtidos para as vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ , niacina e ferro	100
Tabela 35: Dados de exatidão (recuperação) obtidos a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de aveia adicionadas de vitamina B ₁ , B ₂ , B ₆ e PP	101
Tabela 36: Dados de exatidão (recuperação) obtidos a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de trigo adicionada de ferro	101

Tabela 37: Limites de repetibilidade obtidos de teores de vitaminas calculados a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de aveia	102
Tabela 38: Limites de repetibilidade obtidos de teores de ferro calculados a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de trigo	103
Tabela 39: Faixas de teores de micronutrientes às quais a metodologia se aplica	104
Tabela 40: Limite de quantificação das vitaminas avaliadas pelo método microbiológico	104
Tabela 41: Linearidade das análises de ácido fólico, biotina e ácido pantotênico	105
Tabela 42: Dados de exatidão (recuperação) obtidos a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de aveia adicionada de ácido fólico, biotina e ácido pantotênico	107
Tabela 43: Limites de repetibilidade obtidos de teores de vitaminas calculados a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de aveia (ácido fólico, biotina e ácido pantotênico) e trigo (ácido fólico)	108
Tabela 44: Médias e desvios padrão relativos das vitaminas B ₁ , B ₂ , B ₆ , niacina e ferro em amostras de farinha de arroz, aveia, cevada, milho e trigo (método cromatográfico (CLAE) e espectrofotometria de absorção atômica)	110
Tabela 45: Médias e desvios padrão relativos da biotina, ácido pantotênico e ácido fólico em amostras de farinha de arroz, aveia, cevada, milho e trigo (método microbiológico)	113
Tabela 46: Médias de ácido fólico em amostras de farinha de milho e trigo analisadas por método microbiológico e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	125

VITAMINAS DO COMPLEXO B E FERRO EM FARINHAS DE CEREAIS

Resumo

As vitaminas do complexo B e o ferro estão presentes em farinhas de cereais, alimentos amplamente consumidos pela população brasileira. O teor natural desses compostos em farinhas de cereais pode ser significativo no cálculo de uma dieta bem balanceada e o consumo de produtos industrializados enriquecidos com vitaminas do complexo B e ferro ajuda a contribuir na ingestão diária recomendada desses micronutrientes. Tabelas Mundiais de Composição de Alimentos apresentam dados incompletos das vitaminas do complexo B e do ferro em farinhas de cereais. No Brasil, a adição de ácido fólico e ferro em farinhas de milho e trigo produzidas para fins industriais é obrigatória desde 2002. Deste modo, para a adequação dos teores de rotulagem de produtos enriquecidos com vitaminas e ferro se fazem necessários o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas confiáveis e sensíveis para análise de vitaminas do complexo B e ferro em alimentos que apresentam tais micronutrientes em quantidades baixas, porém significativas, que correspondem aos teores naturalmente presentes.

O objetivo do presente trabalho é a avaliação dos teores de sete vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₆, ácido pantotênico, ácido fólico, niacina e biotina) e ferro em cinco farinhas de cereais (aveia, arroz, cevada, milho e trigo) utilizadas como matéria prima de produtos enriquecidos na indústria alimentícia, utilizando métodos validados.

COMPLEX B VITAMINS AND IRON IN CEREAL FLOUR

Abstract

Complex B vitamins and iron are present in some cereal foods, a kind of food largely consumed by Brazilian people. The total of these micronutrients can be significant at the dairy ingestion portion and in the consume of industrialized products enriched with complex B vitamins and iron contribute in the recommended dietary intake of these micronutrients.

Table of food composition do not report complete data of complex B vitamins and iron in cereal flours. In Brazil, since 2002 the addition of folic acid and iron in corn and wheat flours is compulsory. Therefore, to adapt the label of some products enriched with vitamins and iron, there is necessary the development and validation of analytical methods. These methods must be reliable and with enough sensitivity to analyse complex B vitamins and iron, in low concentration, wich are natural content in food.

The purpose of this work is the evaluation, with validated methods, of the content of seven complex B vitamins (B1, B2, B6, niacin, folic acid, pantothenic acid and biotin) and iron in five kinds of cereal flours (oat, rice, barley, corn and wheat). These raw materials are used in food industry in order to enrich the industrialized products.

1. INTRODUÇÃO

As vitaminas fazem parte de um grupo de nutrientes orgânicos não relacionados quimicamente e essenciais em pequenas quantidades para o metabolismo e crescimento normais, para o bem-estar físico, além do papel preventivo através do efeito antioxidante que algumas delas exercem, protegendo os tecidos contra lesões provocadas por reações com o oxigênio. Por não serem sintetizados no nosso organismo ou o serem, mas em quantidades inadequadas, esses nutrientes precisam ser obtidos através da alimentação (TIRAPEGUI, 2000). Ultimamente, estudos científicos relacionam a ingestão de vitaminas com a prevenção de doenças da atualidade, como o câncer (PENTEADO, 2003).

As vitaminas são classificadas quanto à solubilidade; as lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) constituem um grupo de substâncias químicas, com estrutura variada, solúveis em solventes orgânicos, podendo ser armazenadas na gordura corpórea e atingir níveis tóxicos quando consumidas em excesso. As hidrossolúveis (Vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂, ácido fólico, ácido pantotênico, niacina, biotina e vitamina C) não são normalmente armazenadas em quantidades significativas no organismo, o que leva à necessidade de um suprimento diário dessas vitaminas (HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998). As vitaminas hidrossolúveis participam do metabolismo de gorduras, carboidratos e proteínas em diversos pontos das reações (TIRAPEGUI, 2000).

Assim como as vitaminas, o ferro é um micronutriente essencial e sua deficiência pode causar a anemia ferropriva. As vitaminas do complexo B e o ferro estão presentes em farinhas de cereais, alimentos amplamente consumidos pela população brasileira. O teor natural desses compostos em farinhas de cereais pode ser significativo no cálculo de uma dieta bem balanceada e o consumo de produtos industrializados enriquecidos com vitaminas do complexo B e ferro ajuda a contribuir na ingestão diária recomendada desses micronutrientes. No Brasil, a adição de ácido fólico e ferro em farinhas de milho e trigo produzidas para fins industriais é obrigatória desde 2002. Deste modo, para a adequação dos teores de rotulagem de produtos enriquecidos com vitaminas e ferro se fazem necessários o

desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas confiáveis e sensíveis para análise de vitaminas do complexo B e ferro em alimentos que apresentam tais micronutrientes em quantidades baixas, porém significativas, que correspondem aos teores naturalmente presentes.

O método mais utilizado para a análise das vitaminas do complexo B atualmente é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com diferentes formas de detecção. Apesar do método microbiológico ter sido um dos primeiros a ser utilizado para determinação de vitaminas do complexo B em alimentos, esta técnica ainda é empregada, pois apresenta uma boa sensibilidade e não é prejudicada pela complexidade da matriz da maioria dos alimentos. A espectrofotometria de absorção atômica é amplamente utilizada para análise de ferro, tanto para determinação deste micronutriente em alimentos como em outras amostras. Existe uma carência de dados de composição vitamínica e ferro em alimentos para confecção de Tabelas de Composição de Alimentos. Os métodos a serem utilizados para tais análises devem ser devidamente validados para que os resultados obtidos apresentem confiabilidade analítica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vitamina B₁ (tiamina)

A vitamina B₁ ou tiamina, que tem sua estrutura mostrada na Figura 1, foi a primeira vitamina a ser descoberta no início do século XX. Por possuir uma amina em sua estrutura e ser essencial à vida foi denominada vitamina. Sua forma comercial, o cloridrato de tiamina, é uma substância cristalina de cor branca amarelada; em solução aquosa é estável em pH abaixo de 5,0 e ao calor, mas instável acima desse pH e frente ao oxigênio e radiações. Em soluções alcalinas fortes, na presença de agentes oxidantes como ferricianeto de potássio, a tiamina é convertida em tiocromo, composto fluorescente utilizado para sua determinação. Na presença de ácidos, ela forma ésteres, sendo os mais importantes o monofosfato de tiamina (TMP) e o trifosfato de tiamina (TTP). É muito solúvel em

água (1:1), solúvel em glicerol, pouco solúvel em álcool e insolúvel em clorofórmio e éter. O espectro de absorção do cloridrato de tiamina varia conforme o pH. Assim, em pH 2,9, o comprimento de onda de máxima absorção é igual à 246 nm e em pH 5,5, à 234 nm. Pode sofrer oxidação na presença da riboflavina, formando o tiocromo, decompor o ácido fólico em soluções de pH 5,9 a 6,9 e degradar a cianocobalamina, quando em presença da niacinamida. A sensibilidade da tiamina frente ao calor e álcalis foi reconhecida logo após a sua descoberta. A tiamina é uma das vitaminas mais termolábeis que se conhece (GUBLER, 1990; HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003a).

Figura 1: Estrutura molecular da vitamina B₁ na forma de cloridrato de tiamina.

A vitamina B₁ tem como função principal a participação como coenzima no metabolismo de carboidratos, estando as suas necessidades ligadas à ingestão desses macronutrientes; na forma de TPP (pirofosfato de tiamina), ela auxilia no fornecimento de energia através do Ciclo de Krebs. Dentre vários papéis importantes, a tiamina tem participação na condução do impulso nervoso, auxiliando a passagem dos íons sódio pela membrana celular (HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998; TIRAPEGUI, 2000).

Os alimentos fontes de tiamina são, principalmente, a carne de porco magra e o germe de trigo. Também é encontrada no fígado, outras vísceras, gema de ovo, peixes e grãos integrais, além do leite e derivados, frutas e vegetais. A deficiência da tiamina causa o beribéri (desordens no sistema nervoso e cardiovascular) e a Síndrome de Wernicke-Korsakoff (oftalmoplegia, ataxia e

perda de memória). Como se trata de um composto hidrossolúvel, sua ingestão contínua é recomendada e, assim, alguns alimentos são usualmente fortificados para suprir esta necessidade, como farinhas de cereais e arroz, que, quando polido, é um alimento que perde seus teores naturais e causa a deficiência na população que tem esse alimento como primeira opção. A tiamina é precipitada por alguns sais de ferro, citrato de amônio, tanino e vários alcalóides, podendo ter sua biodisponibilidade diminuída em alimentos (GUBLER, 1990; HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003a).

Os cereais são fontes significativas de vitamina B₁, sendo que os locais do grão onde existe teor mais significativo de vitamina B₁ são o germe e o escutelo. A farinha beneficiada com grão inteiro também é rica nesta vitamina. No trabalho de BETSCHART (1999), os teores de vitamina B₁ encontrados em farinha de trigo e farinha de cevada foram de 0,7 e 0,8 mg/kg, respectivamente, e de acordo com o autor, tais valores correspondem a apenas 10% dos teores encontrados nos grãos inteiros. Por esta razão, as farinhas são normalmente enriquecidas com vitamina B₁ em muitos países industrializados.

Os métodos mais citados na literatura para análise de tiamina são os que utilizam o método microbiológico e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nos alimentos enriquecidos, as vitaminas adicionadas normalmente estão na forma livre.

A hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática é um procedimento comum para a extração da tiamina (GUBLER, 1990; AUGUSTIN, 1994). O ácido clorídrico diluído é bastante usado na etapa de hidrólise ácida, sendo empregadas temperaturas de 95° a 100° C por uma hora ou trinta minutos. As enzimas comerciais mais comumente utilizadas para a digestão enzimática são a takadiastase, a claradiastase e a amilase. Quando houver interesse na quantificação das diferentes formas de tiamina (livre e ligada), é necessário empregar um agente desproteinizante na amostra, como o ácido tricloroacético (TCA) ou o perclórico à temperatura ambiente, seguido de filtração ou centrifugação (GUBLER, 1990; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003a).

Em produtos de origem vegetal, a vitamina B₁ ocorre predominantemente na forma não fosforilada (OTTAWAY, 1993; BALL, 1994), portanto a extração pode ser realizada apenas com a hidrólise ácida para a liberação das proteínas da matriz, ficando dispensada a hidrólise enzimática, que é responsável por converter as formas fosforiladas em formas livres (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003a).

No método fluorimétrico, a amostra é tratada com hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática e uma etapa de purificação em cromatografia de troca iônica em coluna aberta. Realiza-se a derivatização com ferricianeto de potássio em meio alcalino para formar o tiocromo (derivado fluorescente da tiamina), o qual é extraído em isobutanol (AUGUSTIN, 1994). Na cromatografia gasosa, o tratamento com sulfito quebra a tiamina formando um tiazol. O derivativo 5 (2-hidroxietil) – 4 – metil-tiazol é extraído com solventes orgânicos e possui as características necessárias para análise por cromatografia gasosa, sendo que a tiamina é termo sensível e não volátil, não podendo ser determinada por cromatografia gasosa diretamente (BALL, 1998). No método microbiológico, dentre os microorganismos mais empregados estão o *Lactobacillus viridescens* e o *Lactobacillus fermentum* (OTTAWAY, 1993). No método por cromatografia líquida, as colunas mais freqüentemente empregadas são as de fase reversa. Utilizam-se diversas fases móveis compostas por água ou soluções tampões e solventes orgânicos. Uma técnica freqüentemente aplicada é a cromatografia de interação iônica ou de íons pareados. Na fase móvel são adicionados íons anfifílicos que irão influenciar na retenção dos analitos iônicos presentes na amostra, ocorrendo o aumento da retenção do composto que apresenta carga oposta à do íon pareante. Logo, compostos com a mesma carga terão tempo de retenção reduzido. Como exemplo de íon pareado temos o ácido hexanossulfônico (paired-ion chromatography - PIC B6), o heptanossulfônico (PIC B7) e o octano sulfônico (PIC 8). O sistema de eluição comumente empregado é o isocrático e tanto a detecção por UV como por fluorescência podem ser empregadas na determinação desta vitamina. Porém, a utilização da fluorescência é preferível quando se trata de amostras não enriquecidas, já que os teores naturalmente

presentes são baixos e por UV acabam sendo detectados muitos interferentes. Na detecção por fluorescência, a tiamina deve então ser convertida em composto fluorescente e a derivatização pode ser pré ou pós-coluna. A derivatização pré-coluna não pode ser utilizada em análise simultânea, já que a reação pode destruir outras vitaminas presentes, o que impede que a quantificação seja realizada numa mesma corrida cromatográfica. O método fluorimétrico e o por CLAE normalmente produzem resultados concordantes. Os resultados dos ensaios microbiológicos tendem a ser maiores que os obtidos por CLAE (GUBLER, 1990; OTTAWAY 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003a).

A reação de conversão da tiamina em tiocromo foi descrita por Ollilainen *et al.* (1993). Neste trabalho, a solução de extração sofreu reação com ferricianeto de potássio (solução 0,25 %) em 15% de hidróxido de sódio, seguida de adição de ácido orto-fosfórico 1,5M. Foi ressaltada a importância deste procedimento em amostras nas quais o teor de vitamina é baixo e a matriz é complexa a fim de possibilitar uma detecção mais específica por CLAE.

2.2. Vitamina B₂ (riboflavina)

A riboflavina é um composto hidrossolúvel que na forma cristalina apresenta coloração alaranjada e, quando dissolvida, forma solução amarela esverdeada, com certo odor característico. Sua estrutura molecular está mostrada na Figura 2. Em solução, a riboflavina apresenta quatro comprimentos de onda de absorção máxima em UV: 223nm, 267 nm, 373 nm e 444nm. Esta vitamina é naturalmente fluorescente, termicamente estável, mas muito sensível à ação da luz, sendo convertida a lumicromo quando em pH ácido ou a lumiflavina, quando em pH alcalino. É insolúvel em álcool, clorofórmio e éter. Apresenta maior solubilidade em solução de cloreto de sódio (0,9%) e soluções alcalinas diluídas. Em meio aquoso, a riboflavina pode exercer efeito oxidante sobre a tiamina, ocasionando a formação e precipitação do tiocromo. O ácido fólico é degradado na presença de riboflavina e luz, principalmente em pH = 5 ou maior. O ácido ascórbico também pode ser fotodegradado pela riboflavina (COOPERMAN e LOPEZ, 1990;

HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003b).

Figura 2: Estrutura molecular da vitamina B₂.

Por apresentar propriedade química característica e ser uma das vitaminas hidrossolúveis mais resistente ao calor, a mesma pode ser usada como um antioxidante em alimentos tanto na forma hidrossolúvel, como lipossolúvel, mas somente em alimentos protegidos da luz. Uma vez que a riboflavina e seus homólogos atuam como sensibilizadores na presença de luz, tornando-se moléculas fotoativas e ao reagirem com o oxigênio molecular, dão origem a espécies reativas de oxigênio, elas podem ser responsáveis pela oxidação lipídica, que é um dos principais fatores de degradação em alimentos, causando perdas tanto na qualidade nutricional quanto nas características organolépticas (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003b).

Esta vitamina ocorre naturalmente também sob a forma de seus derivados, conhecidos como coenzimas flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), grupos prostéticos para uma série de enzimas flavinas (flavoproteínas). Tem função essencial nos processos de oxido-redução e na produção de energia via cadeia respiratória. As flavinas são necessárias também na conversão da vitamina B₆ e do ácido fólico em formas coenzímicas ativas (BALL, 1994; HOOFFMANN, 1997).

Como alimentos fonte da vitamina B₂ encontramos o leite, a clara de ovo, os peixes, o fígado, o coração, os germes e os farelos. Já as frutas e os vegetais apresentam quantidades menores de vitamina B₂, que podem ser perdidas nos processos de branqueamento, congelamento e fervura, principalmente quando se adiciona bicarbonato de sódio para preservar a cor verde desses alimentos. O farelo de trigo é considerado uma boa fonte de riboflavina. Cereais em grãos contêm quantidades relativamente baixas deste micronutriente. A riboflavina é uma das vitaminas mais resistentes ao calor, permanecendo estável durante o aquecimento e o cozimento de alimentos, desde que protegida da luz. Muitos trabalhos foram realizados para avaliação da sensibilidade da riboflavina em altas temperaturas e quanto à presença de luz, em amostras de leite (HOOFFMANN, 1997; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003b).

A deficiência em riboflavina tem como sintomas lesões nas superfícies mucocutâneas da boca e na pele, vascularização da córnea, e em casos severos, ocorre dermatite seborréica nas dobras nasolabiais e dermatite vulvária e escrotal (COOPERMAN e LOPEZ, 1990; HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003b).

As técnicas de análise mais comumente usadas são o método fluorimétrico, o método microbiológico e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise, tanto fluorimétrica como por ensaios microbiológicos, depende da extração das formas ligadas. Na hidrólise ácida ocorre a conversão de FAD em FMN, seguida de hidrólise enzimática quando o FMN é convertido em riboflavina livre. Realiza-se digestão ácida e precipitação das proteínas pelo ajuste do pH. A eliminação de outros compostos fluorescentes (interferentes) é feita através da etapa de oxidação com solução de permanganato de potássio (AUGUSTIN, 1994). No método microbiológico, dentre os microorganismos mais empregados estão o *Lactobacillus casei* e o *Enterococcus faecalis* (OTTAWAY, 1993). Para a obtenção da forma livre é empregada a hidrólise ácida com ácido mineral diluído: ácido sulfúrico 0,2 M a 121° C por 20 minutos ou ácido clorídrico 0,1 M a 100° C em banho-maria ou a 121° C em autoclave por 30 minutos. Este processo desnatura as proteínas, contribuindo para a liberação da vitamina da matriz

alimentícia, bem como a conversão da FAD para FMN, e também conversão parcial de FMN para riboflavina livre. Na hidrólise enzimática emprega-se normalmente a takadiastase, a claradiastase, a mistura de takadiastase e beta-amilase, a mistura de takadiastase com claradiastase e papaína. Quando há interesse na análise das diferentes formas de riboflavina, é suficiente uma simples acidificação da amostra com ácido tricloroacético (TCA) para precipitação de proteínas, seguida de filtração ou centrifugação. As condições cromatográficas para a análise de vitamina B₂ são as mesmas citadas para a vitamina B₁, sendo que elas podem ser extraídas simultaneamente. O método fluorimétrico e o de CLAE normalmente produzem resultados concordantes (COOPERMAN e LOPEZ, 1990; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003b).

No método AOAC 970.65 indicado para análise de vitamina B₂ total presente em alimentos (AOAC, 1996a), o tratamento com KMnO₄ e H₂O₂ para remoção do "background" de fluorescência pode ocasionar a perda da vitamina B₂. Este método é cansativo, demorado e pode superestimar a quantidade de vitamina B₂ total devido à presença de interferentes. Os métodos que utilizam a CLAE em fase reversa com detecção por UV-VIS ou por fluorescência permitem a determinação de derivados da vitamina B₂, mesmo que presente em pequena quantidade (GLISZCZYNSKA-SWIGLO e KOZIOLOWA, 2000).

Segundo BETSCHART (1999) a maior parte da vitamina B₂ encontrada em grãos de cereais está localizada no germe. Em seu trabalho, foi analisada uma amostra de farinha de cevada utilizando a técnica de CLAE e o teor encontrado foi de 1,3 mg de vitamina B₂/Kg de produto. As vitaminas B₁ e B₂ foram avaliadas em cereais por Hägg e Kumpulainen (1993) em amostras finlandesas de farinha de cevada utilizando o método de CLAE e foram encontrados os seguintes resultados: 0,23-0,32 mg de vitamina B₁ e 0,06-0,10 mg de vitamina B₂/100g de amostra. Foi ressaltado pelos autores que alguns dados não correspondiam aos apresentados na Tabela Nacional daquele país, provavelmente porque muitas dessas informações são importadas de outras tabelas e ainda por divergências de metodologia, como amostragem e especificidade. Em um outro trabalho publicado pelos mesmos autores (HÄGG e KUMPULAINEN, 1994) foram encontrados os

seguintes valores: 0,32-0,72 mg de vitamina B₁ e 0,07 mg de vitamina B₂ /100 g de farinha de aveia.

2.3. Vitamina B₆ (piridoxina)

A vitamina B₆ é um nome genérico para todos os derivados 3-hidroxi-2-metilpiridina que exibem qualitativamente atividade biológica de piridoxina: piridoxina ou piridoxol, piridoxal e piridoxamina e suas respectivas formas fosforiladas. A forma cloridrato de piridoxol é a utilizada na fortificação de alimentos. A estrutura molecular dos principais vitâmeros da vitamina B₆ está apresentada na Figura 3. Tanto a absorção dessas formas, quanto à sua fluorescência são dependentes do pH da solução. O cloridrato de piridoxina é um pó branco, ou quase branco, cristalino. Quanto ao calor, todas as formas são relativamente estáveis em meio ácido, mas termolábeis em meio alcalino (DRISKELL, 1990; OTTAWAY, 1993; HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003c).

R = CH ₂ OH	= Piridoxina
R = CHO	= Piridoxal
R = CH ₂ NH ₂	= Piridoxamina

Figura 3: Estrutura molecular dos vitâmeros da vitamina B₆.

Como alimentos fonte da vitamina B₆ encontramos cereais em grãos, nozes, peixes, carnes magras, rins, batatas e outros vegetais, além de leite, ovos e frutas, nos quais esta vitamina está presente em menores quantidades. O trigo integral apresenta teores relativamente altos de vitamina B₆ e cereais integrais são alimentos fontes dessa vitamina (HOOFFMANN, 1997; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003c).

Um dos vitâmeros da vitamina B₆ pode ocorrer naturalmente numa forma ligada, como um glicosídeo denominado PNG: 5'-O-(β-D-glicopiranosil) piridoxina, o qual está presente em alimentos de origem vegetal em maior quantidade frente aos outros vitâmeros (piridoxal e piridoxamina). Como este composto apresenta um menor aproveitamento pelo organismo e exerce um papel antagonista em relação aos demais vitâmeros de vitamina B₆, existe uma certa preocupação quanto à sua quantificação no alimento. Quando se utiliza somente a desproteínização ocorre a quantificação dos teores das formas glicosídicas. Se for seguida de hidrólise enzimática, a vitamina B₆ presente nas formas fosforiladas e glicosídicas, passam a estar na forma livre. Todo este processo também ocorre quando se usa hidrólise ácida com ácido clorídrico em altas temperaturas na etapa de extração da vitamina B₆ (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003c).

A piridoxina apresenta papel crítico na estrutura e integridade funcional dos sistemas nervoso central e periférico e está envolvida no metabolismo de ácido fólico e vitamina B₁₂. As aminas biogênicas dopamina, serotonina, histamina e GABA, importantes neurotransmissores, são sintetizadas ou metabolizadas com a ajuda da forma piridoxal fosfato dependente de reações enzimáticas; esta forma também está envolvida no metabolismo de aminoácidos (DRISKELL, 1990; HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003c).

As técnicas mais comumente usadas para determinação da vitamina B₆ são: método fluorimétrico, método microbiológico e cromatografia líquida de alta eficiência. Tanto no método microbiológico quanto no método de CLAE, a etapa de extração é de extrema importância, sendo que para o primeiro, as vitaminas precisam estar na forma livre para poderem ser utilizadas pelos microorganismos.

Para a desproteínização são empregados agentes desproteinizantes como o ácido tricloroacético (TCA), o ácido sulfossalicílico (SSA), o ácido perclórico e o ácido metafosfórico, que desnaturam as proteínas liberando as vitaminas e mantendo a forma glicosídeo intacta. Na hidrólise enzimática emprega-se normalmente a fosfatase ácida e a beta-glicosidase, que servem, respectivamente para converter as formas fosforiladas às formas livres e hidrolisar a piridoxina na forma glicosídeo, liberando-a. Um outro procedimento empregado é a hidrólise ácida com ácido sulfúrico à 121° C, ou ácido clorídrico, o que promove a hidrólise das formas ligadas. Para produtos de origem vegetal, emprega-se autoclave por 2 horas à 121 °C em ácido clorídrico 0,44N, enquanto que os de origem animal, autoclave por 5 horas à 121 °C em ácido clorídrico 0,055N (DRISKELL, 1990; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003c).

Na CLAE, utiliza-se a reação pós-coluna com bissulfito de sódio para a detecção do piridoxal-5-fosfato quando existe presença considerável desta forma, pois a mesma apresenta baixa fluorescência. No método microbiológico, dentre os microorganismos mais empregados estão o *Saccharomyces carlsbergensis*, que responde às três formas da vitamina B₆, *Neurospora sitophila*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kloeckera apiculata* (OTTAWAY, 1993). A análise por CLAE produz resultados ligeiramente maiores quando comparados aos obtidos através do método microbiológico, devido à presença de piridoxamina, pois os microorganismos apresentam menor resposta frente à este vitâmero comparativamente à piridoxina, que é utilizada como padrão nestes ensaios (BALL, 1994).

No trabalho de Mann (2005) foi citado que a maioria dos métodos publicados para a análise de vitamina B₆ por CLAE permite a quantificação dos três vitâmeros (piridoxina, piridoxamina e piridoxal), depois da hidrólise das respectivas formas esterificadas, considerando a fluorescência natural da vitamina B₆. Quando a enzima fosfatase ácida é utilizada para hidrólise dos fosfatos e ácido glicoxílico para desaminação da piridoxamina na presença de ferro, a vitamina B₆ é convertida em piridoxina. O piridoxal é reduzido a piridoxina na presença de

borohidrato de sódio e finalmente a piridoxina total produzida é detectada por CLAE com detector de fluorescência à 290nm de excitação e 395 nm de emissão (MANN, 2005).

Resultados obtidos de vitamina B₆ pelo método microbiológico e CLAE em grãos foram comparados por Kall (2003). O método microbiológico apresentou resultados em média 23% maiores do que o método por CLAE, o que foi considerado insignificante pelo autor. O teor encontrado de piridoxina, piridoxal e piridoxamina em farinha de cevada foram 0,039, 0,074, 0,055 mg/100g, respectivamente e em farinha de trigo foram respectivamente, 0,027, 0,013, 0,015 mg/100g utilizando o método CLAE. Através do método microbiológico, os resultados foram 0,22 e 0,09 mg/100g de vitamina B₆ total, respectivamente nas farinhas de cevada e trigo (KALL, 2003).

2.4. Niacina (vitamina PP ou B3)

Os vitâmeros da vitamina PP (niacina e niacinamida, também conhecidos como niacina e niacinamida, respectivamente) não são afetados pelo oxigênio atmosférico, pela luz ou pelo aquecimento na forma de pó e em soluções neutras, (BALL 1994; HOOFFMANN, 1997). A estrutura molecular dos vitâmeros da vitamina PP está apresentada na Figura 4. A niacinamida é hidrolizada quantitativamente a niacina quando autoclavada em solução ácida ou alcalina a 1N, sendo a niacina resistente à estas condições.

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. As coenzimas oxidadas (NAD⁺ e NADP⁺) são lábeis ao álcalis e as reduzidas (NADP e NADPH) são lábeis ao ácido (OTTAWAY, 1993; BALL, 1994; SANT'ANA, 2003).

Figura 4: Estrutura molecular dos vitâmeros da vitamina PP.

A vitamina PP é encontrada em muitos alimentos em formas que não são liberadas através da digestão. Farelo de trigo e grãos de cereais integrais são alimentos considerados ricos em niacina. Em grãos, a niacina está presente na forma de complexos covalentemente ligados com pequenos peptídeos e carboidratos, sendo a niacina esterificada normalmente não disponível nestes complexos. Em outros alimentos a niacina está presente como derivados metilados que funcionam como hormônio vegetal, não biologicamente disponível aos animais. Esta forma, contudo, é lábil ao calor e pode ser convertida à niacina durante o aquecimento de alimentos (SANT'ANA, 2003). Foi sugerido por Mason e Kodicek (1973), em citação de Ball (1994), que a não disponibilidade da niacina ligada em cereais é devido a sua associação com hemicelulose não digerível, que impede o acesso de esterases gatrointestinais às ligações nicotinil-éster.

Uma quantidade substancial de niacina pode ser sintetizada a partir do aminoácido triptofano. Embora a eficiência do processo seja relativamente baixa (em humanos cerca de 60 mg de triptofano são requeridos para produzir 1 mg equivalente de niacina), a adequação nutricional das dietas deve considerar tal síntese (BALL, 1994).

As determinações de vitaminas naturalmente presentes em alimentos são difíceis de serem realizadas por causa da natureza complexa da matriz alimentar, dos baixos teores encontrados e da presença de vitaminas nas suas formas ligadas. Os termos niacina total e niacina livre são definidos pelos métodos de

extração empregados na análise de vitamina PP (BALL, 1994; HOOFFMANN, 1997; SANT'ANA, 2003).

A técnica microbiológica para análise de niacina utiliza o microorganismo *Lactobacillus plantarum*, que responde igualmente bem à niacina, à niacinamida e ao NAD, apesar de não diferenciar as duas primeiras formas (BALL, 1994).

A análise de niacina em matrizes complexas de alimentos utilizando a cromatografia líquida é difícil devido à presença de componentes endógenos que absorvem no comprimento de onda de 260 nm, normalmente utilizado para análise desta vitamina por CLAE. Outra problemática encontrada na cromatografia líquida é a possível presença de material particulado resultante da etapa de extração com ácido sulfúrico, o que reduz o tempo de vida da coluna cromatográfica. No trabalho de LaCROIX *et al.* (1999), foi determinada a presença de niacina em farinha de trigo por cromatografia líquida de troca aniônica, utilizando cartucho de extração de fase sólida no pré-tratamento da amostra, o que eliminou os problemas acima citados.

A niacina foi analisada por Agostini e Godoy (1997), através dos seus dois vitâmeros, por CLAE, juntamente com as vitaminas B₁, B₂ e B₆, em alimentos industrializados enriquecidos com vitaminas. A análise simultânea dessas vitaminas apresenta bons resultados porque os teores encontrados em alimentos enriquecidos são altos, quando comparados aos alimentos que apresentam teores naturalmente presentes de micronutrientes, ficando, neste caso, mais evidentes os interferentes da matriz. A vitamina B₆, neste trabalho, não foi avaliada através dos seus vitâmeros. Comparando os resultados encontrados com os valores declarados nos rótulos, os autores concluíram que a adição de vitaminas em alimentos no Brasil é realizada com pouco controle, considerando os problemas que ocorrem em relação à quantidade adicionada destes micronutrientes e as perdas durante o processo (AGOSTINI e GODOY, 1997).

2.5. Ácido fólico

Folato é o termo genérico utilizado para denominar uma grande família de compostos semelhantes quimicamente, derivados do ácido pteróico, que demonstram atividade vitamínica em humanos. Tais compostos existem predominantemente como poliglutamatos, contendo de 5 a 7 resíduos de glutamato ligados à um peptídeo, o que possibilita um número teórico de 150 diferentes folatos. O ácido fólico ou pteroilmonoglutamato, vitamina hidrossolúvel do complexo B é um análogo estável e sintético do folato e sua estrutura molecular está apresentada na Figura 5. Na maioria das metodologias de análise realizadas em alimentos para determinação de ácido fólico, as cadeias de poliglutamatos não são passíveis de análise, sendo necessária uma etapa enzimática para análise das formas monoglutamílicas (HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998).

Figura 5: Estrutura molecular do ácido fólico.

As várias coenzimas de folato facilitam a transferência de unidades de carbono a partir de moléculas doadoras em importantes processos de biossíntese de nucleotídeos e certos aminoácidos, que levam a formação de metionina, purina e pirimidina. Elas também são mediadoras da interconversão de serina e glicina e participam do catabolismo da histidina. O ácido fólico é a forma estável e sintética, precursora das coenzimas de folato (HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998).

A multiplicidade e diversidade dos folatos naturalmente presentes, sua instabilidade e presença em baixa concentração em tecidos biológicos dificulta a separação, identificação e quantificação desses compostos. A análise microbiológica é a mais usada para a determinação de folatos totais em alimentos;

utiliza o microorganismo *Lactobacillus casei* depois da digestão enzimática com conjugase. Esta determinação de ácido fólico como folatos totais só é possível pois este microorganismo utiliza igualmente todas as formas monoglutamílicas para o seu crescimento, nas condições analíticas utilizadas (BALL, 1998).

Pouco se sabe sobre a extensão e os mecanismos de perda dos folatos durante o processamento dos alimentos, comparado com o conhecimento que existe para as outras vitaminas hidrossolúveis. A forma comercial utilizada na fortificação (ácido fólico) é mais estável quando os alimentos são assados do que as formas de folato naturalmente presentes (BALL, 1998).

Os métodos oficiais da AOAC 944.12, 960.46 e 992.05 (AOAC, 1996b; AOAC, 1996c; AOAC, 1996d) normalmente utilizados para análise de folato em alimentos são os métodos microbiológicos. Apesar dos métodos microbiológicos para a análise de folato já estarem sendo utilizados por muitas décadas, existe uma diferença significativa na opinião científica com relação ao procedimento ótimo de análise, principalmente com relação às enzimas utilizadas na digestão enzimática, segundo DeVries *et al.* (2005), que publicou um estudo colaborativo para análise de cereais utilizando método microbiológico trienzimático, proposto depois de uma revisão completa da literatura. A média dos teores encontrados de folato em farinha de trigo foi 32,80 µg/100g (desvio padrão = 9,15).

Na determinação de ácido fólico por CLAE em leites enriquecidos, Catharino *et al.* (2003) encontrou limites de detecção e quantificação iguais a 1,3 e 2,6 ng/mL, respectivamente. Tais limites são semelhantes aos encontrados para análise microbiológica, porém, esta ainda é largamente utilizada, pois possibilita a extração através de hidrólise enzimática para liberação das formas ligadas desta vitamina, o que muitas vezes decorre na liberação de interferentes que dificultam a análise qualitativa e quantitativa por CLAE. Esta problemática não ocorreu no trabalho realizado por Catharino *et al.* (2003) uma vez que o ácido fólico está presente em leite na forma monoglutâmica livre, segundo os autores.

De acordo com Finglas *et al.* (1999), o método microbiológico que utiliza o microorganismo *Lactobacillus casei* é o método mais amplamente empregado para a análise de folato e quantifica o teor de folato total no alimento. Embora

existam muitos trabalhos citando análise de ácido fólico por CLAE, existe uma maior aceitação dos resultados de folato total obtidos pelo método microbiológico, uma vez que o método CLAE quantifica o ácido fólico na forma de 5-CH₃H₄-PteGlu. Esta molécula pode apresentar problemas de estabilidade durante o processo de extração e pré-tratamento da amostra, com possibilidade de interconversão entre as formas desta vitamina durante a etapa de conjugação. Foi concluída, através de um estudo comparativo da determinação de folato por método microbiológico, radioimunoensaio e CLAE, que ainda se faz necessário a realização de muitos trabalhos utilizando o método CLAE antes que o mesmo seja utilizado rotineiramente em substituição à análise microbiológica (FINGLAS *et al.*, 1999).

2.6. Biotina (Vitamina H)

A biotina, vitamina reconhecida como parte do complexo vitamínico B, cuja estrutura molecular está apresentada na Figura 6, atua como cofator para quatro carboxilases encontradas em mamíferos. Tais coenzimas participam de reações de descarboxilação importantes nos processos bioquímicos de síntese de ácidos graxos, glucogênese e catabolismo de vários aminoácidos de cadeia ramificada, (BALL, 1998).

Figura 6: Estrutura molecular da biotina.

A forma ativa é a D-biotina, que sinteticamente pode ser obtida a partir da resolução do produto racêmico DL-biotina, que apresenta metade da sua atividade. Formas análogas à biotina como a detiobiotina e o sulfato de biotina são inativas em animais. A biotina está naturalmente presente na aveia e no arroz e a inclusão de cereais na alimentação contribui para a ingestão diária de biotina, que se encontra ligada a proteínas (DROGUETTI e PENTEADO, 2003).

O cozimento de alimentos pode converter uma porção significativa da biotina em produtos de oxidação (sulfóxido e sulfona), com a conseqüente perda da atividade vitamínica (BALL, 1998). A microflora do colo humano pode sintetizar grandes quantidades de biotina em sua forma livre, mas a biodisponibilidade da biotina sintetizada entericamente é desconhecida e pode não ter uma contribuição nutricional significativa.

Os métodos microbiológicos estão entre as primeiras metodologias desenvolvidas para a análise de biotina, e ainda são mais sensíveis que os métodos físico-químicos, sendo os últimos mais utilizados para a determinação de biotina em amostras com altas concentrações, tais como preparações farmacêuticas e alimentos fortificados. O método de CLAE pode diferenciar a biotina e seus análogos, como a detiobiotina e os sulfóxidos de biotina (DROGUETTI e PENTEADO, 2003).

Como as formas ligadas não são disponíveis para o microorganismo normalmente utilizado nas análises microbiológicas (*L. plantarum*), é necessário um processo de extração com hidrólise fortemente ácida e alta temperatura para liberar completamente a biotina dos alimentos. O ácido sulfúrico é o mais utilizado para a hidrólise durante a extração, mas existe a possibilidade do uso de papaína após tratamento da amostra com nitrogênio líquido e homogeneização, com resultados similares quanto ao teor de biotina. Como a análise de biotina por método microbiológico é altamente sensível, existe a necessidade de uma grande diluição da amostra; o que reduz a alta concentração de sal produzida na neutralização do ácido utilizado na extração, assim como a resposta do microorganismo *L. plantarum* à presença de ácidos graxos insaturados não

esterificados e outros lipídeos, interferentes da análise quando o teor de biotina é muito baixo (BALL, 1998).

2.7. Ácido pantotênico (Vitamina B5)

O ácido pantotênico ou vitamina B₅, é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, cuja molécula é opticamente ativa, mas somente o enantiômero d (+) ocorre na natureza, largamente distribuído em alimentos de origem animal e vegetal. Sua estrutura molecular está apresentada na Figura 7. O composto sintético é uma mistura racêmica na forma livre, mas é comercializado na forma de sal, como D-pantotenato de cálcio, para fortificação de alimentos e na forma de álcool, como pantotenol, para formulação de produtos farmacêuticos, que é convertido quantitativamente in vivo à vitamina B₅ (HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998).

Figura 7: Estrutura molecular do ácido pantotênico.

Ao contrário de outras vitaminas do complexo B, o pantotenato de cálcio, assim como o ácido fólico, é mais estável em pHs maiores, entre 5 e 7, mas não é estável quando levado à autoclave para sua extração em alimentos. Este composto não é afetado pela ação do oxigênio nem pela luz. Como a vitamina B₅ está fisiologicamente ligada à coenzima A e à proteína carreadora do grupo acil, é essencial ao metabolismo e tem seu papel fundamental no Ciclo de Krebs. Para a sua análise é necessário liberá-la da sua forma ligada através da extração com hidrólise enzimática, onde normalmente são utilizadas as enzimas hepática e fosfatase intestinal. O método rotineiramente usado para análise de ácido pantotênico é o microbiológico, mas métodos bioespecíficos como

radioimunoensaio e ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), métodos cromatográficos, tanto gasosos quanto líquidos, e eletroforese capilar também são citados na literatura (BALL, 1998; ALMEIDA-MURADIAN, 2003).

Rychlik (2003) descreveu a determinação de ácido fólico e ácido pantotênico em alimentos utilizando a técnica de CLAE, porém com detecção por espectrofotômetro de massa, a qual normalmente é utilizada para confirmação, devido à sua especificidade e alto custo. O mesmo autor analisou ácido fólico e ácido pantotênico em alimentos enriquecidos utilizando cromatografia líquida com detecção por espectrofotometria de massa e constatou a presença de excesso de ácido pantotênico e valores menores de ácido fólico aos declarados nos rótulos em cereais fortificados. Os teores de ácido pantotênico e ácido fólico encontrados em farinha de trigo fortificada foram 0,36 e 0,14 mg/100g, respectivamente, sendo que o último corresponde ao declarado no rótulo. As diferenças de valores encontradas nos cereais fortificados provavelmente ocorreram pela presença natural dessas vitaminas nas matérias primas que compõem estes produtos. Apesar da sobredosagem ser importante para antecipar as perdas de vitaminas durante o processo e a estocagem de produtos industrializados e da possível presença natural de vitaminas, as diferenças encontradas foram consideradas muito altas. Desta forma, existe a necessidade do ajuste mais preciso da quantidade de folato presente em alimentos fortificados, assim como um maior controle da quantidade desses teores pelos laboratórios oficiais. Estas diferenças também foram encontradas, segundo Rychlik (2003), por Osseyi e colaboradores (2003), quando a presença de ácido fólico em cereais fortificados foi determinada por CLAE com detecção por UV.

2.8. Ferro

Minerais é o termo usado genericamente para denominar um grupo de diversos elementos inorgânicos que exercem diferentes funções no organismo humano (TIRAPEGUI, 2000). Segundo Hendricks (1994) existe um total de dez minerais (ferro, iodo, zinco, cobre, cromo, manganês, molibdênio, flúor, selênio e

sílica) que são diariamente requeridos na dieta denominados minerais traço, e entre eles está o ferro.

O ferro, em sua maior parte, é utilizado para a síntese da hemoglobina e mioglobina, apresentando, portanto, papel essencial no transporte de oxigênio. Sua disponibilidade dietética depende da forma em que o ferro se encontra nos alimentos, podendo estar presente como íon heme ou ferro não-heme, sendo que o primeiro apresenta maior interesse nutricional, pois é absorvido pelo organismo humano mais rapidamente (TIRAPEGUI, 2000). É conhecido que a anemia ferropriva (deficiência de ferro) representa um problema nutricional importante no Brasil, com severas conseqüências econômicas e sociais (BRASIL, 2002).

Os compostos de ferro para fortificação são de responsabilidade das indústrias, entre eles está o sulfato ferroso desidratado (seco); fumarato ferroso; ferro reduzido - 325 mesh Tyler; ferro eletrolítico - 325 mesh Tyler; EDTA de ferro e sódio (NaFeEDTA); e ferro bisglicina quelato (BRASIL, 2002).

A espectrofotometria de absorção atômica é um método rápido, exato e preciso que vem substituindo largamente as análises químicas disponíveis para determinação de minerais, apesar de alguns métodos ainda serem muito utilizados para a análise de ferro em alimentos, como a colorimetria por reação redox, que determina a coloração formada pelo complexo do ferro com compostos orgânicos (HENDRICKS, 1994; MILLER, 1994).

Peng (2005) determinou ferro em amostras de farinha de arroz por CLAE de fase reversa, utilizando agentes quelantes, e obteve resultados similares aos encontrados por espectrofotometria de absorção atômica.

2.9. Métodos de análise de vitaminas do complexo B e ferro

2.9.1. Método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Nos últimos tempos, têm sido apresentadas na literatura diferentes técnicas para análise de vitaminas do complexo B, como CLAE, Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay (ELISA) e eletroforese capilar. A primeira está sendo mais utilizada no Brasil, uma vez que as outras técnicas tendem a ser mais sofisticadas e necessitam equipamentos que são menos disponíveis no país (AGOSTINI e GODOY, 1997).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um método físico-químico de separação baseado na partição de uma amostra entre duas fases, uma móvel, a qual percola através de uma coluna por alta pressão e uma estacionária, a qual seletivamente retarda os componentes da amostra. Os componentes fortemente retidos pela fase estacionária movem-se lentamente e, como consequência das migrações diferenciais, são separados, podendo ser analisados quali e quantitativamente (ROUNDS e NIELSEN, 1994).

Existem pelo menos cinco diferentes tipos de fase estacionária, o que disponibiliza cinco diferentes técnicas que podem ser empregadas em CLAE, mediante a simples troca da coluna e da fase móvel; a cromatografia líquido-sólido ou por adsorção, a cromatografia líquido-líquido ou por partição de fase normal, quando a fase estacionária é “mais polar” do que a fase móvel (sílica) e a de fase reversa (C_{18}), quando ocorre o contrário, a cromatografia de troca iônica e a cromatografia de exclusão. A técnica para a análise das vitaminas do complexo B B_1 , B_2 , B_6 e niacina é a cromatografia líquido-líquido (ROUNDS e GREGORY, 1994).

Entre as vantagens do uso da técnica de CLAE para determinação de vitaminas destacam-se a rapidez da metodologia, a alta sensibilidade e exatidão, mesmo quando as vitaminas estão presentes em pequenas quantidades e em matrizes complexas como é o caso dos alimentos (AGOSTINI e GODOY, 1997).

2.9.2. Método de análise microbiológica

Este método, também conhecido como análise microbiológica turbidimétrica, é baseado na necessidade absoluta de certos microorganismos por vitaminas, ou seja, tais microorganismos somente se multiplicam quando a vitamina está presente no meio de sobrevivência. Alíquotas de solução padrão da

vitamina a ser determinada, ou alíquotas do extrato de amostra contendo tal vitamina são adicionadas em um meio de cultura translúcido que contém os micronutrientes básicos para o desenvolvimento do microorganismo, exceto a vitamina de interesse. Com a inoculação do microorganismo, o mesmo se multiplica proporcionalmente à quantidade da vitamina da solução padrão ou do extrato de amostra, o que pode ser medido pela turbidez produzida. Considerando uma faixa de concentração definida, a resposta da leitura será diretamente proporcional à quantidade de vitamina presente e, dentro desta faixa, o extrato de amostra e a solução padrão podem ser comparados com precisão. A resposta é altamente dependente da forma da vitamina proveniente da extração da amostra (BALL, 1998).

O meio de cultura apropriado, livre da vitamina a ser determinada, é preparado através de diluição em água destilada para uma concentração definida, conforme instruções do fabricante. Juntamente com múltiplas alíquotas de solução padrão da vitamina pura e do extrato de amostra, o meio de cultura é adicionado numa série de tubos uniformes e com mesmo volume de solução final (meio de cultura + alíquota), em proporções diferentes para diferentes crescimentos do microorganismo, desde ausência de crescimento até o crescimento máximo. Os tubos são esterilizados, resfriados à temperatura ambiente e inoculados com o microorganismo dependente da vitamina de interesse. A incubação deve ocorrer em temperatura próxima a de crescimento ótimo do microorganismo até que o seu crescimento atinja o máximo permitido, o que é limitado pela vitamina presente. A medida da turbidez é feita através de espectrofotômetro a 540-660 nm e é expressa normalmente como transmitância (%T) ou como a diferença $100 - T$ (%). A resposta da leitura da turbidez dos tubos correspondentes às diluições da solução padrão é plotada contra a concentração de vitamina adicionada através das alíquotas, gerando uma curva padrão pela qual a quantidade de vitamina no extrato de amostra é determinada. O uso de múltiplas alíquotas permite a checagem, através da média de vários dados, da proporcionalidade direta entre a concentração de vitamina encontrada e o volume de alíquota adicionada no meio

de cultura. A quantidade de vitamina presente na amostra original é calculada de diferentes níveis teste e o resultado final é obtido pela média (BALL, 1998).

A bactéria ácido láctica, gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*, é ideal para análise microbiológica e é a mais utilizada nestes ensaios. Os nutrientes necessários para a sua multiplicação são específicos e complexos, mas tal microorganismo é capaz de se multiplicar em meio sintético e semi-sintético. Tem a vantagem de não ser um microorganismo patogênico e de não sofrer mutação, podendo facilmente ser subcultivado em laboratório sem alteração de suas características. Sua habilidade de multiplicação em quantidade limitada de ar possibilita o uso de tubos com meio de cultura para a realização desta análise. Tal microorganismo deve ser mantido em um ágar de cultura estoque como cultura pura, que deve ser cultivada de tempos em tempos, a fim de preservar sua sensibilidade e viabilidade. O inóculo deve ser preparado somente no dia anterior à análise em um meio de cultura de desenvolvimento, que contem todos os micronutrientes necessários para o seu crescimento e metabolismo normal. Antes da inoculação, o inóculo deve ser lavado com etapas de centrifugação asséptica diversas vezes com solução estéril de cloreto de sódio 0,9% para eliminar o risco de transporte da vitamina de interesse e de outros ingredientes interferentes provenientes do meio de cultura de desenvolvimento, caso contrário, pequenas variações de volume das gotas durante a inoculação trariam variações no crescimento do microorganismo, interferindo na proporcionalidade entre turbidez e quantidade de vitamina presente no tubo teste (BALL, 1998).

2.9.3. Análise de ferro por espectrofotometria de absorção atômica

A espectrofotometria de absorção atômica quantifica a absorção da radiação eletromagnética de uma fonte de radiação (lâmpada de catodo), originada da separação dos átomos ou íons no estado gasoso e cada elemento apresenta um espectro característico de absorção. Na análise de ferro, um sistema de queima por nebulização é utilizado para converter a solução de amostra em vapor atômico, através da chama, composta por ar-acetileno. O

monocromador é responsável por isolar a linha de ressonância de interesse da radiação total produzida e o detector, trabalhando em comprimento de onda definido, é responsável pela conversão da energia de radiação formada em sinal elétrico. A princípio, todos os alimentos podem ter o teor de minerais analisado por este método, desde que seja possível a sua queima total em mufla para destruição da matéria orgânica e solubilização da cinza formada em solução ácida (MILLER, 1994).

2.10. Vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de cereais

Os cereais e derivados contribuem em grande parte para a ingestão calórica da população brasileira. A região que apresenta menor participação relativa deste grupo de alimentos no total de calorias ingeridas por dia é a Norte, com 29,6% de 1884 Kcal / dia per capita, dos quais 1,2 % correspondem somente à farinha de trigo. As outras regiões seguem com a participação de 36,7 %, 36,9%, 37,0 % e 38,7 %, respectivamente para as regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste (LEVY-COSTA *et al.*, 2005).

O principal produto derivado de trigo é a farinha, em seguida o farelo e o germe de trigo. O consumo per capita brasileiro é de 50 kg de farinha de trigo/ano, sendo o pão responsável por 54 %, as massas por 12 % , os biscoitos por 11%, a farinha de uso residencial por 10% e para as outras aplicações temos 12% (ABITRIGO, 2006). Já para o milho, atualmente somente cerca de 15% de produção nacional se destina ao consumo humano e, mesmo assim, de maneira indireta na composição de outros produtos. Isto se deve principalmente à falta de informação sobre o milho e uma maior divulgação de suas qualidades nutricionais (ABIMILHO, 2006).

Os cereais e derivados, além de contribuírem para a ingestão calórica, também contribuem para a ingestão de micronutrientes relevantes, como as vitaminas e minerais.

Apesar de estudos que comprovam as chamadas dietas bem-balanceadas suficientes para suprir as quantidades de vitaminas preconizadas, devemos

considerar que nos tempos atuais cada vez mais consumimos produtos industrializados e até mesmo somos impossibilitados de ingerir uma dieta 100 % adequada quanto aos teores desses nutrientes essenciais. Assim, alimentos naturalmente ricos em vitaminas ou têm seus teores perdidos no processamento ou não são usualmente ingeridos, havendo a necessidade do enriquecimento de alimentos industrializados com vitaminas e ferro (PENTEADO, 2003). Tais produtos devem ter sua qualidade garantida, principalmente quanto aos teores desses nutrientes, ao considerarmos que as vitaminas apresentam quantidades recomendadas de ingestão (IDR), podendo algumas delas causar toxicidade ou, ao contrário, não serem ingeridas de acordo com os objetivos da fortificação.

Na rotulagem nutricional obrigatória de alimentos industrializados, além da declaração obrigatória de carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio, as vitaminas e os minerais, optativamente podem ser declarados, sempre e quando estiverem presentes em quantidade igual ou maior a 5% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) por porção indicada no rótulo (BRASIL, 2003b). Nas Tabelas 1 e 2 estão informadas as recomendações diárias de algumas vitaminas do complexo B e ferro, para adultos, lactentes e crianças (BRASIL, 2005).

Tabela 1: Ingestão Diária Recomendada (IDR) para adultos

Nutriente	Unidade	Valor
Tiamina	mg	1,2
Riboflavina	mg	1,3
Niacina	mg	16
Vitamina B ₆	mg	1,3
Ácido fólico	µg	240
Biotina	µg	30
Ácido pantotênico	mg	5
Ferro (a)	mg	14

(a) 10% de Biodisponibilidade

Fonte: BRASIL, 2005.

Tabela 2: Ingestão Diária Recomendada (IDR) para lactentes e crianças

Nutriente	Unidade	Lactente		Crianças		
		0 – 6 meses	7 - 11 meses	1 - 3 anos (12 a 36 meses)	4 - 6 anos (37 meses a 6 anos)	7 – 10 anos
Tiamina	mg	0,2	0,3	0,5	0,6	0,9
Riboflavina	mg	0,3	0,4	0,5	0,6	0,9
Niacina	mg	2	4	6	8	12
Vitamina B ₆	mg	0,1	0,1	0,5	0,5	1,0
Ácido fólico	µg	48	48	95	118	177
Biotina	µg	5	6	8	12	20
Ácido pantotênico	mg	1,7	1,8	2	3	4
Ferro (a)	mg	0,27	9	6	6	9

(a) 10% de Biodisponibilidade

Fonte: BRASIL, 2005.

Uma vez que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho destinadas ao uso industrial com ferro e ácido fólico e pré-embaladas na ausência do cliente e prontas para oferta ao consumidor (BRASIL, 2002) e considerando a tolerância estabelecida pela ANVISA de 20% para mais com relação aos valores de nutrientes declarados no rótulo (BRASIL, 2003b), se fazem necessários a validação de metodologia e a análise destes nutrientes em matérias primas de uso industrial, com vista ao enriquecimento e rotulagem de alimentos industrializados.

As farinhas de trigo e as farinhas de milho fortificadas usadas como matéria prima deverão ser declaradas na lista de ingredientes da rotulagem dos produtos industrializados com as seguintes expressões: farinha de trigo fortificada ou enriquecida ou rica com ferro e ácido fólico; e farinha de milho fortificada ou enriquecida ou rica com ferro e ácido fólico, seguindo as legislações específicas. Tais farinhas e os produtos industrializados que as contêm são largamente consumidos pela população brasileira (BRASIL, 2002).

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

vitaminas ainda podem estar naturalmente ligadas às proteínas e carboidratos nos alimentos, o que, somado a sua própria matriz complexa, normalmente dificulta a análise desses micronutrientes (BALL, 1998). Para a avaliação da presença natural dessas vitaminas em farinhas de cereais é preciso levar em consideração a forma na qual a vitamina está presente na matriz destes alimentos.

2.11. Validação de métodos de análise

Hoje em dia existe uma tendência mundial em implantar um sistema de garantia da qualidade com vistas ao reconhecimento da capacidade dos laboratórios em realizar ensaios analíticos. Para auxiliar na implantação desse sistema e padronizar os procedimentos adotados, existem diretrizes abordadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003) que discutem a validação de metodologia analítica. A realização, pelos laboratórios de ensaio, dos itens aplicáveis na validação de metodologia tem como objetivo o alcance da proficiência técnica desses laboratórios, baseada na sua capacidade de operar de acordo com o proposto, além de demonstrar o comprometimento em realizar serviços de ensaio com a confiabilidade metrológica necessária e do compromisso de melhor atender aos seus clientes.

Para um laboratório de ensaio ser reconhecido internacionalmente como um laboratório com competência analítica é necessário que as metodologias estejam devidamente validadas. Conforme definido no documento orientativo do INMETRO, validação é a “comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos”. Outros conceitos de validação estão apresentados abaixo:

- Estabelecimento, mediante estudos sistemáticos de laboratório, que as características de um respectivo método cumprem as especificações relativas ao uso previsto dos resultados analíticos (ABNT, 1994);

- É o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer (EURACHEM, 1998);
- É a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atingidos (ABNT, 2001);
- É a demonstração que um método de ensaio químico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida (INMETRO, 2003);

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; INMETRO, 2003).

A validação deve ser efetuada 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).

Quando se inicia um trabalho de validação de um método, os objetivos principais são a geração e a avaliação de um resultado analítico, com a verificação se as respostas são previsíveis e correspondem ao esperado ao que o método pretenda.

Os critérios gerais de aceitação do método devem ser incluídos de acordo com as recomendações a serem determinadas e estabelecidas no método a ser validado, dependendo da aplicabilidade (escopo) do mesmo.

2.11.1. Etapas de validação de métodos de análise

As características de desempenho de um método são obtidas através da determinação dos parâmetros de validação do método (EURACHEM, 1998;

INMETRO, 2003). Assim, segundo recomendações da NBR17025 (ABNT, 2001), os principais requisitos e parâmetros a serem estudados durante o desenvolvimento do processo analítico para fins de validação do método em uma matriz são:

- Especificidade: capacidade de medir o analito, livre de interferências;
- Seletividade: capacidade de medir com exatidão e sem interferentes, vários analitos em uma mistura;
- Linearidade: capacidade de fornecer resultado proporcional à concentração do padrão, em uma faixa de trabalho apropriada;
- Sensibilidade: capacidade de registrar pequenas variações ou inclinações da curva analítica provocadas pelo efeito da matriz;
- Faixa de trabalho: intervalo de concentração entre o limite inferior e superior dos padrões analisados;
- Limite de detecção (LD): capacidade do método de dar resultados no nível mais baixo detectável qualitativamente, mas não quantitativamente;
- Limite de quantificação (LQ): capacidade do método de dar resultados no nível mais baixo detectável de forma precisa e exata, qualitativa e quantitativamente;
- Exatidão: capacidade de dar resultados próximos ao valor real verdadeiro;
- Precisão: capacidade de dar resultados com a menor variabilidade em relação à repetitividade (intralaboratorial) e reprodutibilidade (interlaboratorial), de resultados analisados de uma mesma amostra;
- Incerteza de medição: capacidade de dar resultados com a dispersão dos valores que podem ser atribuídos razoavelmente ao mensurando.

2.11.2. Parâmetros de validação

- a. Especificidade e Seletividade: Quando relacionados a tipos de métodos, o termo específico é usado para indicar a resposta de um método para uma única substância em exame, enquanto o termo seletivo é usado para descrever um método que fornece uma resposta para diversas substâncias

em exame (SWARTZ e KRULL, 1998). Segundo a USP (1995), a especificidade de um método representa a sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a(s) substância(s) em exame na presença de componentes que poderiam interferir com a sua determinação numa mistura complexa. Isto corresponde ao grau de interferência de espécies, como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação. Grandes esforços têm sido feitos no intuito de resolver os problemas da resposta da especificidade dos padrões com comparações de sinais para verificação da pureza e especificidade dos mesmos, sem que nenhum outro componente desconhecido, além do esperado, seja determinado junto com o analito. Em alguns casos é recomendado o uso de técnicas adicionais para se definir a especificidade de um método frente à matriz estudada. Como tais interferentes dependem da matriz, torna-se necessário a definição do campo de aplicação, ou seja, definir o grupo de alimento e as faixas de concentração de analito para as quais o método será validado.

- b. 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 e a intersecção é b . O principal parâmetro para avaliação da linearidade após os cálculos da regressão é um fator que permite fazer uma correlação de linearidade dos valores. Este fator chama-se coeficiente de correlação (r) que tem um valor ideal = 1, isto é, a relação linear perfeita. A linearidade da curva de calibração e, portanto, o intervalo de trabalho do método, é determinado pelo coeficiente de correlação da reta obtida, denominado índice de correlação de Pearson (RIEDER *et. al.*, 2000), considerando:

- $r = 1$, correlação perfeita;

- $0,91 < r_2 < 0,99$, correlação fortíssima;
- $0,61 < r_2 < 0,91$, correlação forte;
- $0,31 < r_2 < 0,60$, correlação média;
- $0,01 < r_2 < 0,30$, correlação fraca;
- $r = \text{zero}$, correlação nula.

A estimativa dos coeficientes de correlação de uma curva analítica permite avaliar a qualidade da curva obtida, que quanto mais perto de 1,0 menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados a e b . A ANVISA (BRASIL, 2003a) estabelece que um coeficiente de correlação múltipla $r_2 \geq 0,99$ é desejável, e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90.

- c. Sensibilidade: A sensibilidade mostra a variação da resposta com a concentração do analito e depende, essencialmente, da técnica de detecção utilizada; é expressa como a inclinação da reta de regressão e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade.
- d. Faixa de trabalho: A faixa linear de trabalho de um método é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração dos analitos no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio (INMETRO, 2003).
- e. 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. Portanto é definido como a concentração mínima de uma substância detectada e declarada com um determinado intervalo de confiança, em que a concentração do analito é maior que zero. Este é um parâmetro fundamental para medidas obtidas em níveis muito baixos, como análise de

contaminantes e de teor naturalmente presente. Na literatura são citados três métodos para determinação do limite de detecção do método (SWARTZ e KRULL, 1998):

- Através do método visual, em que se utiliza a adição de concentrações mínimas e conhecidas dos analitos em solvente, de maneira que se possa distinguir os sinais e a menor concentração visível detectável do ativo. Exemplos desse tipo de detecção são utilizados em cromatografia em camada delgada (CCD).
- Através do método da relação sinal/ruído, em que pode ser aplicado em sistemas analíticos que apresentam o ruído da linha base como em cromatografia gasosa ou líquida, na proporção de 3 :1.
- Através dos parâmetros da curva analítica, na qual pode ser expresso pela equação: $LD = 3,3 \times S$, onde S = inclinação da curva ou coeficiente angular da curva analítica.

- f. Limite de quantificação: É o menor valor de concentração do analito que pode, com alguma certeza estatística, ser quantificado. Este é um parâmetro fundamental para medidas obtidas em níveis baixos, como análise de micronutrientes não adicionados. 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 ou 10, dependendo da incerteza desejada (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003).
- g. Exatidão: Exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro, portanto demonstra o quão próxima está a medida do seu valor verdadeiro. Os valores de recuperação considerados adequados (exatidão) são

estabelecidos em função da concentração dos analitos a serem determinados e de acordo com a área de pesquisa. Assim, exatidão pode ser determinada por ensaios de material de referência, quando disponível, e cálculo de recuperação de padrão adicionado em diferentes níveis de concentração. Normalmente, realiza-se de 6 a 10 determinações de material de referência ou de amostras adicionadas para a avaliação da exatidão.

- h. Precisão: A precisão é uma medida da dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes em condições definidas, portanto demonstra o quão dispersa uma medida está em relação à média. Em referência a desvios (precisão), na medida em que se reduz a massa a ser detectada, os desvios tornam-se maiores, nos quais a grandeza de variabilidade pode ser considerada previsível. Dependendo das condições definidas durante a validação, a precisão pode ser expressa como repetitividade, ou repetibilidade, reprodutibilidade ou precisão intermediária do método. Se expressa a precisão através do desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (CV) dos resultados obtidos. Tanto a precisão, como a exatidão, dependem da concentração do analito e, portanto, é aconselhável a determinação desses parâmetros em diferentes níveis de concentração. Quando os resultados analíticos 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 limite de repetibilidade, calculado a partir do desvio padrão de, no mínimo, 6 resultados representa a diferença máxima permitida entre dois resultados obtidos da mesma amostra em condições de repetibilidade com 95% de confiança (com o desvio padrão da repetibilidade (s_r), temos o limite de repetibilidade: $r = 2,8 \cdot s_r$) (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003).

3. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é a avaliação do teor de sete vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₆, ácido pantotênico, ácido fólico, niacina e biotina) e ferro em cinco farinhas de cereais (aveia, arroz, cevada, milho e trigo) que são utilizadas como matéria prima em produtos enriquecidos na indústria alimentícia, a fim de avaliar a contribuição natural destes micronutrientes no produto final.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Escolha das amostras de farinhas de cereais

Segundo levantamento bibliográfico realizado em 2003 pelo Departamento Econômico da Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), dentre os maiores produtores brasileiros de farinha existem dezenove grandes fabricantes de farinha de trigo, oito de farinha de milho, três de farinha de aveia e apenas um de farinha de cevada e de farinha de arroz. Tais produtores estão listados na Tabela 3.

Para as análises preliminares dos teores das 7 vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₆, niacina, ácido fólico, ácido pantotênico e biotina) e do ferro nas farinhas de cereais foi realizada a coleta de 43 amostras procedentes de 12 fornecedores brasileiros.

Para as validações das metodologias, foram avaliados os teores das vitaminas hidrossolúveis B₁, B₂, B₆, niacina, ácido pantotênico, biotina e ácido fólico em farinha de aveia; ácido fólico em amostra enriquecida e ferro em farinha de trigo, as quais foram escolhidas entre as amostras analisadas preliminarmente.

Para as análises finais, foram avaliados os teores das 7 vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₆, niacina, ácido fólico, ácido pantotênico e biotina) e do ferro

nas farinhas de cereais. Foram coletadas 12 amostras procedentes de 8 diferentes fornecedores.

Tabela 3: Maiores produtores brasileiros de farinha de cereais, segundo a ABIA.

Farinha de trigo	Farinha de milho	Farinha de aveia	Farinha de cevada	Farinha de arroz
Anaconda Indl e Agricola de Cereais S/A	Adram S/A Ind e Com.	Bretzke	L.Firenczi	L.Firenczi
Buaiz S/A Ind. E Com.	Unilever Best Foods Brasil Ltda	L.Firenczi		
Bunge Alimentos S/A	Caramuru Alimentos Ltda	Yoki Alimentos		
Cereal Foods Com.e Ind Ltda	Cirol-Cia Inds Royal			
Domingos Costa Inds Alimenticias S/A	Inds Grafino S/A			
Emege Prods Alimenticias S/A.	Inds Reunidas Coringa Ltda			
Grande Moinho Cearense S/A	Kellog Brasil & Cia Ltda			
J.Macedo Alimentos S/A	Kowalski ALimentos Ltda			
M.Dias Branco S/A - Com e Ind.				
Moinho de Sergipe S/A				
Moinho do Nordeste S/A				
Moinho Matrisa S/A				
Moinho Pacífico Ind. e Com. Ltda				
Moinho Paulista Ltda				
Moinho Sul Mineiro S/A				
Moinhos Cruzeiro do Sul S/A				
Moinhos Vera Cruz S/A				
Ocrim S/A Produtos Alimentícios				
Santista Alimentos S/A				

Fonte: ABIA = Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação

4.1.2. Amostragem

Para o manuseio das farinhas foram utilizadas colheres de metal tratadas com álcool 70% a fim de garantir a assepsia desses utensílios. As amostras foram recolhidas em sacos plásticos com identificação de fornecedor, lote e data de fabricação e nome da matéria-prima. De cada lote de amostra foram retiradas, em média, quatro colheres de matéria-prima (aproximadamente 50g) de cada embalagem aberta para amostragem, seguindo as condições descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições de amostragem de farinhas

Número de embalagens no lote	Número de embalagens abertas para amostragem
2 a 10	2
11 a 200	3
201 a 400	4
Acima de 400	1 a cada 100

A amostra do lote foi misturada e cada saco plástico de amostragem foi fechado evitando o contato do pó coletado com o ar e a luz, sendo conservado em dessecador até o momento da análise.

4.1.3. Padrões e reagentes

Foram utilizados os seguintes padrões e reagentes:

- Acetato de sódio - Grau PA - Marca Merck
- Acetonitrila - Grau HPLC - Marca Tedia
- Ácido acético glacial - Grau PA - Marca Vetec

- Ácido Ascórbico - Grau Bioquímico - Marca Merck
- Ácido Clorídrico 37% - Grau PA - Marca Vetec
- Ácido orto-fosfórico 85% - Grau PA - Marca Vetec
- Ácido sulfúrico - Grau PA - Marca Vetec
- Ácido tricloroacético - Grau PA - Marca Merck
- Alfa-amilase - Grau Bioquímico - Marca Fluka
- Cloreto de cálcio - Grau PA - Marca Vetec
- Diastase - Grau Bioquímico - Marca Merck
- Dihidrogenofosfato de potássio - Grau PA - Marca Vetec
- Dimetilformamida - Grau Espectrofotometria - Marca Merck
- Etanol absoluto- Grau PA - Marca Vetec
- Ferricianeto de potássio - Grau PA - Marca Vetec
- Hidrogenofosfato de di-potássio - Grau PA - Marca Vetec
- Hidróxido de amônio - Grau PA - Marca Vetec
- Hidróxido de sódio em lentilha - Grau PA - Marca Vetec
- Hidróxido de potássio em lentilha - Grau PA - Marca Vetec
- Lactose monoidratada - Grau Bioquímico - Marca Fluka
- Meio de cultura Bacto Pantothenate Assay Medium - Marca Difco
- Meio de cultura Biotin Assay Medium - Marca Difco
- Meio de cultura Folic Acid Casei Medium - Marca Difco
- Meio de cultura Lactobacilli Agar AOAC - Marca Difco
- Meio de cultura Micro Inoculum Broth - Marca Difco
- Microrganismo *Lactobacillus casey* – ATCC 7649
- Microrganismo *Lactobacillus plantarum* - ATCC 8014
- Padrão de Ácido fólico - Folic Acid, Marca Fluka - pureza > 97% - grau bioquímico
- Padrão de Niacina - Marca Merck – Pureza > 99% - grau bioquímico
- Padrão de Biotina - Biotin, Marca Fluka - pureza > 98% - grau bioquímico

- Padrão de Niacinamida - Marca Merck – Pureza > 99% - grau bioquímico
- Padrão de pantotenato de cálcio - D-pantothenic acid calcium salt, Marca Merck - pureza > 99% - grau bioquímico
- Padrão de vitamina B₁ - Mononitrato de tiamina - Thiamine mononitrate, Marca Merck – Pureza > 99% - Grau bioquímico
- Padrão de vitamina B₂ - Riboflavina - Riboflavin, Marca Merck – Pureza > 99% - Grau bioquímico
- Padrão de vitamina B₆ na forma álcool - Cloridrato de piridoxol - Pyridoxine hydrochloride, Marca Fluka – Pureza > 99% - Grau bioquímico
- Padrão de vitamina B₆ na forma aldeído - Cloridrato de piridoxal - Pyridoxal hydrochloride, Marca Fluka – Pureza > 99,5% - Grau bioquímico
- Padrão de vitamina B₆ na forma amina - Cloridrato de piridoxamina - Pyridoxamin hydrochloride, Marca Merck – Pureza > 99% - Grau bioquímico
- Papaína - Grau USP - Marca Merck
- Peróxido de hidrogênio 30% - Grau PA - Marca Vetec
- Sal ácido heptanossulfônico de sódio (PIC-7) - Grau PA - Marca Fluka
- Sal ácido hexanossulfônico de sódio (PIC-6) - Grau PA - Marca Fluka
- Sulfato de cobre II pentahidratado - Grau PA - Marca Quimex
- Taka-diaestase - Grau Bioquímico - Marca Fluka
- Tetraborato de sódio - Grau PA - Marca Vetec

4.1.4. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos específicos:

- Agitador magnético – Marca Quimis
- Balança semi-analítica – Marca Mettler
- Phmetro – Marca Mettler
- Banho - Maria – Marca Heraeus

- Banho Ultrasom Branson 5210
- Sistema de Água Ultrapura Milli-Q – Marca Millipore
- Espectrofotômetro - Marca Shimadzu
- Mufla
- Estufa incubadora Fisher Scientific Isotemp
- Autoclave AMSCO Scientific SV120
- Sistema automático de diluição Gilson 222XL Liquid Handler (Gilson 402 Syringe Pump)
- Sistema automático de leitura Gilson 222XL Liquid Handler com espectrofotômetro Pharmacia Biotech Novaspec II Spectrophotometer
- Bomba isocrática para sistema HPLC Marca Waters 510
- Amostrador automático para sistema HPLC (Autosampler 717 Plus) Marca Waters
- Bomba de reação pós-coluna para sistema HPLC (Reagent Manager) Marca Waters
- Compartimento de reação pós-coluna para sistema HPLC (Column heater module) Marca Waters
- Controlador de temperatura de compartimento de reação pós-coluna para sistema HPLC (Temperature Control Module) Marca Waters
- Detector de fluorescência para sistema HPLC (Multi-Fluorescence Detector) Marca Waters 2475
- Software Millennium para sistema HPLC Marca Waters
- Sistema cromatográfico Shimadzu modelo 10 Avp, com sistema de bomba ternário de baixa pressão, degasser, injetor automático e forno para coluna
- Detector UV Shimadzu SPD10Avp
- Software Class VP para HPLC Marca Shimadzu
- Espectrofotômetro de absorção atômica AAS – 220, Marca Varian
- Software para Espectrofotômetro de absorção atômica Marca Varian

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Pesquisa dos dados mundiais do teor de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de cereais

Foram consultadas diversas bases de dados, publicadas ou online, para a obtenção de Tabelas de Composição de Alimentos em relação às vitaminas do complexo B e ferro.

4.2.2. Análise das Vitaminas B₁, B₂, B₆ e Niacina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de farinhas de cereais

4.2.2.1. Extração simultânea para análise das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina

A extração das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina foi realizada em uma mesma etapa, conforme descrito por Moreschi (2006) e Presoto e Almeida-Muradian (2005). Em erlenmeyers âmbar de 125 mL, foram pesadas 5 g de amostra. Foram adicionados 50 mL de solução de ácido clorídrico 0,1M. As tomadas de ensaio foram autoclavadas por 30 minutos a 100°C. As soluções de extração foram resfriadas à temperatura ambiente e o pH foi ajustado para 4,6 com, aproximadamente, 3 mL de acetato de sódio 2,5 M. A reação enzimática foi realizada com 0,5 g de enzima diastase fúngica em banho-maria por 2 horas a 42°C. As soluções de extração foram retiradas do banho-maria e resfriadas à temperatura ambiente. O conteúdo dos erlenmeyers foi transferido quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 100 mL com água deionizada e o volume foi completado com água deionizada. Os extratos foram filtrados através de papel de filtro plissado e o filtrado foi recolhido em erlenmeyer âmbar.

Antes da injeção em cromatógrafo, cada extrato obtido foi filtrado em filtro de membrana de ésteres de celulose com poro 0,45µm e recolhido em vials. O

sistema cromatográfico foi estabilizado com a fase móvel, aproximadamente 30 minutos antes do início da análise e a lâmpada do detector foi ligada 1 hora antes do início da análise. Após todas as injeções, para a limpeza do sistema cromatográfico, foram utilizados, pelo menos, 30 mL de água ultrapura e, logo após, o mesmo volume de acetonitrila grau HPLC. A coluna foi condicionada em acetonitrila.

4.2.2.2. Análise simultânea das vitaminas B₁ e B₂

O procedimento de análise simultânea para as vitaminas B₁ e B₂ foi baseado no descrito por Moreschi (2006) e Chase *et al.* (1993).

Condições cromatográficas para a análise simultânea das vitaminas B₁ e B₂:

- Fase móvel: solução pH 3,6 contendo par-iônico e acetonitrila
- Fluxo: 1 mL/min
- Volume de injeção : 20 uL
- Coluna: C₁₈ de fase reversa RP-18 esférica 5 um / 125 x 4.0 mm com pré-coluna 5um / 4x4 mm Lichrospher
- Bomba de reação pós-coluna: fluxo 0,3 mL/min
- Forno de reação contendo loop de reação (tubulação de 18 metros de comprimento por 0,01 mm de diâmetro interno): temperatura de 55°C
- Detecção da vitamina B₁ por fluorescência: Ex 360 nm; Em 435 nm
- Detecção da vitamina B₂ por fluorescência: Ex 450 nm; Em 530 nm

Preparo da fase móvel para a determinação da vitamina B₁ e B₂ por detecção com reação pós-coluna:

Em um béquer de 1000 mL, foi pesado 0,95 g de PIC-6 e dissolvido em solução de 1000mL da mistura de água ultrapura e acetonitrila, na proporção 90,5 de água : 9,5 de acetonitrila. Foi adicionado 0,5 mL de hidróxido de amônio e o pH

foi ajustado para 3,6 com ácido fosfórico concentrado. Foram adicionados mais 70mL de água ultrapura e 22 mL de acetonitrila, antes da solução final ter sido filtrada em membrana FA a vácuo.

A Figura 8 mostra o esquema do sistema de CLAE para análise de vitamina B₁ e B₂ utilizando-se detecção por reação pós-coluna. A conversão de tiamina em tiocromo foi realizada utilizando-se a solução de ferricianeto de potássio em meio básico (reativo).

Figura 8: Sistema de CLAE utilizado para análise da vitamina B₁ com detecção por reação pós coluna.

Preparo da solução concentrada do padrão de vitamina B₁ (10 µg de mononitrato de tiamina/mL):

Em um béquer de 50 mL, foi pesada uma massa conhecida em torno de 50,0 mg de mononitrato de tiamina. O padrão foi transferido quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 50 mL com água ultrapura e foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico 1M. O volume foi completado com água ultrapura. Esta solução foi diluída a fim de se obter uma solução final de concentração 10 µg de mononitrato de tiamina / mL. A curva padrão utilizada apresentava as seguintes concentrações, em ng/mL: 25, 50, 100, 200 e 500. Foram realizadas as diluições

conforme esquema apresentado na Figura 9. Os volumes finais foram completados com água ultrapura.

Figura 9: Esquema de diluição para preparo da solução padrão concentrada de vitamina B₁.

Preparo das soluções da curva padrão da vitamina B₁:

A Tabela 5 mostra as condições de preparo da curva padrão para a análise de vitamina B₁. Os volumes finais foram completados com água ultrapura.

Tabela 5: Preparo das soluções padrão diluídas de vitamina B₁

Solução padrão da curva de calibração	Volume de padrão da solução concentrada (mL)	Volume final (mL)
Padrão 1 (5 ng/mL)	0,05	100
Padrão 2 (25 ng/mL)	0,25	100
Padrão 3 (50 ng/mL)	0,50	100
Padrão 4 (100 ng/mL)	1,00	100
Padrão 5 (200 ng/mL)	2,00	100
Padrão 6 (500 ng/mL)	5,00	100
Padrão 7 (1000 ng/mL)	10,00	100

Esta solução é estável se acondicionada em geladeira por até 30 dias.

O sal mononitrato de tiamina foi convertido em vitamina B₁, para a expressão dos resultados, conforme apresentado na Figura 11.

Preparo da solução concentrada do padrão de vitamina B₂ (5 µg de riboflavina / mL):

Em um erlenmeyer de 125 mL , foi pesada uma massa conhecida em torno de 25,0 mg de riboflavina. Foram adicionados 70 mL de água ultrapura e 0,6 mL de ácido acético glacial. Foi colocado um bastão magnético e a solução foi levada à chapa de aquecimento (fervura branda) com agitação até total dissolução da vitamina. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e transferida quantitativamente para um balão volumétrico âmbar de 250 mL com água deionizada. O volume final foi completado com água deionizada a fim de se obter uma solução final de concentração 5 µg de riboflavina / mL. Foram tomados 5 mL desta solução e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 100 mL. Os volumes finais foram completados com água ultrapura. Esta solução é estável se acondicionada em geladeira por até 30 dias.

Preparo das soluções da curva padrão de Vitamina B₂:

A curva padrão utilizada apresentava as seguintes concentrações, em ng/mL: 6, 25, 50, 125, 250 e 500. A Tabela 6 mostra as condições de preparo da curva padrão para a análise de vitaminas B₂. Os volumes finais foram completados com água ultrapura.

Tabela 6: Preparo das soluções padrão diluídas de vitamina B₂

Solução padrão da curva de calibração	Volume de padrão da solução concentrada (mL)	Volume final (mL)
Padrão 1 (125 ng/mL)	0,25	10
Padrão 2 (250 ng/mL)	0,50	10
Padrão 3 (500 ng/mL)	1,00	10
Padrão 1 diluído (6 ng/mL)	1,00	20
Padrão 2 diluído (25 ng/mL)	1,00	10
Padrão 3 diluído (50 ng/mL)	1,00	10

4.2.2.3. Análise da vitamina B₆ através dos vitâmeros piridoxol, piridoxal e piridoxamina

O procedimento de análise da vitamina B₆ foi baseado no descrito por Kall (2003) e Presoto e Almeida-Muradian (2005).

Condições cromatográficas para a análise da Vitamina B₆:

- Fase móvel: tampão fosfato pH 2,5 com par iônico e acetonitrila
- Fluxo: 0,6 mL/min
- Coluna: C₁₈ de fase reversa Superspher 100 RP-18 endcapped 5 um / 250 x 4.0 mm com pré-coluna 5um / 4x4 mm Lichrospher 100 RP-18
- Detecção por fluorescência: Ex 296nm; Em 390 nm

Preparo da fase móvel para análise de vitamina B₆:

Em um béquer de 1000 mL, foram pesados 6,80 g de dihidrogenofosfato de potássio e 0,14 g de PIC-7. Os reagentes foram dissolvidos em aproximadamente

600 mL de água ultrapura. Através de um pHmetro, o pH foi ajustado a 2,5 com ácido orto-fosfórico 85%. A solução foi transferida para balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado com água ultrapura. Esta solução foi filtrada em filtro de membrana de ésteres de celulose de poro 0,45 μ m, sob vácuo antes da realização da mistura na proporção 4 de acetonitrila : 96 de tampão fosfato pH 2,5 e par iônico. No momento do uso, a fase móvel foi degaseificada sob vácuo em ultrassom por, aproximadamente 20 minutos, antes da utilização em cromatógrafo.

**Preparo da solução concentrada do padrão de cloridrato de piridoxol
(16 μ g / mL):**

Em um béquer de 50 mL , foi pesada uma massa conhecida em torno de 20,0 mg de cloridrato de piridoxol. O padrão foi transferido quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 250 mL com água ultrapura e o volume final foi completado com água ultrapura. Foram tomados 10 mL desta solução e transferidos para balão volumétrico âmbar de 50 mL. Os volumes finais foram completados com água ultrapura. Esta solução é estável se acondicionada em geladeira por até 30 dias.

**Preparo da solução concentrada do padrão de cloridrato de piridoxal
(16 μ g / mL):**

Em um béquer de 50 mL , foi pesada uma massa conhecida em torno de 10,0 mg de cloridrato de piridoxal. O padrão foi transferido quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 250 mL com água ultrapura e o volume final foi completado com água ultrapura. Foram tomados 10 mL desta solução e transferidos para balão volumétrico âmbar de 50 mL. Os volumes finais foram completados com água ultrapura. Esta solução é estável se acondicionada em geladeira por até 30 dias.

Preparo da solução concentrada do padrão de cloridrato de piridoxamina (16 µg / mL):

Em um béquer de 50 mL , foi pesada uma massa conhecida em torno de 10,0 mg de cloridrato de piridoxamina. O padrão foi transferido quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 250 mL com água ultrapura e o volume final foi completado com água ultrapura. Foram tomados 10 mL desta solução e transferidos para balão volumétrico âmbar de 50 mL. Os volumes finais foram completados com água ultrapura. Esta solução é estável se acondicionada em geladeira por até 30 dias.

Preparo das soluções da curva padrão de Vitamina B₆:

Cada solução foi diluída a fim de se obter uma solução final de concentração 16 µg de cada forma de vitamina B₆ / mL. A curva padrão utilizada apresentava as seguintes concentrações, em ng/mL, contendo as três formas da vitamina B₆: 40, 80, 160, 320, 800 e 1600.

Os três vitâmeros da vitamina B₆ foram analisados simultaneamente. A Tabela 7 mostra as condições de preparo da curva padrão para a análise de vitamina B₆. Os volumes finais foram completados com água ultrapura.

Tabela 7: Preparo das soluções padrão diluídas de vitamina B₆ contendo os três vitâmeros.

Solução padrão da curva de calibração	Volume de padrão da solução concentrada (mL)			Volume final (mL)
	Padrão de Piridoxol na concentração de 16 µg/mL	Padrão de Piridoxal na concentração de 16 µg/mL	Padrão de Piridoxamina na concentração de 16 µg/mL	
Padrão 1 (40 ng/mL)	0,25	0,25	0,25	100
Padrão 2 (80 ng/mL)	0,50	0,50	0,50	100
Padrão 3 (160 ng/mL)	1,00	1,00	1,00	100
Padrão 4 (320 ng/mL)	2,00	2,00	2,00	100
Padrão 5 (800 ng/mL)	5,00	5,00	5,00	100
Padrão 6 (1600 ng/mL)	10,00	10,00	10,00	100

Os vitâmeros da vitamina B₆ foram convertidos em vitamina B₆, para a expressão dos resultados, conforme apresentado na Figura 11.

4.2.2.4. Análise de vitamina PP através dos vitâmeros niacina e niacinamida

O procedimento de análise foi baseado no descrito por Lahély *et al.* (1999) e Presoto e Almeida-Muradian (2005).

Condições cromatográficas para a análise da vitamina PP:

A vitamina PP foi detectada por fluorescência após reação sob radiação ultravioleta (UV). O sistema de reação pós-coluna foi montado conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10: Sistema cromatográfico utilizado para determinação de vitamina PP.

- Fase móvel: tampão fosfato pH 2,5 e acetonitrila
- Fluxo: 1,1 mL/min
- Coluna: C₁₈ de fase reversa Nucleosil 100-5 C₁₈, marca Macherey-Nagel
- Volume de injeção : 20 µL
- Reator composto por 12 metros de tubulação de tetrafluoretileno (TFE), 0,5 mm de diâmetro interno, enrolada em uma lâmpada negra que emite radiação entre 300 a 400 nm.
- Detecção por fluorescência: Ex 322nm; Em 380 nm

Preparo da fase móvel para análise de vitamina PP:

Em balão volumétrico de 1000 mL, foram pesados 9,54 g de dihidrogenofosfato de potássio e dissolvidos com, aproximadamente, 500 mL de água ultrapura. Foram adicionados, cuidadosamente, 7,6 mL de peróxido de hidrogênio 30% e 1,0 mL da solução de sulfato de cobre 5 mM. O volume final foi completado com água ultrapura. A fase móvel foi então homogeneizada, filtrada em membrana de ésteres de celulose de 0,45 µm, sob vácuo. Esta solução permanece estável por 24h quando acondicionada à temperatura ambiente.

Preparo da solução concentrada de padrão de Niacina (100 µg/mL):

Em um béquer de 50 mL , foi pesada uma massa conhecida em torno de 25,0 mg de niacina. O padrão foi transferido quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 250 mL com água ultrapura. O volume final foi completado com água ultrapura a fim de se obter uma solução final de concentração 100 µg de niacina/mL. Esta solução é estável se acondicionada em geladeira por até 30 dias.

Preparo da Solução concentrada de padrão de Niacinamida (100 µg/mL):

Em um béquer de 50 mL , foi pesada uma massa conhecida em torno de 25,0 mg de niacinamida. O padrão foi transferido quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 250 mL com água ultrapura. O volume final foi completado com água ultrapura a fim de se obter uma solução final de concentração 100 µg de niacinamida/mL. Esta solução é estável se acondicionada em geladeira por até 30 dias .

Preparo das soluções da curva padrão de Niacina e Niacinamida:

A curva padrão utilizada apresentava as seguintes concentrações, em ng/mL, contendo as duas formas da niacina: 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 5000 e 10000 . Os dois vitâmeros da niacina foram analisados simultaneamente. A Tabela 8 mostra as condições de preparo da curva padrão para a análise de niacina. Os volumes finais foram completados com água ultrapura.

Tabela 8: Preparo das soluções padrão diluídas de vitamina PP contendo os dois vitâmeros.

Solução padrão da curva de calibração	Volume de padrão da solução concentrada (mL)		Volume final (mL)
	Padrão de niacina 100 µg /mL	Padrão de niacinamida 100 µg /mL	
Padrão 1 (25 ng/mL)	0,025	0,025	100
Padrão 2 (50 ng/mL)	0,050	0,050	100
Padrão 3 (100 ng/mL)	0,10	0,10	100
Padrão 4 (250 ng/mL)	0,25	0,25	100
Padrão 5 (500 ng/mL)	0,50	0,50	100
Padrão 6 (1000 ng/mL)	1,00	1,00	100
Padrão 7 (5000 ng/mL)	5,00	5,00	100
Padrão 8 (10000 ng/mL)	10,00	10,00	100

Os vitâmeros da vitamina PP foram convertidos em niacina, para a expressão dos resultados, conforme apresentado na Figura 11.

4.2.3. Análise de vitamina B₁ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de farinhas de cereais com reação pré-coluna

A extração da vitamina B₁ foi realizada conforme o item 4.2.2.1 (MORESCHI, 2006; PRESOTO e ALMEIDA-MURADIAN, 2005).

O método de análise cromatográfico foi baseado no procedimento descrito por Ollilainen *et al.* (1993) e Presoto e Almeida-Muradian (2005). As modificações no método quanto à reação de conversão da tiamina em tiocromo realizada pelo modo pós-coluna para o modo pré-coluna foram na composição da fase móvel e nos valores dos comprimentos de onda.

Condições cromatográficas para a análise da vitamina B₁ (reação pré-coluna):

- Fase móvel: tampão fosfato pH 7,2 e dimetilformamida
- Fluxo: 1 mL/min
- Volume de injeção : 20 uL
- Coluna: C₁₈ de fase reversa RP-18 esférica 5 um / 125x 4.0 mm com pré-coluna 5um / 4x4 mm Lichrospher
- Detecção por fluorescência: Ex 368 nm; Em 440 nm

Preparo da fase móvel para a determinação da vitamina B₁ por detecção com reação pré-coluna:

Em um béquer de 1000 mL, foram pesados 2,28 g de hidrogenofosfato de di-potássio trihidratado (ou 1,74 g de hidrogenofosfato de di-potássio anidro) e dissolvidos em aproximadamente 800 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado para 7,2 com solução de ácido clorídrico 1M utilizando-se um pHmetro. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado com água ultrapura. A solução foi filtrada em membrana de ésteres de celulose de 0,45 um, antes da mistura de dimetilformamida na proporção 85% de tampão fosfato pH 7,2: 15% de dimetilformamida.

Preparo das soluções padrão de vitamina B₁:

As soluções padrão foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2.2. Para a conversão da tiamina em tiocromo através de reação pré-coluna, 1 mL de cada solução padrão da curva de calibração sofreu reação em balão volumétrico de 10 mL.

Conversão da tiamina em tiocromo através de reação pré-coluna:

Para a reação de conversão da tiamina em tiocromo, foram adicionados aproximadamente, 2 mL de água deionizada e 3 mL da solução de ferricianeto de potássio em meio básico a cada 1 mL de solução padrão diluída, em balões volumétricos âmbar de 10 mL. O volume total foi agitado em agitador de tubos e colocado em repouso por 2 min para que ocorresse a reação. Após este tempo, foram adicionados 450 uL de ácido ortofosfórico 85%. A solução foi então resfriada e o volume final foi completado com água deionizada. Estas soluções foram injetadas no cromatógrafo imediatamente após o preparo.

4.2.4. Análise da vitaminas B₂ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de farinhas de cereais

A extração da vitamina B₂ foi realizada conforme o item 4.2.2.1 (MORESCHI, 2006; PRESOTO e ALMEIDA-MURADIAN, 2005).

O método de análise foi baseado no procedimento descrito por Augustin (1984) e Presoto e Almeida-Muradian (2005), com modificação na composição da fase móvel.

Condições cromatográficas para a análise da Vitamina B₂:

- Fase móvel: tampão fosfato pH 7,2 e dimetilformamida
- Fluxo: 1,5 mL/min
- Volume de injeção : 20 uL
- Coluna: C₁₈ de fase reversa RP-18 esférica 5 um / 125x 4.0 mm com pré-coluna 5um / 4x4 mm Lichrospher
- Detecção por fluorescência: Ex 450 nm; Em 530 nm

Preparo da fase móvel para a determinação da vitamina B₂:

A mesma fase móvel foi utilizada para a determinação da vitamina B₁ por detecção com reação pré-coluna e para a determinação da vitamina B₂. Porém, tais vitaminas foram analisadas em corridas cromatográficas separadas devido a ocorrência de degradação da vitamina B₂ durante a reação pré-coluna que converte a vitamina B₁ em composto fluorescente. O preparo da fase móvel está descrito no item 4.2.3. No momento do uso, a fase móvel foi degaseificada sob vácuo em ultrassom por, aproximadamente 20 minutos, antes da utilização em cromatógrafo.

Preparo das soluções padrão de vitamina B₂:

As soluções padrão foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2.2.

Os fatores de conversão das vitaminas hidrossolúveis, conforme a expressão dos resultados, estão apresentados na Figura 11.

De:		Para:	Multiplica por:
Mononitrato de tiamina	→	Vitamina B ₁	→ 0,811
Cloridrato de piridoxol	→	Vitamina B ₆	→ 0,8227
Cloridrato de piridoxal	→	Vitamina B ₆	→ 0,8308
Dicloridrato de piridoxamina	→	Vitamina B ₆	→ 0,7017
Niacina	→ →	Vitamina PP	→ 1
Niacinamida	→ →	Vitamina PP	→ 1,01

Figura 11: Fatores de conversão das vitaminas hidrossolúveis.

4.2.5. Análise da ácido fólico, biotina e ácido pantotênico por método microbiológico

O princípio do método é a seletividade do microorganismo utilizado pela vitamina a ser quantificada, ou seja, o seu crescimento se dá proporcionalmente a presença da vitamina na amostra diluída no meio de cultura específico, no qual tal vitamina se encontra ausente. O procedimento foi o seguinte:

- Tomada de ensaio de acordo com a concentração esperada de vitamina na amostra; adição da solução de extração.
- Extração em autoclave e utilização de enzima;
- Diluição automática de curva padrão e de alíquotas do extrato para o meio de cultura específico;
- Esterilização em autoclave;
- Inoculação e incubação;
- Leitura da absorbância do crescimento microbiano em espectrofotômetro.

Preparo dos reagentes:

As seguintes soluções foram preparadas nas concentrações indicadas:

- Solução de ácido ascórbico 0,1M
- Solução de ácido sulfúrico 0,5 M
- Solução de ácido acético 1M
- Solução de hidróxido de sódio 1M
- Solução de hidróxido de sódio 0,1M
- Solução hidróxido de sódio 60 %
- Solução fisiológica 0,9%
- Solução de cloreto de cálcio 2%

Preparo da solução tampão pH 4,6:

Foram transferidos 200 mL de solução de ácido acético 1M e 100 mL de solução de hidróxido de sódio 1M para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume final foi completado com água deionizada.

Preparo da solução tampão pH 6,1:

Foram pesados 5,84 g de dihidrogenofosfato de potássio e 1,22 g de hidrogenofosfato de di-potássio, sais anidros, em balão volumétrico de 1000 mL. Os sais foram dissolvidos e o volume final foi completado com água deionizada.

Preparo da enzima alfa-amilase 0,2% em lactose:

Foram pesados 20mg de alfa-amilase e 10 g de lactose. As massas foram homogeneizadas em agitador tipo “turbola” por aproximadamente 10 minutos e a mistura foi conservada em refrigerador à $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Preparo da solução fisiológica 0,9% estéril:

A solução fisiológica 0,9% foi distribuída em tubos de ensaio de aproximadamente 10 mL. Os tubos foram tampados com tampa de rosca e distribuídos em uma estante para tubos e a mesma foi envolta em papel alumínio. As estantes com os respectivos tubos foram esterilizadas por 15 minutos a 120°C , em autoclave. O material foi resfriado à temperatura ambiente e conservado em refrigerador a $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Extração das vitaminas analisadas pelo método microbiológico em amostras de farinha de cereais:

Para cada amostra, foi pesada, em erlenmeyer âmbar de 125 mL, uma massa e realizada uma diluição, as quais foram calculadas baseando-se no teor esperado da vitamina analisada, segundo os dados da literatura e as condições de diluição programadas no diluidor automático.

4.2.5.1 Análise do ácido fólico por método microbiológico

O método de análise utilizado foi baseado no procedimento descrito por DeVries *et al.* (2005) e Presoto e Almeida-Muradian (2005).

Preparo da solução padrão concentrada de ácido fólico (0,12 mg/mL):

Foi pesada, em um béquer, uma massa conhecida de, aproximadamente, 30,0 mg de ácido fólico e transferida, quantitativamente, com água deionizada, para balão volumétrico âmbar de 250 mL. Foram adicionados 25 mL de hidróxido de sódio 0,1M e 50 mL de etanol absoluto. O volume final foi completado com água deionizada. Esta solução foi conservada em refrigerador a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, com validade de 30 dias.

Preparo das soluções da curva padrão de ácido fólico (0,96 ng/mL):

No dia da análise, foram realizadas as diluições da solução padrão concentrada conforme esquema apresentado na Figura 12. Os volumes finais foram completados com água deionizada.

Figura 12: Esquema de diluição da solução concentrada de padrão de ácido fólico.

Procedimento de extração do ácido fólico nas amostras de farinha de cereais:

Foram adicionados ao erlenmeyer contendo a massa de amostra pesada, 30 mL de solução tampão pH 6,1, 1 mL da solução de ácido ascórbico 0,1 M e aproximadamente 0,2 g de alfa-amilase 0,2% em lactose. As soluções foram mantidas em banho maria por 30 minutos à 42°C ou encubadas por uma noite à 37°C, dependendo da disponibilidade de realização das análises. Passado este período, os erlenmeyers foram tampados com papel alumínio e autoclavados por 20 minutos a 102°C para extração do ácido fólico. As soluções foram resfriadas à temperatura ambiente e foi adicionado 0,8 mL de solução de cloreto de cálcio 2%. Os extratos foram transferidos quantitativamente, com água deionizada, para balão volumétrico âmbar, a fim de obter diluições adequadas segundo teor de vitamina esperado. O volume final foi completado com água deionizada. Os extratos foram filtrados sobre papel de filtro plissado e recolhidos em erlenmeyers âmbar.

4.2.5.2. Análise da biotina por método microbiológico

O método de análise foi baseado no procedimento descrito por Scheiner e DeRitter (1975) e Presoto e Almeida-Muradian (2005).

Preparo da solução padrão concentrada de biotina (20 µg/mL):

Foi pesada, em um béquer, uma massa conhecida de, aproximadamente, 20,0 mg de biotina e transferida, quantitativamente, com água deionizada, para balão volumétrico âmbar de 200 mL. Foram adicionados 100 mL de etanol absoluto. O volume final foi completado com água deionizada. 25 mL desta solução foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL. O volume final foi completado com água deionizada. Esta solução foi conservada em refrigerador a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, com validade de até 30 dias.

Preparo das soluções da curva padrão de biotina (0,40 ng/mL):

No dia da análise, foram realizadas as diluições da solução padrão concentrada conforme esquema apresentado na Figura 13. Os volumes finais foram completados com água deionizada.

Solução padrão concentrada

Figura 13: Esquema de diluição da solução concentrada de padrão de biotina.

Procedimento de extração de biotina nas amostras de farinha de cereais:

Foram adicionados ao erlenmeyer contendo a massa de amostra pesada, 50 mL de solução ácido sulfúrico 0,5 M. Os erlenmeyers foram tampados com papel alumínio e autoclavados por 1 hora à 120°C para extração de biotina. As

soluções foram resfriadas à temperatura ambiente. O pH foi ajustado para 4,6, iniciando com a solução de hidróxido de sódio 60 %, depois com a solução hidróxido de sódio 1 M e com a solução hidróxido de sódio 0,1 M. Os extratos foram transferidos quantitativamente, com água deionizada, para balão volumétrico âmbar, a fim de obter diluições adequadas segundo teor de vitamina esperado. O volume final foi completado com água deionizada. Os extratos foram filtrados sobre papel de filtro plissado e recolhidos em erlenmeyers âmbar.

4.2.5.3. Análise do ácido pantotênico por método microbiológico

O método de análise foi baseado nos métodos oficiais da AOAC 945.74 e 960.46 (AOAC, 1996e ; AOAC, 1996c) e Presoto e Almeida-Muradian (2005).

Preparo da solução padrão concentrada de pantotenato de cálcio (0,12 mg/mL):

No dia da análise, foi pesada, em um béquer, uma massa conhecida de, aproximadamente, 30,0 mg de pantotenato de cálcio e transferida, quantitativamente, com água deionizada, para balão volumétrico de 250 mL. O volume final foi completado com água deionizada.

Preparo das soluções da curva padrão de pantotenato de cálcio (120 ng/mL):

No dia da análise, foram realizadas as diluições da solução padrão concentrada conforme esquema apresentado na Figura 14. Os volumes finais foram completados com água deionizada.

Figura 14: Esquema de diluição da solução concentrada de padrão de pantotenato de cálcio.

O fator de conversão do pantotenato de cálcio em ácido pantotênico, para a expressão dos resultados, foi igual a 0,92.

Procedimento de extração de pantotenato de cálcio nas amostras de farinha de cereais:

Foram adicionados 100mg de papaína e 30mg de diastase para cada massa de amostra pesada. Foram adicionados ao erlenmeyer, 50 mL de solução tampão pH 4,6 e os mesmos foram tampados com papel alumínio. Os extratos foram incubados a 37°C por uma noite, retirados da estufa incubadora e resfriados à temperatura ambiente. Dependendo da disponibilidade de realização das análises, as soluções foram mantidas em banho maria por 30 minutos à 42°C ao invés de incubadas por uma noite à 37°C. Os extratos foram transferidos quantitativamente, com água deionizada, para balão volumétrico âmbar, a fim de obter diluições adequadas segundo teor de vitamina esperado. O volume final foi completado com água deionizada. Os extratos foram filtrados sobre papel de filtro plissado e recolhidos em erlenmeyers âmbar.

4.2.5.4. Condições analíticas para determinação de ácido fólico, biotina e ácido pantotênico

Meio de manutenção das cepas de microorganismo:

O meio de manutenção das cepas de microorganismo *Lactobacilli* Agar foi preparado, seguindo as instruções do rótulo.

O volume preparado foi dividido em tubos de ensaio de 10 mL; os mesmos foram tampados com tampão de algodão e distribuídos em uma estante para tubos, que foi envolta em papel alumínio. As estantes com os respectivos tubos foram esterilizadas por 15 minutos a 120°C, em autoclave. O material foi resfriado à temperatura ambiente por um período de pelo menos 12 horas. Os tubos foram levados à incubadora por uma noite à 37°C. A solução final foi conservada em refrigerador a $\pm 4^\circ\text{C}$.

Meio de cultura para desenvolvimento do microorganismo:

O meio de cultura para desenvolvimento das cepas de microorganismo Micro Inoculum Broth foi preparado, seguindo as instruções do rótulo.

A solução foi distribuída em tubos de ensaio de aproximadamente 10 mL. Os tubos foram tampados com tampa de rosca e distribuídos em uma estante para tubos e a mesma foi envolta em papel alumínio. As estantes com os respectivos tubos foram esterilizadas por 15 minutos a 120°C, em autoclave. O material foi resfriado à temperatura ambiente e conservado em refrigerador a $\pm 4^\circ\text{C}$.

Manutenção da Cepa:

Cada cepa de microorganismo foi repicada a cada 15 dias no meio de manutenção *Lactobacilli* agar, conforme a Tabela 9.

Os microorganismos repicados foram incubados durante uma noite à 37°C e posteriormente conservados em refrigerador a $\pm 4^\circ\text{C}$.

Tabela 9: Condições de repique para desenvolvimento das cepas de microorganismo, conforme a vitamina analisada.

Vitamina analisada pelo método microbiológico	Cepa do microorganismo	Forma de repique do microorganismo	Frequência de repique do microorganismo
Biotina	<i>Lactobacillus plantarum</i> - ATCC 8014	Profundidade	Quinzenal
Ácido Fólico	<i>Lactobacillus casey</i> - ATCC 7649	Profundidade	Quinzenal
Ácido Pantotênico	<i>Lactobacillus plantarum</i> – ATCC 8014	Profundidade	Quinzenal

Desenvolvimento do microorganismo:

Cada cepa de microorganismo foi subcultivada com o número de alçadas correspondentes, em aproximadamente 10 mL de meio de desenvolvimento Micro Inoculum Broth, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10: Condições para subcultivo das cepas de microorganismo, conforme a vitamina analisada.

Vitamina analisada pelo método microbiológico	Dia para subcultivar o microorganismo	Número de alçadas
Biotina	1 dia antes da inoculação	4
Ácido Fólico *	no dia da inoculação	4
Ácido Pantotênico	1 dia antes da inoculação	4

* Para a análise de ácido fólico, conforme a disponibilidade de realização da análise, no dia anterior à inoculação, foi subcultivado o microorganismo *Lactobacillus casey* com 1 alçada em 10 mL de meio de desenvolvimento e na manhã seguinte, 1 mL da suspensão do microorganismo *Lactobacillus casey* foi novamente subcultivado em 10 mL de meio de desenvolvimento.

Os meios de cultura de desenvolvimento foram incubados a 37°C por, aproximadamente, 16 horas. De cada cepa, foi recolhido 1 mL com pipeta estéril e transferido para outro tubo com aproximadamente 10 mL do mesmo meio de cultura de desenvolvimento, dentro de capela com fluxo laminar. Os meios de cultura de desenvolvimento contendo os microorganismos foram novamente incubados a 37°C por, aproximadamente, 4 horas.

Preparo do meio de cultura para análise:

Cada meio de cultura foi preparado na quantidade necessária para cada “batch” analítico, ou seja, quantidade suficiente para diluição dos extratos das amostras e das soluções da curva padrão nas concentrações descritas na Tabela 11.

Tabela 11: Meio de cultura e concentração, conforme a vitamina analisada.

Vitamina analisada pelo método microbiológico	Meio de cultura para análise	Concentração do meio de cultura (g/L)
Biotina	Biotin Assay Medium	45
Ácido Fólico *	Folic Acid Casei Medium	51,7
Ácido Pantotênico	Bacto Pantothenate Assay Médium	43,8

* Na preparação do meio de cultura para análise de ácido fólico, foram adicionados 500 mg de ácido ascórbico para cada 1000 mL de meio de cultura.

A massa de meio de cultura necessária foi pesada em erlenmeyer e uma parte da água deionizada necessária para a preparação do meio foi adicionada. Esta solução foi levada à chapa de aquecimento com agitação magnética até que o meio de cultura entrasse em ebulição fraca. O erlenmeyer foi retirado da chapa e a solução foi resfriada em banho de gelo. A solução foi filtrada sobre papel de filtro plissado e recolhida em frasco adequado. O erlenmeyer e o papel de filtro foram lavados utilizando a água deionizada restante, a fim de respeitar o volume total calculado. Todo o volume de água necessário para a massa de meio de cultura

pesada foi adicionado no frasco com a solução filtrada e o mesmo foi homogeneizado. Cada meio de cultura foi preparado no dia da utilização.

Preparo do ensaio:

Para a diluição dos extratos de amostra e das soluções da curva padrão nos respectivos meios de cultura, foi seguida a programação adotada no software do equipamento Diluidor Gilson.

Para cada curva padrão foram necessários 10 tubos na estante, pois os volumes de solução padrão adicionados ao meio de cultura foram 0,05 mL, 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL e 0,9 mL por tubo, ou seja, uma seqüência de 10 pontos de diluição. Para cada “batch” analítico foram feitas duas curvas padrão.

Para cada amostra foram necessários 16 tubos na estante, pois o volume de solução padrão adicionado ao meio de cultura foi entre 0,1 mL a 0,8 mL, de 0,1 mL em 0,1 mL, por tubo. Como para cada “batch” analítico foram feitas duas seqüências de diluição de cada extrato de amostra, para cada amostra foi obtida uma seqüência de 8 pontos de diluição.

Alguns tubos contendo apenas meio de cultura foram reservados na estante para serem utilizados como branco futuramente na leitura da suspensão de microorganismos, a fim de zerar o espectrofotômetro.

A diluição foi realizada automaticamente pelo equipamento diluidor Gilson.

Ao término da diluição, cada tubo de ensaio foi tampado com tampas de alumínio.

Preparo do dispensador para inoculação do microorganismo:

Inicialmente o frasco do dispensador automático foi lavado com água deionizada. O dispensador automático foi montado e lavado dispensando-se, aproximadamente, 100 mL de água deionizada. O dispensador foi embrulhado em papel alumínio, evitando a presença de espaços com bolhas de ar. O frasco do

dispensor foi preenchido com solução fisiológica 0,9%, tampado com papel alumínio preso com elástico.

Esterilização dos tubos contendo extratos de amostras e padrão diluídos em meio de cultura e do dispensor contendo solução fisiológica para inoculação:

As estantes com os tubos, o dispensor e o frasco do dispensor foram esterilizados em autoclave nas condições descritas na Tabela 12.

Tabela 12: Condições de esterilização, conforme a vitamina analisada.

Vitamina analisada pelo método microbiológico	Tempo de esterilização (minuto)	Temperatura de esterilização (°C)
Biotina	5	121
Ácido Fólico	20	110
Ácido Pantotênico	10	115

O material foi retirado da autoclave ao término do ciclo de esterilização e resfriado à temperatura ambiente. A autoclave que foi utilizada neste trabalho é automática e seguiu as condições de esterilização pré-programadas.

Preparação do inóculo:

A manipulação do inóculo foi feita em capela com fluxo laminar.

O microrganismo, após etapa de desenvolvimento, foi retirado da incubadora e resfriado à temperatura ambiente. Uma parte do meio de cultura de desenvolvimento que continha o microrganismo foi transferida para um tubo de centrifuga estéril. A suspensão foi centrifugada a, aproximadamente, 5000 rpm por cerca de 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados, aproximadamente, 5 mL de solução fisiológica 0,9 % estéril à cepa de

microorganismo precipitada e a mesma foi ressuspendida, cuidadosamente, em agitador de tubos, evitando que a suspensão tocasse no tampão de algodão do frasco de centrífuga. A suspensão foi centrifugada novamente a, aproximadamente, 5000 rpm por cerca de 5 minutos. Esta operação foi repetida por mais três vezes. O concentrado celular final, do qual foi retirado todo o meio de desenvolvimento, foi ressuspendido em aproximadamente 10 mL de solução fisiológica estéril 0,9%. A transmitância desta suspensão foi medida em espectrofotômetro adaptado para tais condições, no próprio tubo de centrífuga. A transmitância do inóculo de cada análise foi ajustada aproximadamente para o valor necessário, diluindo com solução fisiológica estéril 0,9% nas condições descritas na Tabela 13.

Tabela 13: Condições de transmitância do inóculo, conforme a vitamina analisada.

Vitamina analisada pelo método microbiológico	Transmitância do inóculo (%)
Biotina	40
Ácido Fólico	20
Ácido Pantotênico	40

Inoculação:

Todo procedimento de inoculação foi feito em capela com fluxo laminar.

Foram transferidas 20 gotas do inóculo suspenso em solução fisiológica 0,9%, com uma pipeta estéril, para o frasco do dispensador com 250 mL de solução fisiológica estéril 0,9%. Esta quantidade de inóculo foi ajustada proporcionalmente para diferentes volumes de solução fisiológica, conforme a disponibilidade de volume do frasco. O dispensador foi conectado ao frasco e a suspensão do inóculo foi agitada. A fim de lavar o interior do dispensador, os primeiros 10 mL da solução de inoculação foram desprezados. Todos os tubos contendo as soluções de extrato de amostra e as soluções padrão diluídas em meio de cultura foram inoculados adicionando-se 0,5 mL da solução de inoculação, um por um,

tampando cada tubo a cada adição. A cada 10 tubos inoculados, o frasco do dispensador foi agitado para manter a suspensão de microorganismo o mais homogênea possível. Os tubos inoculados, tampados, foram agitados em agitador de tubos.

Incubação:

As estantes com os tubos contendo os meios de cultura e o extrato de amostra e padrão já inoculados foram colocadas em incubadora a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Após 16 horas, as suspensões contidas nos tubos referentes à curva padrão foram observadas com regularidade. As estantes apenas foram retiradas da incubadora quando a diferença entre as suspensões entre as soluções padrão menos e mais concentradas foi de aproximadamente 40 % de transmitância.

Leitura:

Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente, destampados, e as suspensões foram agitadas em agitador de tubos. A leitura da absorbância foi realizada automaticamente pelo sistema de leitura Gilson, à 575 nm, seguindo a programação do software do equipamento.

Parâmetros de controle:

A leitura de absorbância da suspensão do inóculo presente em meio de cultura ausente de solução de extrato de amostra e padrão (branco do inóculo) foi utilizada como parâmetro de controle da análise. Esta leitura não deve ser maior que a leitura da solução padrão mais diluída.

4.2.6. Análise de ácido fólico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de farinhas de cereais

O método de análise utilizado foi baseado no trabalho de Alaburda *et al.* (2006), que utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa e detecção por UV.

Preparo da solução tampão de tetraborato-TCA pH 8,5:

Foi preparada uma solução de tetraborato de sódio 0,04 M e o pH foi ajustado para 8,5 com solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) 70%.

Preparo da solução tampão de acetato-fosfato:

Foram dissolvidos 50 g de dihidrogenofosfato de sódio em 1L de solução de acetato de sódio 0,1 M pH 4,5 (anteriormente ajustado com ácido acético).

Extração do ácido fólico:

Em erlenmeyers âmbar de 125 mL, foram pesadas 5 g de amostra. Foram adicionados 50 mL de solução tampão de tetraborato pH 8,5. As tomadas de ensaio foram tampadas com papel alumínio e agitadas em shaker giratório por 30 minutos. As soluções de extração foram centrifugadas e foram purificados em catucho de extração em fase sólida fortemente aniônica SAX (500mg/3mL). Os cartuchos foram previamente condicionados com 2 porções de 2,5 mL de metanol e 2 porções de 2,5 mL de água deionizada. Um volume de 2,5 mL do sobrenadante foi transferido para o SAX, foram feitas 2 lavagens de 2,5 mL com água deionizada. O excesso de líquido do cartucho foi eliminado e o ácido fólico foi eluído com 2,5 mL de solução tampão de acetato-fosfato.

Antes da injeção em cromatógrafo, cada extrato obtido foi filtrado em filtro de membrana de nylon com poro 0,45µm e recolhido em vials. O sistema

cromatográfico foi estabilizado com a fase móvel, aproximadamente 30 minutos antes do início da análise e a lâmpada do detector foi ligada 1 hora antes do início da análise. Após todas as injeções, para a limpeza do sistema cromatográfico, foram passados, pelo menos, 30 mL de uma mistura água ultrapura e metanol (90:10).

Condições cromatográficas para a análise do ácido fólico:

- Fase móvel: Solução A: Solução aquosa de ácido acético 0,17 M
Solução B: Acetonitrila
- Gradiente: Tempo 0 min: 92% da solução A e 8 % da solução B
Tempo 10 min: 76% da solução A e 24 % da solução B
Tempo 15 min: 76% da solução A e 24 % da solução B
Tempo 21 min: 50% da solução A e 50 % da solução B
Tempo 30 min: 50% da solução A e 50 % da solução B
Tempo 40 min: 92% da solução A e 8 % da solução B
Tempo 50 min: 92% da solução A e 8 % da solução B
- Fluxo: 0,7 mL/min
- Volume de injeção : 100 µL
- Coluna: C₁₈ de fase reversa Supelcosil LC-18 (Supelco) 5 µm / 250 x 4.6 mm com pré-coluna Phenomenex C₁₈ 5µm / 4x3 mm
- Temperatura do forno da coluna: 35 °C
- Detecção por UV: 280 nm

Dosagem do padrão de ácido fólico:

O padrão de ácido fólico foi previamente dosado quanto ao teor de umidade através de leitura espectrofotométrica em solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Os coeficientes de absorção molar estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14: Coeficientes de absorção molar ácido do fólico em solução de hidróxido de sódio 0,1 M em diferentes comprimentos de onda.

Comprimento de onda (λ)	Coeficiente de absorção molar ϵ (1%, 1 cm)
256	585
284	570
365	206

Fonte: STROHECKER e HENNING, 1966.

Preparo da solução padrão concentrada de ácido fólico (0,3 mg/mL):

Foi pesada, em um béquer, uma massa conhecida de, aproximadamente, 30,0 mg de ácido fólico e transferida, quantitativamente, com solução tampão de acetato-fosfato, para balão volumétrico âmbar de 100 mL. Foram adicionados 3 mL de hidróxido de potássio 0,1M. O volume final foi completado com solução tampão de acetato-fosfato.

Preparo das soluções da curva padrão de ácido fólico:

No dia da análise, foram realizadas as diluições com concentrações na faixa de 15 a 600 $\mu\text{g/mL}$, preparadas a partir de solução 0,3 mg/mL com solução tampão tetraborato-TCA.

4.2.7. Análise de ferro por espectrofotometria de absorção atômica

A análise de ferro foi baseado nos procedimentos descritos por Wienk *et al.* (1996) e Miller (1994) que utilizam espectrofotometria de absorção atômica.

Preparo do padrão para análise de ferro:

A solução padrão concentrada foi adquirida comercialmente com a concentração de 1000 μg de ferro/mL de solução. Foram realizadas as diluições

conforme esquema apresentado na Figura 15. Cada volume final foi completado com ácido nítrico e água desmineralizada a fim de se obter uma concentração final correspondente a 2% de ácido nítrico:

Solução padrão de concentração 0,05 µg/mL:

1 mL da solução padrão → 500 mL
↓
5 mL → 200 mL

Solução padrão de concentração 0,10 µg/mL:

1 mL da solução padrão → 500 mL
↓
10 mL → 200 mL

Solução padrão de concentração 0,25 µg/mL:

0,125 mL da solução padrão → 500 mL

Solução padrão de concentração 0,50 µg/mL:

0,5 mL da solução padrão → 1000 mL

Solução padrão de concentração 1 µg/mL:

0,5 mL da solução padrão → 500 mL

Solução padrão de concentração 2 µg/mL:

1 mL da solução padrão → 500 mL

Solução padrão de concentração 3,5 µg/mL:

0,7 mL da solução padrão → 200 mL

Solução padrão de concentração 5 µg/mL:

1 mL da solução padrão → 500 mL

Figura 15: Esquema de diluição das soluções de calibração do padrão de ferro

Preparo das amostras para análise de ferro:

Todo o material de vidro utilizado foi desmineralizado durante uma noite com uma solução de ácido nítrico (1:1). No dia da análise esse material foi enxaguado abundantemente com água desmineralizada.

Mineralização:

Em cada batch analítico foi executada a prova dos reagentes (branco de amostras), que consistiu em se aplicar a metodologia com todos os reagentes envolvidos, exceto a amostra. Também foi efetuada uma análise de recuperação com adição de padrão à uma amostra a cada batch realizado.

A amostra foi homogeneizada. Foram pesadas, em uma cápsula de platina, 10,0 g da amostra. A amostra foi queimada em um digestor, aumentando gradativamente a temperatura, até que se completasse a carbonização da matéria orgânica. Cada cápsula foi colocada na mufla a 500° C, no mínimo por 4 horas. A cápsula só foi retirada da mufla após o tempo necessário para completa mineralização. A cápsula foi resfriada à temperatura ambiente e foram adicionados, cuidadosamente, 12,5 mL de solução de ácido clorídrico 50%. A solução reagiu por aproximadamente 15 minutos e a cápsula foi levada para um banho de água fervente para completa solubilização das cinzas. Foi observado periodicamente para que a cápsula não secasse no banho de água. As cinzas foram transferidas quantitativamente com água desmineralizada para balão volumétrico de 25 mL. A partir desta solução foram tomadas alíquotas de 2 mL e transferidas em balão volumétrico de 100 mL, cujas soluções foram lidas no equipamento.

Parâmetros Instrumentais para análise de ferro por espectrofotometria de absorção atômica:

Foi feito o ajuste do equipamento com o padrão de cobre de 5,0 µg/mL e realizada a análise com corretor de “background”. Os parâmetros de trabalho utilizados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Parâmetros instrumentais de trabalho para análise de ferro.

AAS – 220 Varian – Modo FS						
Elemento	Lâmpada	Corrente	Comprimento de onda	Slit	Chama Gás	Sensibilidade
Fe	catodo- oco	5,0	248.3	0.2	ar acetileno	2,5→0,20 µg Fe / mL

Leitura dos extratos de amostra e padrão em espectrofotômetro de absorção atômica:

Foi feita a leitura da curva de calibração utilizando-se água desmineralizada entre uma leitura e outra para limpar o capilar. Foi feita a leitura da amostra zerando o equipamento com o respectivo branco, utilizando-se água desmineralizada entre uma leitura e outra para limpar o capilar. Quando necessário, foi feito uma diluição da amostra. Ao término das leituras das amostras era realizado a leitura de um ponto da curva padrão para ser verificada a estabilidade da mesma durante o processo.

4.2.8. Validação dos métodos analíticos

Os parâmetros de validação foram baseados nos procedimentos descritos no EURACHEM (1998) e INMETRO (2003).

4.2.8.1. Campo de aplicação

A partir do levantamento bibliográfico (Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20) e dos resultados preliminares das vitaminas propostas e do ferro (Tabelas 21, 22, 23, 24 e 25), presentes nas farinhas de cereais foi definida a faixa de concentração na qual o método seria validado. Como as amostras são similares, elas foram adotadas como uma só matriz, no caso, cereais, para otimizar o procedimento de validação. Para a validação do ácido fólico, foram considerados dois níveis, pois tais micronutrientes podem estar presentes em cereais em quantidades naturais ou adicionadas.

4.2.8.2. Limite de detecção e limite de quantificação

Os cálculos dos limites de detecção e quantificação para as vitaminas analisadas por CLAE foram realizados medindo-se as alturas da linha de base e do pico de um padrão diluído o suficiente para permitir estas duas medidas em um mesmo cromatograma.

O limite de detecção foi adotado como sendo 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 da vitamina na amostra, considerando a sua massa e as diluições realizadas, conforme procedimento de extração.

Para o ferro, os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir da curva padrão, considerando a menor concentração e estes dados foram convertidos em concentração de ferro na amostra, considerando a tomada de ensaio e as diluições realizadas, conforme procedimento de extração. O mesmo foi realizado para as vitaminas analisadas pelo método microbiológico.

4.2.8.3. Linearidade

Através dos padrões, foram obtidas as respostas para pelo menos 5 níveis de concentrações diferentes, pelo menos 3 vezes cada. As respostas das vitaminas determinadas por CLAE correspondem à unidades de área e as respostas obtidas, para a determinação das vitaminas pelo método microbiológico e do ferro, correspondem à unidades de absorbância.

Foi construído o gráfico de concentração do padrão x resposta para cada micronutriente e calculada a regressão linear utilizando todos os dados obtidos. Foram também construídos gráficos de concentração do padrão x resposta/concentração e verificado se há dependência entre eles, através da dispersão dos pontos.

4.2.8.4. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho para cada micronutriente foi determinada dentro da faixa linear a partir da curva de calibração traçada para o estudo da linearidade para análise por CLAE e por espectrofotometria de absorção atômica.

4.2.8.5. Sensibilidade

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

4.2.8.6. Exatidão

Foram realizadas 6 determinações de recuperação de padrão adicionado de cada micronutriente em amostras escolhidas para representar a matriz cereal,

em condições de repetibilidade, em níveis de concentração correspondentes aos teores esperados levando-se em consideração as Tabelas de composição de alimentos (Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20) e as que apresentam os resultados preliminares obtidos (Tabelas 21, 22, 23, 24 e 25).

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

4.2.8.7. Precisão

Foram realizadas 6 determinações de cada micronutriente nas amostras escolhidas para representar a matriz cereal, em condições de repetibilidade, em níveis de concentração conforme os teores esperados levando-se em consideração as Tabelas de Composição de Alimentos (Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20) e as que apresentam os resultados preliminares obtidos (Tabelas 21, 22, 23, 24 e 25).

O desvio padrão dos resultados obtidos foi calculado e o limite de repetibilidade para cada nível de concentração avaliado. Foi verificado se estes parâmetros são constantes em valor absoluto e relativo em função da concentração do analito na amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Tabelas de composição de alimentos

Foram encontradas na literatura 14 tabelas de composição de alimentos que apresentam dados de teores de vitaminas do complexo B e ferro contidos em farinhas de cereais, sendo 10 tabelas internacionais (todas online) e 4 nacionais (2 online). Os dados encontrados estão apresentados nas Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20 respectivamente para farinhas de arroz, cevada, trigo, milho e aveia.

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos USP, e as tabelas “SA Food Composition Database” e “New Zealand Food Composition Data” não fornecem dados de vitaminas do complexo B e ferro nas matrizes propostas.

Avaliando-se os dados encontrados na literatura, pode-se observar que os dados internacionais são apresentados em maior número e que as tabelas brasileiras não apresentam teores de todos os micronutrientes de interesse. Destaca-se, assim, a necessidade da geração de dados nacionais, obtidos com métodos validados, para análise das vitaminas e minerais naturalmente presentes.

Com bases nesses dados, foram escolhidas sete vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₆, niacina, ácido fólico, biotina e ácido pantotênico) e um mineral (ferro) para serem analisados nas farinhas de cereais nacionais.

Tabela 16: Teores médios, obtidos na literatura, de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de arroz.

	Vitamina B1 (mg/100g)	Vitamina B2 (mg/100g)	Vitamina B6 (mg/100g)	Vitamina PP (mg/100g)	Vitamina B12 (ug/100g)	Biotina (ug/100g)	Ácido Fólico (ug/100g)	Ácido Pantotênico (mg/100g)	Ferro (mg/100g)
Danish Food Composition Databank Farinha de Arroz	0,07 - 0,084 (como cloridrato de tiamina)	0,023 - 0,036	0,192 - 0,22 (como cloridrato de piridoxina)	1,62 NE (como triptofano)	0	1	10 Folato (por método microbiológico)	0,5 (como D-pantotenato de cálcio)	0,57 - 2,4
USDA National Nutrient Database Farinha de arroz branca	0,138	0,021	0,436	2,59 (como Niacina)	0	-	4 (como Folato Total)	0,819	0,35
Farinha de arroz marrom	0,443	0,08	0,736	6,34 (como Niacina)	0	-	16 (como Folato Total)	1,591	1,98
Finnish Food Composition Database (Fineli). Farinha de arroz grão inteiro	0,05	0,03	0,61 (como vitâmeros de cloridrato de	6 (como niacina equivalente NE)	0	-	49 (como folato)	-	3,6 (como ferro total)
Tabla de Composición de Alimentos de América Latina Farinha de Arroz crua México	0,08	0,03	-	1,6 (como Niacina)	-	-	-	-	1,3
Farinha de Arroz polida México	2,8	0,2	-	40 (como Niacina)	-	-	-	-	4,3
Canadian Nutrient File Farinha de arroz branca grãos	0,138	0,021	0,436	2,5 (como Niacina) 3,79 (como niacina equivalente NE)	0	-	4 (como folato)	0,819	0,35
Farinha de arroz marron grãos	0,443	0,08	0,736	6,86 (como Niacina) 7,873 (como niacina equivalente NE)	-	-	16 (como folato)	1,591	1,98
Food Composition Database for Epidemiological Studies in Italy Farinha de arroz	0,05	0,04	1,4	0,44 (como Niacina)	-	-	4 (como ácido fólico)	-	0,4
Tabela de Composição Química dos Alimentos Farinha de arroz integral	0,1	0,5	-	2,1 (como Niacina)	-	-	-	-	1,05
Farinha de arroz polido	0,03	0,026	-	0,54 (como Niacina)	-	-	-	-	-
Food Composition and Nutrition Tables Farinha de arroz	0,06	0,03	0,2	1,4 (como Niacinamida)	-	-	10	-	1,05
TACO Farinha de arroz enriquecida	3,23	< 0,03	3,47	24,42	-	-	-	-	31,4

Tabela 17: Teores médios, obtidos na literatura, de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de aveia.

	Vitamina B1 (mg/100g)	Vitamina B2 (mg/100g)	Vitamina B6 (mg/100g)	Vitamina PP (mg/100g)	Vitamina B12 (ug/100g)	Biotina (ug/100g)	Ácido Fólico (ug/100g)	Ácido Pantotênico (mg/100g)	Ferro (mg/100g)
USDA National Nutrient Database Farinha de aveia	0,692	0,125	0,125	1,474 (como Niacina)	-	-	32 (como folato total)	0,201	4
Finnish Food Composition Database (Fineli) Farinha de aveia	0,33	0,09	0,13 (como vitâmeros de cloridrato de piridoxina)	3,8 (como niacina equivalente)	0	-	46 (como folato)	-	6,3 (como ferro total)
Tabla de Composición de Alimentos de América Latina Farinha de aveia Venezuela Crua	0,41 - 0,594	0,09 - 0,158	-	0,8 - 1,4 (como Niacina)	-	-	-	-	4,13 - 5
Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para decisão nutricional Farinha de aveia	0,2	0,08	-	1 (como niacina)	-	-	-	-	2,1
Tabela de Composição Química dos Alimentos Farinha de aveia crua nacional	0,43	0,15	-	1 (como Niacina)	-	-	-	-	3,8
Farinha de aveia crua internacional	0,6	0,14	-	1 (como Niacina)	-	-	-	-	4,12
Farinha de aveia cozida	0,12	0,045	-	0,47 (como Niacina)	-	-	-	-	0,63
Food Composition and Nutrition Farinha de Aveia	0,56	0,12	0,2	0,93 (como Niacinamida)	-	-	-	-	4,2

Tabela 18: Teores médios, obtidos na literatura, de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de cevada.

	Vitamina B1 (mg/100g)	Vitamina B2 (mg/100g)	Vitamina B6 (mg/100g)	Vitamina PP (mg/100g)	Vitamina B12 (ug/100g)	Biotina (ug/100g)	Ácido Fólico (ug/100g)	Ácido Pantotênico (mg/100g)	Ferro (mg/100g)
Danish Food Composition Databank	0,33		0,33	2					
Farinha de cevada	(como cloridrato de tiamina)	0,11	(como cloridrato de piridoxina)	NE (como triptofano) 5,7 (como niacina)	0	-	-	-	4,5
USDA National Nutrient Database				6,269			8		
Farinha de Cevada	0,37	0,114	0,396	(como niacina)	0	-	(como folato total)	0,145	2,68
Finnish Food Composition Database (Fineli)				5,5			19		
Farinha de cevada	0,4	0,12	0,1 (como vitâmeros de cloridrato de piridoxina)	(como niacina equivalente NE)	0	-	(como folato)	-	4,5 (como ferro total)
Tabla de Composición de Alimentos de América									
Farinha de cevada Equador	-	-	-	-	-	-	-	-	7,2
Farinha de cevada Peru	0,35	0,17	-	-	-	-	-	-	6,1
Farinha de cevada Argentina	0,08	0,16	-	1,7 (como niacina)	-		-	-	-
Canadian Nutrient File				6,269 (como niacina)			8		
Farinha de cevada grãos	0,37	0,114	0,396	9,186 (como niacina equivalente NE)	0	-	(como folato)	-	2,68
Farinha de cevada grãos parcialmente farelento				1,474 (como niacina)			32		
	0,692	0,125	0,125	4,162 (como niacina equivalente NE)	0	-	(como folato)	0,201	4
Tabela de Composição Química dos Alimentos				11,34 (como Niacina)			-		
Farinha de cevada	0,785	0,432	-		-	-	-	-	2,77
Food Composition and Nutrition				4,8			56		
Farinha de Cevada	0,43	0,18	0,56	(como Niacinamida)	-	-		0,68	2,8

Tabela 19: Teores médios, obtidos na literatura, de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de milho.

	Vitamina B1 (mg/100g)	Vitamina B2 (mg/100g)	Vitamina B6 (mg/100g)	Vitamina PP (mg/100g)	Vitamina B12 (ug/100g)	Biotina (ug/100g)	Ácido Fólico (ug/100g)	Ácido Pantotênico (mg/100g)	Ferro (mg/100g)
Danish Food Composition Databank	0,33	0,11	0,33	0,73 NE (como triptofano)	0	-	20 Folato (por método microbiológico)	-	1,1
Farinha de Milho	(como cloridrato de tiamina)		(como cloridrato de piridoxina)	5,7 (como Niacina)					
USDA National Nutrient Database	0,246	0,08	0,37	1,9 (como Niacina)	0	-	25 (como folato total)	0,658	2,38
Farinha de milho amarelo - grão inteiro									
Farinha de milho branco - grão inteiro	0,246	0,08	0,37	1,9	0	-	25	0,658	2,38
Finnish Food Composition Database (Fineli).	0,14	0,05	0,33 (como vitâmeros de cloridrato de piridoxina)	2,3 (como niacina equivalente NE)	0	-	10,1 (como folato)	-	1,5 (como ferro total)
Farinha de milho									
Tabla de Composición de Alimentos de América Latina	0,45	0,13	-	2,3 (como niacina)	-	-	-	-	2
Farinha de milho Peru									
Farinha de milho Colombia	0,35	0,1	-	2 (como niacina)	-	-	-	-	10,6
Farinha de milho Colombia tostada	0,2	0,17	-	2 (como niacina)	-	-	-	-	2,7
Farinha de milho México	0,26	0,05	-	1,7 (como niacina)	-	-	-	-	2,6
Canadian Nutrient File	0,246	0,08	0,37	1,9 (como niacina) 2,717 (como niacina equivalente NE)	-	-	25	0,658	2,38
Farinha de milho amarelo grão inteiro									
Tabla de Composición de Alimentos	0,189	0,131		2,4 (como niacina)					2,61 - 2,90
Farinha de milho amarelo crua									
Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para decisão nutricional	0,25	0,08	0,37	1,9 (como niacina)	0	-	25	0,66 (como D-pantotenato de cálcio)	2,39
Farinha de milho									
Tabela de Composição Química dos Alimentos	0,107	0,107	-	1,5 (como Niacina)	-	-	-	-	-
Farinha de milho amarelo									
Farinha de milho branco	0,24	0,08	-	0,54 (como Niacina)	-	-	-	-	-
Food Composition and Nutrition	0,44	0,13	0,06	1,9 (como Niacinamida)	-	6,6	10	0,55	2,4
Farinha de Milho									
TACO	0,25	< 0,03	0,25	< 1	-	-	-	-	2,3
Farinha de milho amarelo									

Tabela 20: Teores médios, obtidos na literatura, de vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de trigo.

	Vitamina B1 (mg/100g)	Vitamina B2 (mg/100g)	Vitamina B6 (mg/100g)	Vitamina PP (mg/100g)	Vitamina B12 (ug/100g)	Biotina (ug/100g)	Ácido Fólico (ug/100g)	Ácido Pantotênico (mg/100g)	Ferro (mg/100g)
Danish Food Composition Databank Farinha de trigo	0,140 - 0,233 (como cloridrato de tiamina)	0,029 - 0,037	0,066 - 0,094 (como cloridrato de piridoxina)	1,83 NE (como triptofano) 1 - 1,45 (como Niacina)	0	1,2 - 3	18 Folato (por método microbiológico)	0,44 - 0,55 (como D-pantotenato de cálcio)	0,1 - 2,55
USDA National Nutrient Database Farinha de trigo branca, não enriquecida	0,12	0,04	0,044	1,25	0	-	26 (como folato total)	0,438	1,17
Finnish Food Composition Database (Fineli) Farinha de trigo grão inteiro	0,35	0,15	0,11 (como vitâmeros de cloridrato de piridoxina)	6 (como niacina equivalente NE)	0	-	50 (como folato)	-	5,2 (como ferro total)
Tabla de Composición de Alimentos de América Farinha de trigo Peru	0,11	0,06	-	0,9 (como niacina)	-	-	-	-	0,6
Farinha de trigo Colombia	0,52	0,27	-	3,2 (como niacina)	-	-	-	-	2,4
Farinha de trigo México	0,18	0,2	-	1 (como niacina)	-	-	-	-	0,3
Farinha de trigo Argentina	0,17 - 0,22	0,06 - 0,09	-	1,1 - 1,7 (como niacina)	-	-	-	-	0,8 - 1,5
Farinha de trigo Venezuela	0,16 - 0,45	0,08 - 0,17	-	2,5 - 3,8 (como niacina)	-	-	-	-	1,9 - 2,9
Canadian Nutrient File Farinha de trigo branca	0,785	0,494	0,044	5,904 (como niacina) 8,021 (como niacina equivalente NE)	-	-	29 (como folato)	0,438	4,64
Tabla de Composición de Alimentos Farinha de trigo	1,557	0,364	-	5,2 (como niacina)	-	-	-	-	3,3
Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para decisão nutricional Farinha de trigo comum	0,31	0,03	0,15	1,7 (como niacina)	0	-	22	0,3 (como D-pantotenato de cálcio)	2
Food Composition and Nutrition Farinha de Trigo	0,06 - 0,47	0,03 - 0,17	0,18 - 0,46	0,7 - 5 (como Niacinamida)	-	1,5 - 8,3	10,0 - 50,0	0,21 - 1,2	1,5 - 4,7
TACO Farinha de Trigo	0,31	< 0,03	-	0,89	-	-	-	-	1,0

Conforme determinação da ANVISA (BRASIL, 2002), cada 100g de farinha de trigo e de farinha de milho devem fornecer no mínimo 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico. Nos resultados preliminares obtidos, podemos observar uma grande variação dos teores desses micronutrientes nas farinhas de trigo e milho fortificadas, o que pode ser explicado pelo fato da ANVISA ter estabelecido que onde comprovadamente o ferro e ou o ácido fólico causem interferências no processo de produção de alimentos enriquecidos, tais matérias primas poderiam ser isentas da adição de ferro e ou ácido fólico. Neste caso, a empresa deve manter a disposição do Órgão de Vigilância Sanitária, os estudos que comprovem essa interferência (BRASIL, 2002). Ficou estabelecido também que a escolha dos compostos de ferro para fortificação é de responsabilidade das indústrias, que devem garantir a estabilidade destes nas farinhas de trigo e milho dentro dos prazos de validade das mesmas e que as empresas devem assegurar que os compostos de ferro de grau alimentício sejam biodisponíveis. As empresas podem utilizar os seguintes compostos de ferro de grau alimentício: sulfato ferroso desidratado (seco); fumarato ferroso; ferro reduzido - 325 mesh Tyler; ferro eletrolítico - 325 mesh Tyler; EDTA de ferro e sódio (NaFeEDTA); e ferro bisglicina quelato. Podem ser usados outros compostos desde que a biodisponibilidade não seja inferior a dos compostos listados. As empresas devem utilizar o ácido fólico de grau alimentício (BRASIL, 2002).

5.2. Resultados preliminares dos teores das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina, biotina, ácido fólico, ácido pantotênico e ferro em amostras de farinha de arroz, aveia, cevada, milho e trigo

Os resultados preliminares das vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de arroz, aveia, cevada, milho e trigo estão apresentados nas Tabelas 21, 22, 23, 24 e 25, respectivamente. Nestas Tabelas incluiu-se a variação encontrada para cada micronutriente apresentado nas Tabelas de Composição de Alimentos para facilitar a comparação dos dados.

Tabela 21: Resultados preliminares dos teores de vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de arroz.

Amostras	Vitamina B₁ (mg/100g)	Vitamina B₂ (mg/100g)	Vitamina B₆ (mg/100g)	Niacina (mg/100g)	Biotina (µg/100g)	Ácido Fólico (µg/100g)	Ácido Pantotênico (mg/100g)	Ferro (mg/100g)
Amostra 1	nd	0,08	0,08	nd	0,97	18	0,7	0,21
Amostra 2	nd	0,08	0,22	0,2	1,00	21	0,9	-
Amostra 3	-	0,02	nd	-	1,84	13	0,77	-
Amostra 4	-	0,02	0,96	-	1,10	6	0,76	-
Amostra 5	-	0,01	nd	-	0,76	12	0,81	-
Amostra 6	-	0,02	1,04	-	0,57	9	0,75	-
Amostra 7	-	0,02	0,19	-	0,87	12	0,75	-
Amostra 8	-	0,02	0,29	-	1,38	14	0,80	-
Amostra 9	-	0,02	0,30	-	1,54	21	0,94	-
Amostra 10	-	0,07	0,04	-	1,22	15	0,70	-
Tabelas de composição de alimentos (Tabela 16)	0,03 – 0,15	0,02 – 0,5	0,2 – 0,8	0,4 – 6	-	4 - 49	0,50 – 0,85	0,40 – 4,0

-: não analisado e nd: não detectado

Tabela 22: Resultados preliminares dos teores de vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de aveia.

Amostras	Vitamina B₁ (mg/100g)	Vitamina B₂ (mg/100g)	Vitamina B₆ (mg/100g)	Niacina (mg/100g)	Biotina (µg/100g)	Ácido Fólico (µg/100g)	Ácido Pantotênico (mg/100g)	Ferro (mg/100g)
Amostra 1	0,45	0,09	0,68	0,36	21,89	7,13	0,51	3,89
Amostra 2	0,61	0,17	0,11	-	24,00	10,00	0,60	-
Amostra 3	0,37	0,08	0,57	-	33,14	11,21	0,40	-
Amostra 4	0,51	0,11	0,68	-	33,00	-	0,71	-
Amostra 5	0,53	0,15	0,29	-	19,36	11,13	0,48	2,98
Amostra 6	0,46	0,15	0,30	-	11,34	15,31	0,64	1,94
Amostra 7	0,51	0,11	0,36	-	23,65	8,69	0,74	4,30
Amostra 8	0,46	0,10	0,65	-	18,38	13,50	0,56	4,10
Amostra 9	0,54	0,09	0,71	-	24,02	18,04	0,64	4,38
Tabelas de composição de alimentos (Tabela 17)	0,20 – 0,70	0,08 – 0,15	0,12 – 0,13	0,8 – 3,8	-	32 – 46	0,20	2,10 – 6,30

-: não analisado

Tabela 23: Resultados preliminares dos teores de vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de cevada.

Amostra	Vitamina B₁ (mg/100g)	Vitamina B₂ (mg/100g)	Vitamina B₆ (mg/100g)	Niacina (mg/100g)	Biotina (µg/100g)	Ácido Fólico (µg/100g)	Ácido Pantotênico (mg/100g)	Ferro (mg/100g)
Amostra 1	nd	0,14	0,12	0,10	1,49	8,48	0,3	-
Amostra 2	-	-	-	0,94	-	-	-	-
Tabelas de composição de alimentos (Tabela 18)	0,08 – 0,80	0,11 – 0,45	0,10 – 0,56	1,5 – 11,5	-	8 – 56	0,15 – 0,68	2,7 – 6,1

:- não analisado e nd: não detectado

Tabela 24: Resultados preliminares dos teores de vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de milho.

Amostra	Vitamina B₁ (mg/100g)	Vitamina B₂ (mg/100g)	Vitamina B₆ (mg/100g)	Niacina (mg/100g)	Biotina (µg/100g)	Ácido Fólico (µg/100g)	Ácido Pantotênico (mg/100g)	Ferro (mg/100g)
Amostra 1	nd	0,08	nd	-	0,2	352	0,2	-
Amostra 2	-	-	-	-	-	105	-	-
Amostra 3	-	-	-	-	-	135	-	-
Amostra 4	-	-	-	-	-	296	-	-
Amostra 5	-	-	-	-	-	236	-	-
Amostra 6	-	-	-	-	-	299	-	-
Amostra 7	-	-	-	-	-	484	-	-
Amostra 8	-	-	-	-	-	1016	-	-
Amostra 9	-	-	-	-	-	300	-	-
Tabelas de composição de alimentos (Tabela 19)	0,10 – 0,45	0,05 – 0,17	0,06 – 0,37	1,5 – 6,0	-	10 – 25	0,5 – 0,7	1 – 10

:- não analisado e nd: não detectado

Tabela 25: Resultados preliminares dos teores de vitaminas do complexo B e ferro em amostras de farinha de trigo.

Amostra	Vitamina B₁ (mg/100g)	Vitamina B₂ (mg/100g)	Vitamina B₆ (mg/100g)	Niacina (mg/100g)	Biotina (µg/100g)	Ácido Fólico (µg/100g)	Ácido Pantotênico (mg/100g)	Ferro (mg/100g)
Amostra 1	nd	0,09	0,08	0,30	nd	72	0,40	-
Amostra 2	0,60	0,14	0,09	0,30	1	109	0,70	-
Amostra 3	0,61	0,16	0,19	0,40	2	169	0,80	7,1
Amostra 4	nd	0,07	0,59	-	-	81	0,60	-
Amostra 5	0,99	0,15	0,35	-	-	456	0,90	11,57
Amostra 6	0,83	0,12	0,07	0,83	-	129	0,88	5,77
Amostra 7	0,60	0,11	0,45	-	-	231	0,90	11,85
Amostra 8	0,45	0,08	0,42	0,55	-	155	0,59	-
Amostra 9	0,41	0,08	0,37	-	-	63	0,58	-
Amostra 10	0,34	0,07	0,35	-	-	73	0,58	-
Amostra 11	-	-	-	-	-	203	-	-
Amostra 12	-	-	-	-	-	189	-	-
Amostra 13	-	-	-	-	-	94	-	-
Tabelas de composição de alimentos (Tabela 20)	0,06 – 1,60	0,03 – 0,50	0,05 – 0,46	0,9 – 6,0	1,2 – 8,3	10 – 50	0,2 – 1,2	0,3 – 5,0

-: não analisado e nd: não detectado

Avaliando-se os dados obtidos (Tabelas 21, 22, 23, 24 e 25), foi possível confirmar a presença das mesmas vitaminas do complexo B e ferro citados na literatura para as amostras nacionais de farinhas de cereais e na mesma ordem de grandeza e concluir que os métodos propostos podem ser utilizados para as determinações desses micronutrientes.

Na prática existe a necessidade de analisar as matérias-primas que compõem um alimento enriquecido frente aos micronutrientes que serão adicionados no premix para que o teor naturalmente presente não seja desprezado no planejamento do enriquecimento de alimentos.

Os dados nacionais, por serem semelhantes aos dados mundiais, podem servir como uma indicação inicial do teor esperado de vitaminas do complexo B e ferro em matérias-primas originadas de países que ainda não apresentam tais

dados avaliados. Isto facilita o cálculo da quantidade de premix a ser adicionado, levando-se em consideração o teor natural, para atingir a faixa permitida pela legislação de cada país. No Brasil, a adição de micronutrientes deve corresponder no máximo a 120% o teor declarado no rótulo (BRASIL, 2003b).

Os resultados preliminares contribuíram para que os métodos propostos fossem adaptados antes de se realizar as validações das metodologias, e assim, as mesmas fornecerem parâmetros aplicáveis aos baixos níveis de algumas vitaminas nas diferentes farinhas de cereais analisadas.

Segundo um estudo anterior (dados não publicados), que comparou os dados de vitaminas do complexo B e de ferro, obtidos de amostras de alimentos fortificados com tais micronutrientes, com os dados teóricos esperados em função da quantidade de cada micronutriente que foi adicionado, constatou-se que existe uma contribuição natural considerável de determinadas vitaminas e do ferro nas matérias-primas em questão. Se o rótulo do alimento é confeccionado levando-se em consideração apenas a quantidade de cada micronutriente adicionada no processo de fortificação do produto, podemos encontrar teores de micronutrientes declarados que não condizem com aqueles realmente presentes no produto analisado. O resultado experimental pode ser maior do que o esperado para alguns micronutrientes, quando a contribuição natural das matérias-primas não é levada em consideração nos cálculos teóricos de enriquecimento, o que pode condenar esses produtos frente aos critérios de rotulagem nutricional adotados pela legislação vigente. Portanto, com os resultados do presente trabalho, pretende-se ressaltar a importância de um melhor planejamento durante a adição das vitaminas e do ferro no enriquecimento de alimentos industrializados.

5.3. Escolha do método para análise de vitamina B₁ e B₂

Na realização das análises preliminares (Tabelas 21, 22, 23, 24 e 25) foi utilizado o método com determinação simultânea para análise das vitaminas B₁ e B₂ com detecção através de reação pós-coluna. Como tais vitaminas estão presentes em níveis muito baixos em amostras de farinhas de cereais (Tabelas

16, 17, 18, 19 e 20), foram calculados os limites de detecção e quantificação deste método a fim de concluir se os teores não detectados foram devido ao limite de detecção do método ou à ausência destes micronutrientes propriamente dita. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26: Limite de detecção e quantificação do método para a análise das vitaminas B₁ e B₂ utilizando reação pós-coluna.

Vitaminas	Limite de Detecção (mg/100g)	Limite de Quantificação (mg/100g)
Vitamina B ₁	0,05	0,15
Vitamina B ₂	0,006	0,02

Comparando-se o limite de quantificação encontrado para a vitamina B₁ (0,15 mg/100g) com a faixa de vitamina encontrada nas análises preliminares para as diferentes farinhas (não detectado – 0,99 mg/100g), nota-se que este método não pode ser aplicado para amostras de farinha de cereais que apresentam teores naturais de vitamina B₁ abaixo de 0,15 mg/100g.

Assim, o método para análise de vitamina B₁ e B₂ foi modificado (itens 4.2.3 e 4.2.4) e validado nas novas condições analíticas. A validação das metodologias propostas para análise dos outros micronutrientes abordados neste trabalho também foi realizada.

5.4. Validação dos métodos analíticos para as vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina (CLAE) e ferro (espectrofotometria de absorção atômica)

A amostra escolhida para realizar a avaliação dos parâmetros de validação das análises das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina, para a matriz cereal, foi a farinha de aveia por esta não ser adicionada de micronutrientes e ter apresentado teores de

tais vitaminas mais próximos ou maiores do que a faixa encontrada nas Tabelas de Composição de Alimentos, conforme resultados preliminares (Tabela 22). Para a avaliação do ferro na mesma matriz, foi escolhida a farinha de trigo, uma vez que este micronutriente pode estar adicionado pelo fornecedor e, portanto apresentar-se em diferentes níveis de concentração.

5.4.1. Campo de aplicação

Os métodos propostos aplicam-se a matriz cereal, e as faixas de teores de micronutrientes aplicáveis a cada método estão apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27: Faixas de teores de micronutrientes às quais a metodologia se aplica.

Micronutriente	Campo de aplicação (mg de micronutriente/100g de amostra)
Vitamina B₁	0,01 – 2,0
Vitamina B₂	0,06 – 1,2
Piridoxol	0,04 – 4,0
Piridoxal	0,04 – 4,0
Piridoxamina	0,05 – 4,5
Niacina	0,05 – 2,0
Niacinamida	0,05 – 2,0
Ferro	0,11 – 6,0

5.4.2. Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para as vitaminas estudadas por CLAE e para o ferro encontram-se nas Tabela 28. Nota-se que o limite de quantificação obtido (0,01 mg/100g) para a vitamina B₁ é bem menor que o limite obtido de 0,15 mg/100g no método que realiza análise simultânea de vitamina B₁ e B₂ utilizando reação pós-coluna (item 5.3),

possibilitando, assim, a quantificação adequada dos teores dessa vitamina naturalmente presentes em amostras de farinha de cereais.

Tabela 28: Limite de detecção e quantificação dos métodos propostos.

Micronutriente	Limite de detecção (mg/100g)	Limite de quantificação (mg/100g)
Vitamina B₁	0,003	0,01
Vitamina B₂	0,004	0,01
Piridoxol	0,003	0,01
Piridoxal	0,002	0,01
Piridoxamina	0,002	0,01
Niacina	0,009	0,03
Niacinamida	0,009	0,03
Ferro	0,06	0,11

5.4.3. Linearidade

Os dados obtidos de no estudo de linearidade encontram-se nas Tabelas 29, 30 e 31, respectivamente para as vitaminas B₁ e B₂, B₆ e PP, e os vitâmeros correspondentes.

Tabela 29: Linearidade das análises de vitamina 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=3)	Desvio Padrão U.Área
0,01	3204	7	0,1	2308	72
0,05	18290	229	0,6	10467	266
0,10	35726	78	1,2	22011	1162
0,20	75766	335	3,0	59458	1627
0,40	155448	571	6,0	122493	672
1,00	394573	887	12,0	241035	969
2,00	687981	1993			
Inclinação da reta: 349512			Inclinação da reta: 20330		
Intersecção da reta: 8118			Intersecção da reta:- 1209		
R ² : 0,9950			R ² : 0,9998		

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

Tabela 30: Linearidade da análise 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
0,4	65325	825	0,5	56585	14895	0,5	115595	585
0,8	138148	1766	0,9	144540	603	1,0	254007	1612
1,7	281208	2395	1,8	293820	1395	2,1	535458	3789
3,4	578753	3602	3,6	589935	3942	4,2	1084180	4316
6,8	1140108	5462	7,2	1177140	11795	8,4	2086378	34560
17,0	2893822	6594	18,0	2977975	5903	21,0	5497393	12131
33,9	5805570	10934	36,0	5913243	18062	41,9	11001784	35693
Inclinação da reta: 171350			Inclinação da reta: 164649			Inclinação da reta: 263163		
Intersecção da reta: - 9657			Intersecção da reta: - 4947			Intersecção da reta: - 35390		
R ² : 0,9999			R ² : 0,9999			R ² : 0,9999		

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

Tabela 31: Linearidade da análise dos vitâmeros da vitamina PP.

Niacina					
Niacina			Niacinamida		
Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área	Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área
0,55	7535	263	0,51	13256	243
1,09	14699	294	1,03	26089	170
10,92	139788	987	10,32	261276	1215
21,84	285844	2308	20,64	522748	3188
109,20	1360195	43272	103,20	2483598	94524
Inclinação da reta: 12148			Inclinação da reta: 27007		
Intersecção da reta: 6063			Intersecção da reta: 9805		
R ² : 0,9998			R ² : 0,9999		

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

Os dados obtidos no estudo de linearidade da análise de ferro encontram-se na Tabela 32.

Tabela 32: Linearidade da análise de ferro.

Ferro		
Concentração (µg/mL)	Leitura Média Unidade Abs (n=3)	Desvio Padrão Unidade Abs (n=3)
0,05	0,00353	0,00085
0,10	0,00590	0,00080
0,24	0,01525	0,00017
0,50	0,03040	0,00128
1,00	0,06125	0,00079
2,00	0,11770	0,00181
3,50	0,20058	0,00326
5,00	0,27615	0,00404
Inclinação da reta: 0,0556		
Intersecção da reta: + 0,0025		
R ² : 0,9991		

Unidade Abs : unidades de absorbância; n: número de leituras.

As Figuras 16 e 17 mostram as curvas de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada, respectivamente, das vitaminas B₁ e B₂. Estas informações para os vitâmeros da vitamina B₆ encontram-se na Figura 18, para a niacina, na Figura 19 e para o Ferro na Figura 20.

Figura 16: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de vitamina B₁.

Figura 17: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de vitamina B₂.

Figura 18: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de vitamina B₆.

Figura 19: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de Niacina.

Figura 20: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de Ferro.

5.4.4. Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho

Todos os compostos apresentaram-se lineares nas faixas estudadas e a razão resposta/massa apresentada para cada um não foi independente da

concentração em toda faixa estudada apenas para a vitamina B₂. Assim, a faixa linear de trabalho para esta vitamina ficou limitada à região de concentração onde a relação resposta/massa permaneceu praticamente inalterada. Neste trabalho foi adotado um desvio padrão relativo da razão resposta/massa máximo de 10% para considerar a relação resposta/massa praticamente inalterada.

As faixas lineares de trabalho definidas para cada composto estudado estão apresentadas na Tabela 33, juntamente com os limites de concentração de amostra ou campo de aplicação, que foram calculados levando-se em consideração a relação massa/diluição de amostra proposta no método, e os limites de quantificação.

Tabela 33: Faixa linear de trabalho, limites de concentração de amostra e limite de quantificação para a análise das vitaminas B₁, B₂, B₆, PP e ferro.

Micronutrientes	Faixa Linear de Trabalho	Unidade da faixa linear de trabalho	Limite inferior de concentração da amostra definido pela faixa linear de trabalho (mg/100g)	Limite superior de concentração da amostra definido pela faixa linear de trabalho (mg/100g)	Limite quantificação (mg/100g)
Vitamina B₁	0,01 – 2	ng injetado	0,01	2,0	0,01
Vitamina B₂	0,60 – 12	ng injetado	0,06	1,2	0,01
Piridoxol	0,40 – 40	ng injetado	0,04	4,0	0,01
Piridoxal	0,40 – 40	ng injetado	0,04	4,0	0,01
Piridoxamina	0,50 – 45	ng injetado	0,05	4,5	0,01
Niacina	0,50 – 20	ng injetado	0,06	2,0	0,03
Niacinamida	0,50 – 20	Ng injetado	0,06	2,0	0,03
Ferro	0,05 - 5	µg/mL	0,11	6	0,11*

*(µg/mL)

Como os teores das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina encontrados em farinhas de cereais estão presentes como teores naturais, o limite inferior de concentração de amostra para cada faixa linear de trabalho proposta apresentou-se muito próximo ao limite de quantificação, o que se pode observar na Tabela 33.

Para a niacina, tanto na forma ácida quanto na forma amida, apesar do desvio padrão relativo da razão resposta/massa ter sido menor do que 10%, a faixa linear de trabalho não foi definida como toda a faixa linear estudada, pois os pontos de concentração não se apresentaram eqüidistantes na reta de regressão estudada. O valor de máximo de 20 ng de niacina injetado é suficiente para quantificar esta vitamina nas amostras propostas, uma vez que os seus teores de niacina em farinha de cereais esperados encontraram-se entre 0,4 e 11 mg/100g (Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20).

5.4.5. Sensibilidade

A sensibilidade foi expressa como a inclinação da reta de regressão. Os dados calculados de sensibilidade para as vitaminas analisadas por CLAE e para o ferro estão apresentados na Tabela 34.

Tabela 34: Valores de sensibilidade obtidos para as vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina e ferro.

MICRONUTRIENTE	SENSIBILIDADE (unidade de área/massa injetada)
Vitamina B ₁	349512
Vitamina B ₂	20330
Piridoxol	171350
Piridoxal	164649
Piridoxamina	263163
Niacina	12148
Niacinamida	24007
MICRONUTRIENTE	SENSIBILIDADE (unidade de absorbância/concentração lida em µg/mL)
Ferro	0,0556

5.4.6. Exatidão

A técnica de recuperação do analito adicionado foi utilizada para avaliação da exatidão dos métodos propostos, conforme descrito no item 4.2.8.6. Os valores calculados das análises realizadas pelo método de CLAE estão apresentados na Tabela 35. Aqueles calculados para o ferro estão apresentados na Tabela 36.

Tabela 35: Dados de exatidão (recuperação) obtidos a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de aveia adicionadas de vitamina B₁, B₂, B₆ e PP.

Dados de recuperação (%)							
Amostras	Vitamina B₁	Vitamina B₂	Cloridrato de piridoxol	Cloridrato de piridoxal	Cloridrato de piridoxamina	Niacinamida	Niacina
1	72	83	93	79	91	75	84
2	79	86	93	76	91	90	100
3	73	94	96	64	96	90	96
4	72	89	96	64	87	95	101
5	72	101	90	60	95	87	97
6	72	90	94	65	94	90	97
Média	73	90	94	68	92	88	96
Desvio Padrão	2,73	6,19	2,27	7,54	3,47	6,88	5,98
Desvio padrão relativo	4	7	2	11	4	8	6

Tabela 36: Dados de exatidão (recuperação) obtidos a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de trigo adicionada de ferro.

Dados de Recuperação	
%	
Amostras	Ferro
1	94
2	100
3	94
4	89
5	93
6	96
Média	94
Desvio Padrão	4
Desvio padrão relativo	4

5.4.7. Precisão

Os resultados da avaliação de precisão nas análises das vitaminas realizadas pelo método de CLAE e da análise de ferro encontram-se nas Tabela 37 e 38, respectivamente.

Os limites de repetibilidade (r) foram calculados através da equação:

$$\text{Limite de repetibilidade: } r = 2,8 * \text{desvio padrão}$$

Tabela 37: Limites de repetibilidade obtidos de teores de vitaminas calculados a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de aveia.

Amostras	Vitamina B ₁	Vitamina B ₂	Vitamina B ₆			Niacinamida	Niacina
			Cloridrato de Piridoxol	Cloridrato de Piridoxal	Cloridrato de Piridoxamina		
	mg/100g						
1	0,47	0,083	0,05	0,06	0,05	0,32	0,37
2	0,47	0,078	0,04	0,06	0,05	0,26	0,38
3	0,46	0,090	0,04	0,06	0,06	0,26	0,37
4	0,47	0,085	0,04	0,06	0,05	0,25	0,38
5	0,46	0,097	0,05	0,05	0,05	0,25	0,40
6	0,48	0,087	0,05	0,06	0,05	0,28	0,37
Média	0,47	0,087	0,04	0,06	0,05	0,27	0,38
Desvio Padrão	0,006	0,006	0,005	0,002	0,004	0,028	0,011
Desvio padrão relativo	1	7	13	3	8	10	3
Limites de repetibilidade (r)	0,020	0,020	0,020	0,015	0,015	0,080	0,031

Tabela 38: Limites de repetibilidade obtidos de teores de ferro calculados a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de trigo.

Dados de Precisão	
mg/100g	
Amostras	Ferro
1	4,393
2	4,384
3	4,534
4	3,950
5	4,572
6	3,866
Média	4,283
Desvio Padrão	0,301
Desvio Padrão Relativo	7,032
Limites de repetibilidade (r)	0,867

5.5. Validação dos métodos microbiológicos para a determinação de biotina, ácido fólico e ácido pantotênico

A amostra escolhida para realizar a avaliação dos parâmetros de validação da biotina, ácido fólico e ácido pantotênico, para a matriz cereal, foi a farinha de aveia por esta não ser adicionada de micronutrientes e ter apresentado teores de tais vitaminas mais próximos ou maiores do que a faixa encontrada nas Tabelas de Composição de Alimentos, conforme resultados preliminares (Tabela 22). Para a avaliação do ácido fólico na mesma matriz, foi escolhida também a farinha de trigo, uma vez que este micronutriente pode estar adicionado pelo fornecedor e, portanto apresentar-se em diferentes níveis de concentração.

5.5.1. Campo de aplicação

Os métodos propostos aplicam-se a matriz cereal para dosagem de teor natural de ácido fólico, biotina e ácido pantotênico, e para dosagem de ácido fólico

adicionado na mesma matriz. As faixas de teores de micronutrientes aplicáveis a cada método estão apresentadas na Tabela 39.

Tabela 39: Faixas de teores de micronutrientes às quais a metodologia se aplica.

Micronutriente	Campo de aplicação (ng/tubo)
Ácido fólico	0,05 – 1,0
Biotina	0,02 – 0,35
Ácido pantotênico	5 – 100

5.5.2. Limite de quantificação

Os cálculos dos limites de quantificação para as vitaminas analisadas por método microbiológico foram realizados a partir da curva padrão. Assim, é definido em massa de vitamina por tubo (ng/tubo), respeitando as diluições realizadas. Pode ser expresso em massa de amostra quando a diluição da amostra na extração é considerada. Para a matriz cereal, a massa de 10 g diluída em 100 mL foi considerada a maior tomada de ensaio possível, segundo os métodos propostos neste trabalho. O limite de detecção não foi definido neste trabalho para as análises microbiológicas.

Os valores obtidos para o limite de quantificação para as vitaminas estudadas por método microbiológico encontram-se nas Tabela 40.

Tabela 40: Limite de quantificação das vitaminas avaliadas pelo método microbiológico.

Micronutriente	Limite de quantificação	Limite de quantificação (tomada de ensaio de 10g/100mL)
Ácido fólico	0,05 (ng/tubo)	0,5 (µg/100g)
Biotina	0,025 (ng/tubo)	0,25 (µg /100g)
Ácido pantotênico	6 (ng/tubo)	0,06 (mg/100g)

5.5.3. Linearidade

Os dados obtidos de linearidade para o ácido fólico, biotina e ácido pantotênico encontram-se na Tabela 41.

Tabela 41: Linearidade das análises de ácido fólico, biotina e ácido pantotênico.

Ácido fólico			Biotina			Ácido pantotênico		
Massa por tubo (ng)	Mediana U.Abs (n=2)	Desvio Padrão U.Abs	Massa por tubo (ng)	Mediana U.Abs (n=4)	Desvio Padrão U.Abs	Massa por tubo (ng)	Mediana U.Abs (n=4)	Desvio Padrão U.Abs
0,048	0,090	0,006	0,023	0,050	0,0022	5,5	0,015	0,00
0,095	0,126	0,007	0,045	0,064	0,0028	10,9	0,042	0,02
0,191	0,190	0,012	0,091	0,086	0,0076	21,8	0,071	0,00
0,286	0,263	0,027	0,136	0,097	0,0066	32,8	0,112	0,01
0,381	0,299	0,023	0,182	0,108	0,0098	43,7	0,148	0,02
0,477	0,315	0,019	0,227	0,133	0,0107	54,6	0,161	0,01
0,572	0,346	0,025	0,272	0,137	0,0076	65,5	0,175	0,02
0,668	0,374	0,014	0,318	0,151	0,0099	76,4	0,193	0,03
0,763	0,382	0,019	0,363	0,162	0,0107	87,4	0,223	0,01
R ² : 0,9912			R ² : 0,9917			R ² : 0,9891		

Massa por tubo: massa de vitamina em 10 mL meio de cultura; **U.Área** : unidades de absorbância;
n: número de tubos.

As Figuras 21, 22 e 23 mostram as curvas de regressão respectivamente para o ácido fólico, biotina e ácido pantotênico.

Figura 21: Curva de regressão da análise de ácido fólico.

Figura 22: Curva de regressão da análise de biotina.

Figura 23: Curva de regressão da análise de pantotenato de cálcio.

5.5.4. Sensibilidade

Como a relação entre a massa de vitamina por tubo e a resposta (unidade de absorbância), não é linear, uma vez que o crescimento microbiano obedece a uma lei exponencial, a sensibilidade não é constante ao longo da faixa de trabalho e não pode ser calculada na análise microbiológica de vitaminas conforme definição da literatura, ou seja, como a inclinação da reta de regressão linear.

5.5.5. Exatidão

A técnica de recuperação do analito adicionado foi utilizada para avaliação da exatidão dos métodos microbiológicos propostos, conforme descrito no item 4.2.8.6. Os valores calculados das análises realizadas pelo método microbiológico estão apresentados na Tabela 42.

Tabela 42: Dados de exatidão (recuperação) obtidos a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de aveia adicionada de ácido fólico, biotina e ácido pantotênico.

Dados de Recuperação (%)				
Amostras	Ácido fólico Nível 1 (150 µg/100g)	Ácido fólico Nível 2 (10 µg/100g)	Biotina (20 µg/100g)	Ácido pantotênico (20 µg/100g)
1	90	66	87	85
2	113	66	64	99
3	114	59	67	80
4	100	70	85	102
5	110	58	67	92
6	105	57	65	91
Média	105	63	72	91
Desvio Padrão	9	5	10	8
Desvio Padrão relativo	9	9	14	9

5.5.6. Precisão

Os resultados da avaliação de precisão nas análises realizadas pelo método microbiológico encontram-se na Tabela 43.

Os limites de repetibilidade (r) foram calculados através da equação:

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

Tabela 43: Limites de repetibilidade obtidos de teores de vitaminas calculados a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de aveia (ácido fólico, biotina e ácido pantotênico) e trigo (ácido fólico).

Dados de Precisão				
Amostras	Ácido fólico Nível 1 (µg/100g)	Ácido fólico Nível 2 (µg/100g)	Biotina (µg/100g)	Ácido pantotênico (mg/100g)
1	137,40	10,45	20,93	0,29
2	132,89	10,31	21,31	0,29
3	157,10	11,01	20,74	0,32
4	167,58	10,36	20,63	0,31
5	149,58	9,75	17,86	0,31
6	162,23	12,21	19,91	0,31
Média	151,13	10,68	20,23	0,30
Desvio Padrão	13,81	0,85	1,25	0,01
Desvio Padrão Relativo	9	8	6	5
Limite de repetibilidade (r)	38,66	2,37	3,50	0,04

5.6. Teores das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina, biotina, ácido fólico, ácido pantotênico e ferro em amostras de farinha de arroz, aveia, cevada, milho e trigo

As médias e os respectivos desvios padrão relativos dos teores das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina e ferro em amostras de farinha de arroz, aveia, cevada, milho e trigo estão apresentados na Tabela 44.

Cromatogramas de padrão e amostras de farinha de cereal das análises das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina estão apresentados nas Figuras 24, 25, 26 e 27.

A análise da vitamina B₁, pela mesma ser detectada após reação específica em detector de fluorescência, não apresenta interferentes nas amostras avaliadas, como pode ser observado na Figura 24. A análise da vitamina B₂, apesar da mesma não sofrer reação pré detecção, também não apresenta interferentes (Figura 25). Assim, os cromatogramas de amostra para estas duas vitaminas, nas condições cromatográficas estudadas, apresentam picos bem separados e de fácil identificação.

Já as análises de vitamina B₆ e niacina, apesar de serem detectadas por fluorescência, que é um detector mais específico quando comparado ao UV-visível, apresentam interferentes nas amostras avaliadas, como pode ser observado nas Figuras 26 e 27. Tal fato dificulta a identificação dos picos de interesse, que nestes dois casos, não são únicos, uma vez que as vitaminas B₆ e niacina são determinadas através dos seus vitâmeros (cloridrato de piridoxol, cloridrato de piridoxal e dicloridrato de piridoxamina, e niacina e niacinamida, respectivamente).

Figura 24: Cromatogramas de vitamina B₁ (reação pré-coluna): solução padrão e amostra de farinha de trigo.

Figura 25: Cromatogramas de vitamina B₂: solução padrão e amostra de farinha de aveia.

Figura 26: Cromatogramas de vitamina B₆: solução padrão e amostra de farinha de aveia.

Figura 27: Cromatogramas de vitamina PP: solução padrão e amostra de farinha de aveia.

As médias e os respectivos desvios padrão relativos dos teores de biotina, ácido pantotênico e ácido fólico em amostras de farinha de arroz, aveia, cevada, milho e trigo estão apresentados na Tabela 45.

Tabela 45: Médias e desvios padrão relativos dos teores de biotina, ácido pantotênico e ácido fólico em amostras de farinha de cereais (método microbiológico).

Amostras	Biotina (µg/100g)	CV (%) n = 3	Ácido Fólico (µg/100g)	CV (%) n = 3	Ácido Pantotênico (mg/100g)	CV (%) N = 3
Farinha de Arroz A	1,33	2,06	4,16	1,35	0,71	4,51
Tabelas	1,00		4,00 – 49,00		0,50 – 0,95	
Resultados preliminares	0,57 – 1,84		6,00 – 21,00		0,70 – 0,94	
Farinha de Aveia A	24,23	6,18	5,61	0,67	0,63	1,79
Farinha de Aveia B	17,10	2,66	6,80	0,67	0,38	3,98
Tabelas	-		32,00 – 46,00		0,20	
Resultados preliminares	11,34 – 33,00		7,00 – 18,00		0,40 – 0,74	
Farinha de Cevada A	6,48	7,23	8,40	0,48	0,27	2,75
Tabelas	-		8,00 – 56,00		0,15 – 0,68	
Resultados preliminares	1,49		8,00		0,30	
Farinha de Milho A	1,43	9,56	495,14	1,98	0,23	6,19
Farinha de Milho B	3,03	4,43	152,16	8,46	0,24	4,88
Farinha de Milho C	1,02	7,59	1,63	18,97	0,14	8,06
Tabelas	6,60		10,00 – 25,00		0,50 – 0,70	
Resultados preliminares	0,20		105 – 1016		0,20	
Farinha de Trigo A	2,90	11,06	109,92	8,98	0,48	7,27
Farinha de Trigo B	2,58	21,68	115,07	7,72	0,45	3,42
Farinha de Trigo C	2,33	15,86	140,17	8,53	0,49	4,22
Farinha de Trigo D	9,58	12,24	66,82	4,45	0,70	0,18
Farinha de Trigo E	6,44	6,41	75,43	6,71	0,83	6,85
Tabelas de Composição	1,20 – 8,30		10,00 – 50,00		0,20 – 1,20	
Tabelas	nd - 2,00		63,00 – 456,00		0,40 – 0,90	

A farinha de aveia pode ser considerada a que apresentou teores naturais de vitaminas do complexo B e ferro mais significativos, podendo ser consumida pela população infantil brasileira (1-3 anos) como alimento fonte natural, quando o consumo diário corresponde à uma colher de sopa (30g), de ferro (aproximadamente 15 % da IDR), vitamina B₁ (aproximadamente 24 % da IDR), vitamina B₆ e ácido pantotênico (aproximadamente 10 % da IDR) e em especial de biotina (aproximadamente 91 % da IDR).

Já a farinha de trigo, quando tais micronutrientes são avaliados como presentes naturalmente, pode ser consumida pela população infantil brasileira (1-3 anos) como alimento fonte natural, quando o consumo diário corresponde a uma colher de sopa (30g), de vitamina B₁ (aproximadamente 32 % da IDR), vitamina B₆ e ácido pantotênico (aproximadamente 13 % da IDR) e biotina, considerando a média dos resultados obtidos (aproximadamente 18 % da IDR).

A farinha de cevada, apesar de ter apresentado teores relativamente consideráveis de ferro (aproximadamente 18 % da IDR para o consumo diário de 1 colher de sopa) e biotina (aproximadamente 24 % da IDR para o consumo diário de 1 colher de sopa), assim como a farinha de arroz, que apresentou teor de ácido pantotênico de aproximadamente 35 % da IDR para o consumo diário de 30g, poderiam ser consideradas fonte destes micronutrientes, porém, devido aos hábitos alimentares brasileiros, não são consumidas normalmente no país.

Os resultados dos teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos das amostras de farinha de arroz, aveia, cevada, milho e trigo estão plotados nos gráficos das Figuras 24, 25, 26, 27 e 28, respectivamente. Estão também plotadas as faixas obtidas dos resultados preliminares e dos teores encontrados nas Tabelas de Composição de Alimentos.

Figura 28: Teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos da amostra de farinha de arroz.

Os resultados da análise de vitamina B₁ (a) na amostra de farinha de arroz analisada apresentaram-se dentro da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos, porém acima dos resultados preliminares. Isso pode ser explicado pela baixa sensibilidade do método utilizado para as análises preliminares (detecção de vitamina B₁ por reação pós-coluna).

Os resultados da análise da vitamina B₂ (b), ácido fólico (f), biotina (g) e ácido pantotênico (h) na amostra de farinha de arroz analisada apresentaram-se dentro da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos e dentro da faixa obtida utilizando-se os dados das análises preliminares.

Os resultados da análise da vitamina B₆ (c), niacina (d) e ferro (e) na amostra de farinha de arroz analisada apresentaram-se abaixo da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos e dentro da faixa obtida utilizando-se os dados das análises preliminares, indicando que a farinha nacional não fornece as mesmas quantidades destes micronutrientes em relação aos dados mundiais.

Vale lembrar que a Tabela TACO não foi considerada para limitar os valores encontrados nas tabelas de composição de alimentos para a farinha de arroz, uma vez que a amostra utilizada para análise de vitaminas e ferro foi uma amostra enriquecida.

Figura 29: Teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos das amostras de farinha de aveia.

Os resultados da análise de ferro (e), vitaminas B₆ (c) e B₁ (a) nas amostras de farinha de aveia analisadas apresentaram-se dentro da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos e dentro da faixa obtida utilizando-se os dados das análises preliminares, estando três dos resultados de vitamina B₁ (a) um pouco abaixo do limite inferior da faixa obtida dos resultados preliminares.

Os resultados da análise da vitamina B₂ (b), niacina (d) e ácido fólico (f) nas amostras de farinha de aveia analisadas apresentaram-se abaixo da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos e muito próximo do limite inferior da faixa obtida utilizando-se os dados das análises preliminares, indicando que a farinha nacional não fornece as mesmas quantidades destes micronutrientes em relação aos dados mundiais, em especial para o ácido fólico.

Para o ácido pantotênico (h), os resultados obtidos apresentaram-se dentro da faixa obtida utilizando-se os dados das análises preliminares, porém acima do único dado apresentado nas Tabelas de Composição de Alimentos.

Os teores obtidos de biotina (g) nas amostras de farinha de aveia estão dentro da faixa obtida para os dados preliminares e são consideráveis com relação à IDR recomendada, no entanto nenhum dado foi encontrado deste micronutriente em farinhas de aveia nas Tabelas de Composição de Alimentos, nem nacional e nem internacional.

Figura 30: Teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos da amostra de farinha de cevada.

Os resultados das análises de vitamina B₁ (a) e B₆ (c), ácido pantotênico (h) e ácido fólico (f) na amostra de farinha de cevada analisada apresentaram-se dentro da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos e muito próximos aos únicos dados preliminares obtidos para cada micronutriente.

Os resultados da análise da vitamina B₂ (b), niacina (d) e ferro (e) na amostra de farinha de cevada analisada apresentaram-se abaixo da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos, estando os resultados de vitamina B₂ (b) abaixo do único dado preliminar obtido e os de niacina (d) dentro da faixa obtida utilizando-se os dados das análises preliminares.

Para biotina (g), os resultados obtidos apresentaram-se acima do dado apresentado nas Tabelas de Composição de Alimentos e também do dado obtido nas análises preliminares.

Figura 31: Teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos das amostras de farinha de milho.

Os resultados da análise de vitaminas B₂ (b), niacina (d), biotina (g) e ácido pantotênico (h) nas amostras de farinha de milho analisadas apresentaram-se abaixo da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos. Os resultados de ácido pantotênico (h) estão muito próximos ou um pouco abaixo do único dado preliminar obtido, porém para a vitamina B₂ (b) eles se encontram abaixo do dado preliminar, o que pode ser explicado pela menor sensibilidade do método utilizado para as análises preliminares desta vitamina (detecção simultânea de vitamina B₁ e B₂).

Os resultados das análises de vitamina B₁ (a) e B₆ (c) nas amostras de farinha de milho analisadas apresentaram-se muito próximo ao limite inferior da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos e dos respectivos dados preliminares, estando três dos resultados de vitamina B₆ (c) consideravelmente acima do único dado preliminar obtido.

Para os dados de ferro (e) e ácido fólico (f) obtidos nas farinhas de milho analisadas, podemos encontrar três níveis de concentração, o que pode ser explicado pela fortificação ou não desta farinha.

Figura 32: Teores das vitaminas do complexo B e do ferro obtidos das amostras de farinha de trigo.

Os resultados da análise das vitaminas B₁ (a), B₆ (c) e ácido pantotênico (h) nas amostras de farinha de trigo analisadas apresentaram-se dentro das faixas obtidas utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos e os resultados preliminares.

Os resultados da análise da vitamina B₂ (b) nas amostras de farinha de trigo analisadas apresentaram-se muito próximos do limite inferior da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos e da faixa obtida dos dados preliminares. Os resultados de niacina (d) e ácido fólico (f), apesar de apresentarem-se dentro da faixa obtida utilizando-se os dados das análises preliminares, ficaram respectivamente abaixo e acima das respectivas faixas obtidas utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos.

Os resultados da análise de ferro (e) nas amostras de farinha de trigo analisadas apresentaram-se abaixo da faixa obtida utilizando-se os dados preliminares e muito próximos ao limite superior da faixa obtida utilizando-se os dados das Tabelas de Composição de Alimentos.

Para os resultados de biotina (g) obtidos nas farinhas de trigo analisadas, podemos encontrar dois níveis de concentração, o que pode ser explicado por uma variação natural, uma vez que este micronutriente não é utilizado para fortificação de farinhas de cereais.

5.7. Comparação dos teores de ácido fólico em farinhas de milho e trigo obtidos pelo método cromatográfico (CLAE) e microbiológico

Para a avaliação dos resultados de ácido fólico obtidos pelo método microbiológico, proposto para determinação deste micronutriente, 1 amostra de farinha de milho e 2 amostras de farinha de trigo foram analisadas também pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 46.

Tabela 46: Médias de ácido fólico em amostras de farinha de milho e trigo analisadas por método microbiológico e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Amostras	Métodos					
	Microbiológico			CLAE		
	Média em µg/100g (n=3)	DP	CV (%)	Média em µg/100g (n=3)	DP	CV (%)
Farinha de Milho A	495,14	9,82	1,98	460,53	0,86	0,19
Farinha de Trigo A	109,92	9,87	8,98	116,20	9,41	8,10
Farinha de Trigo C	140,17	11,96	8,53	140,50	4,92	3,50

DP = desvio padrão e CV (%) = coeficiente de variação em porcentagem

Os valores obtidos de ácido fólico para cada farinha não diferiram estatisticamente entre si.

6. CONCLUSÕES

Não existem, na literatura, Tabelas de Composição de Alimentos nacionais que fornecem dados de todas as vitaminas do complexo B avaliadas neste trabalho (vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina, ácido fólico, biotina e ácido pantotênico) e ferro, para as cinco farinhas analisadas. A maioria das tabelas apresenta somente quatro micronutrientes (vitaminas B₁, B₂, niacina e ferro). Assim, os resultados gerados no presente estudo irão contribuir para o fornecimento de dados confiáveis de 7 vitaminas e ferro presentes nas farinhas de cereais brasileiras.

Com relação ao enriquecimento de alimentos industrializados com os micronutrientes estudados, os resultados obtidos irão contribuir na decisão da quantidade adicionada de cada micronutriente através de bloco vitamínico e de minerais. Vale ressaltar a contribuição relevante de biotina nos produtos à base de

farinha de aveia, da vitamina B₁ nos produtos à base de farinha de trigo. Como os teores de ácido fólico e ferro nas farinhas de trigo e milho adicionadas apresentaram-se muito diferentes entre si, os valores declarados em rótulo desses micronutrientes em produtos industrializados devem ser cuidadosamente avaliados pela empresa, a fim de não desobedecer os limites de mais ou menos 20% exigido pela ANVISA.

A farinha de aveia pode ser considerada como fonte de ferro, vitamina B₁, B₆, ácido pantotênico e biotina. A farinha de trigo, não fortificada, pode ser considerada como fonte de vitamina B₁, B₆, ácido pantotênico e biotina. A farinha de cevada pode ser considerada como fonte de ferro e biotina. E a farinha de arroz pode ser considerada como fonte de ácido pantotênico. Destaca-se o fato de que não faz parte do hábito brasileiro o consumo das farinhas de cevada e arroz.

A determinação de ácido fólico em amostras de farinhas de milho e trigo enriquecidas através de duas metodologias analíticas distintas (análise microbiológica e CLAE) serviu para avaliar a especificidade do método microbiológico proposto, que foi considerada adequada uma vez que os valores apresentaram-se estatisticamente iguais.

Foram validados todos os métodos para a determinação das sete vitaminas do complexo B, inclusive os métodos microbiológicos, e ferro em farinhas de cereais, viabilizando, assim, o uso dos mesmos para análises de rotina em laboratório de controle de qualidade de alimentos. Apesar de o método microbiológico ser mais trabalhoso e demorado, é a técnica mais indicada para a determinação dos teores de ácido fólico, biotina e ácido pantotênico naturalmente presentes em farinhas de cereais, quando comparada aos métodos de determinação por cromatografia líquida citados na literatura.

Os dados obtidos durante a validação dos métodos mostraram que os mesmos são métodos confiáveis, com precisão variando entre 1 e 10 % para os micronutrientes determinados por CLAE (vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina), 7 % para ferro e entre 3 e 9 % para aqueles determinados pelo método microbiológico (ácido fólico, biotina e ácido pantotênico). Os dados de exatidão obtidos podem ser considerados adequados, com recuperações variando entre 68 e 96 % para os

micronutrientes determinados por CLAE (vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina), 94 % para ferro e entre 63 e 105% para aqueles determinados pelo método microbiológico (ácido fólico, biotina e ácido pantotênico).

Tanto os dados de recuperação, quanto os limites de quantificação (no mínimo igual 0,25 µg/100g) obtidos são considerados adequados para a avaliação dos micronutrientes propostos na matriz estudada, uma vez que os mesmos, quando não adicionados, estão presentes em teores relativamente baixos quando comparados aos dados de composição de alimentos, o que possibilita a determinação destes micronutrientes quando estão naturalmente presentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, T.S.; GODOY H.T. Simultaneous determination of nicotinamide, nicotinic acid, riboflavin, thiamin, and pyridoxine in enriched Brazilian foods by HPLC – HRC. **Journal of High Resolution Chromatography**, v.20, n.4, p.245-248, 1997.

ALABURDA, J.; ALMEIDA, A.P.; SABINO, M. Determinação de ácido fólico em farinhas fortificadas. **Química Nova**. No prelo.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Ácido pantotênico. In: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003. cap.12, p.465-481.

ANALYTICAL CHEMISTRY in EUROPE. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington: Eurachem, 1998. 75 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO. Milho e suas riquezas. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/ocereal.htm>. Acesso em: 22 ago. 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO TRIGO. O valor nutricional do trigo. Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br>. Acesso em: 22 ago. 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 8402. Gestão da qualidade e garantia da qualidade: terminologia. Rio de Janeiro: ABNT, 1994. 14 p.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023/2002, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2001. 31 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Method n.970.65 - Riboflavin (Vitamin B2) in foods and vitamin preparations, fluorimetric. 16.ed. Gaithersburg: AOAC, 1996a.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Method n.944.12 - Folic acid (pteroylmonoglutamic acid) in vitamin preparations: microbiological methods. 16.ed. Gaithersburg: AOAC, 1996b.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Method n.960.46 - Vitamin Assays: microbiological methods. 16.ed. Gaithersburg: AOAC, 1996c.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Method n.992.05 - Folic acid (pteroylmonoglutamic acid) in Infant formula: microbiological methods. 16.ed. Gaithersburg: AOAC, 1996d.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Method n.945.74 - Pantothenic acid in vitamin preparations: microbiological methods. 16.ed. Gaithersburg: AOAC, 1996e.

AUGUSTIN, J. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in foods by liquid chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**, v.67, n.5, p.1012-1015, 1984.

AUGUSTIN, J. Vitamin analysis In: NIELSEN, S.S. **Introduction to the chemical analysis of foods**. New York: Chapman & Hall, 1994. cap.17, p.249-260.

BALL, G.F.M. **Water-soluble vitamin assays in human nutrition**. London: Chapman & Hall, 1994. 416p.

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: 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: 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: Manole, 2003c. cap.10, p.367-396.

BRASIL. Resolução RDC n.344, de 13 de dezembro de 2002. Estabelece Regulamento técnico para fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344_02rdc.htm. Acesso em: 22 ago, 2006.

BRASIL, Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 22 ago, 2006a.

BRASIL. Resolução RDC n.360, de 23 de dezembro de 2003. Estabelece regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm. Acesso em: 22 ago. 2006b.

BRASIL. Resolução RDC n.269, de 22 de setembro de 2005. Estabelece regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18828&word>. Acesso: 22 ago. 2006.

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

CHASE, G.W.; LANDEN, W.O.Jr; SOLIMAN, A.G.; EITENMILLER, R.R. Method modification for liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin, and pyridoxine in medical foods. **Journal of AOAC International**, v.76, n.6, p.1276-80, 1993.

CLOSA, S.J.; LANDETA, M.C. Tabla de composición de alimentos. Disponível em: <http://www.unlu.edu.ar/~argenfoods/Tablas/Tabla.htm>. Acesso em: 22 ago. 2006.

COOPERMAN, J.M.; LOPEZ, R. Riboflavin. In: MACHLIN, J. **Handbook of Vitamins**. 2.ed. New York : Marcel Dekker, 1990. cap.7, p.299-328.

COSTA NETO, P.L.O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977, 262p.

CROP & Food Research. New Zealand Food Composition Data. Disponível em: <http://www.crop.cri.nz/home/products-services/nutrition>. Acesso em: 22 ago. 2006.

DeVRIES, J.W.; RADER, J.I.; KEAGY, P.M.; HUDSON, C.A. Microbiological assay-trienzyme procedure for total folates in cereals and cereal foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.88, n.1, p.5-15, 2005.

DRISKELL, J.A. Vitamin B₆. In: MACHLIN, J. **Handbook of vitamins**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1990. cap.9, p.379-402.

DROGUETTI, D.C.; PENTEADO, M.V.C. Biotina. In: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003. cap.11, p.407-461.

EUROPEAN INSTITUTE of ONCOLOGY. Research on care. SALVINI, S.; PARPINEL, M.; GNAGNARELLA, P.; MAISONNEUVE, P.; TURRINI, A. Italian Association for Research on Cancer. Food Composition Database for Epidemiological Studies in Italy Disponível em: http://www.ieo.it/inglese/research/b_dati.htm. Acesso em: 22 ago. 2006.

FINGLAS, P.M.; WIGERTZ, K.; VAHTERISTO, L.; WITTHOËFT, C.; SOUTHON, S.; FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**, v.64, p.245-255, 1999.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A.; KOZIOŁOWA, A. Chromatographic determination of riboflavin and its derivatives in food. **Jornal of Chromatography, A**, v.881, p.285-297, 2000.

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

HÄGG, M.; KUMPULAINEN, J. Thiamine and riboflavin contents in domestic imported cereal products in Finland. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.6, p.299-306, 1993.

HÄGG, M.; KUMPULAINEN, J. Thiamine and riboflavin contents of finnish breads and their corresponding flours. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.7, p.94-101, 1994.

HEALTH Canada. Food and Nutrition. Canadian nutrient file. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/fiche-nutri-data/index_e.html. Acesso em: 22 ago. 2006.

HENDRICKS, D.G. Mineral analysis by traditional methods In: NIELSEN, S.S. **Introduction to the chemical analysis of foods**. New York: Champman & Hall, 1994. cap.9, p.123-136.

HOOFFMANN, R.F. **Vitamins basics**. Basel: Reinhardt Druck, 1997. 74 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaio químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 36 p.

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.

LaCROIX, D.E.; WOLF, W.R.; VANDERSLICE, J.T. Determination of niacin in infant formula and wheat flour by anion-exchange liquid chromatography with solid-phase extraction cleanup. **Journal of AOAC International**, v.82, n.1, p.128-133, 1999.

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.

LEVY-COSTA, R.B.; SICHIERI, R.; PONTES, N.S.; MONTEIRO, C.A. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Revista de Saúde Pública**, v.39, n.4, p.530-540, 2005.

MANN, D.L.; WARE, G.M.; BONNIN, E. Liquid Chromatographic analysis of vitamin B₆ in reconstituted infant formula: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.88, n.1, p.30-37, 2005.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL of South Africa. Food Composition Database. Disponível em: <http://www.mrc.ac.za/FoodComp>. Acesso em: 22 ago. 2006.

MILLER, D.D. Atomic Absorption and Emission Spectroscopy In: NIELSEN, S.S. **Introduction to the chemical analysis of foods**. New York: Champman & Hall, 1994. cap.25, p.353-370.

MINISTRY of Family and Consumer Affairs. Danish Institute for Food and Veterinary Research. Danish Food Composition Databank. Disponível em: http://www.foodcomp.dk/fcdb_default.htm. Acesso em: 22 ago. 2006.

MORESCHI, E.C.P. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos**. São Paulo, 2006. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. No prelo.

NATIONAL PUBLIC HEALTH INSTITUTE. Fineli® - Finnish Food Composition Database. Nutrition Unit. Release 4.). Disponível em: <http://www.ktl.fi/fineli>. Acesso em: 22 ago. 2006.

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

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Oficina Regional de La FAO para América Latina y el Caribe. Tabla de Composición de Alimentos de América Latina. Disponível em: <http://www.rlc.fao.org/bases/alimento/>. Acesso em: 22 ago. 2006.

OTTAWAY, P.B. **The technology of vitamins in food**. London: Blackie Academic & Professional, 1993. 265p.

PENG, J.; LIU, S.; DENG, C. Separation and determination of trace amounts of aluminium (III), vanadium (V), iron (III), copper (II) and nickel (II) with CALKS and PAR by RP-HPLC. **Analytical Sciences**, v.21, p.259 -262, 2005.

PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo: Manole, 2003.

PHILIPI, S.T. **Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional**. Brasília: ANVISA, FINATEC/NUT/UnB, 2001. 133p.

PRESOTO, A.E.F.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Analysis of water-soluble vitamins and iron in oat flours used as raw material in dry cereal food enriched. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO, 18, Durban, 2005. **Abstracts**. Basel: Karger, 2005. p.134.

RIEDER, A.; DORES, E.F.G.C.; HIGA, N.; MORAES, M.P.L. de. Alterações no teor de matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do pantanal diante da poluição por pesticidas. **Pesticidas**: revista de ecotoxicologia e meio ambiente, v.10, p.87-112, jan./dez., 2000.

ROUNDS, M.A.; GREGORY, J.F. High-Performance Liquid Chromatography In: NIELSEN, S.S. **Introduction to the chemical analysis of foods**. New York: Champman & Hall, 1994. cap.29, p.425-438.

ROUNDS, M.A.; NIELSEN, S.S. Basic principles of chromatography. In: NIELSEN, S.S. **Introduction to the chemical analysis of foods**. New York: Champman & Hall, 1994. cap.28, p.403-424.

RYCHLIK, M. Simultaneous analysis of folic acid and pantothenic acid in foods enriched with vitamins by stable isotope dilution assays. **Analytica Chimica Acta**, v.495, p.133-141, 2003.

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

SCHEINER, J.; DE RITTER, E. Biotin content of feedstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, n.6, p.1157-1161, 1975.

SOUCI-FACHMANN-KRAUT. Online-Database. Food Composition and Nutrition Tables. Disponível em: <http://www.sfk-online.net>. Acesso em: 22 ago. 2006.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p.12-20, 1998.

TIRAPEGUI, J. **Nutrição**: fundamentos e aspectos atuais. São Paulo: Atheneu, 2000. 284 p.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Tabela brasileira de composição de alimentos. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>. Acesso em: 22 ago. 2006.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Taco: tabela brasileira de composição de alimentos. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco>. Acesso em: 05 nov. 2006.

United States pharmacopeia. 23.ed.rev. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p.1776-1777.

USDA. Agricultural Research Service. Nutrient Data laboratory. National Nutrient Database. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acesso em: 22 ago. 2006.

WIENK, K.J.H.; MARX, J.J.M.; LEMMENS, A.G.; BRINK, E.J.; VAN DER MEER, R.; BEYNEN, A.C. Mechanism underlying the inhibitory effect of high calcium carbonate intake on iron bioavailability from ferrous sulphate anaemic rats. **British Journal of Nutrition**, v.75, p.109-120, 1996.